

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 636**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/712** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2013** **E 13305082 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016** **EP 2759595**

54 Título: **Composición que comprende un antagomir encapsulado**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.03.2017**

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE MÉDICAMENT S.A.S. (50.0%)**  
**45 place Abel Gance**  
**92654 Boulogne cedex, FR y**  
**FUNDACIÓ HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'**  
**HEBRON - INSTITUT DE RECERCA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ASIN, MIGUEL-ANGEL;**  
**FERRET, EULALIA;**  
**PEREZ, AMADEO;**  
**GARCIA-DORADO GARCIA, ANTONIO DAVID;**  
**VERT, IGNASI BARBA;**  
**RODRIGUEZ SINOVAS, ANTONIO y**  
**GOTARDA, NEUS BELLERA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 606 636 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Composición que comprende un antagomir encapsulado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas destinadas para la prevención o el tratamiento de trastornos cardíacos, incluyendo trastornos isquémicos cardíacos.

Antecedentes de la invención

El infarto agudo de miocardio (AMI), también conocido como infarto de miocardio y comúnmente conocido como un ataque al corazón, representa un riesgo importante para la salud en los países más industrializados de todo el mundo y sigue siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo.

10 En general, el AMI es causado por una carencia repentina y prolongada de flujo de sangre al tejido del corazón, que es, generalmente, el resultado de un estrechamiento u oclusión de una arteria coronaria. Sin el suministro adecuado de sangre, el tejido se vuelve isquémico, lo que lleva a la muerte de los cardiomiocitos (células del músculo cardíaco) y estructuras vasculares.

15 Ha habido muchos avances en el tratamiento del AMI en las últimas décadas, principalmente con relación a la reperfusión coronaria en conjunto con la terapia farmacológica. La terapia de reperfusión ha logrado cambiar la progresión natural del AMI reduciendo el área infartada y mejorando la morbilidad y la mortalidad a corto plazo y a largo plazo. Sin embargo, existen limitaciones sustanciales en el uso de las dos estrategias de reperfusión disponibles en la actualidad: la fibrinólisis da como resultado un bajo grado de permeabilidad coronaria y la angioplastia primaria no puede aplicarse con frecuencia durante las primeras horas de evolución del AMI. Además, en algunos pacientes cateterizados, se produce el fenómeno de “no reflujo” o ausencia de reperfusión microvascular a pesar del flujo epicárdico normal, lo que da como resultado resultados funcionales adversos. Esto significa que la terapia de reperfusión no ha impedido la aparición de remodelación perjudicial del miocardio, un complejo proceso de reparación intrínseca de la formación de cicatrices de colágeno que da como resultado la dilatación ventricular, disfunción contráctil y la insuficiencia cardíaca subsecuente. Su aparición, en aproximadamente el 30% de los AMIs, se ha asociado principalmente a un mayor tamaño del infarto, obstrucción microvascular y reacciones de reparación desfavorables aún poco conocidas.

20 Dado que la fibrosis reparativa y la recuperación funcional de los tejidos isquémicos es dependiente del establecimiento de redes que suministran sangre oxigenada, se han hecho esfuerzos para mejorar el lecho vascular mediante la inducción de la neoangiogénesis en el área de cicatrización para lograr la conversión directa de las áreas lesionadas al tejido funcional *in situ*.

25 La inducción terapéutica de la angiogénesis podría atenuar la aparición de este fenómeno. No obstante, los resultados de varios años de pruebas clínicas con factores proangiogénicos intravenosos han sido insatisfactorios. Sin estar ligado por una teoría, se considera que una de las razones que explican este fracaso puede ser que la ruta intravenosa puede no ser capaz de alcanzar y mantener una concentración efectiva de fármaco en el tejido diana para promover y mantener una red vascular funcional bajo condiciones cardíacas severamente comprometidas.

30 A fin de abordar este problema y prevenir la insuficiencia cardíaca post-AMI, se inició la investigación sobre la posibilidad de regenerar el músculo cardíaco y los vasos en la última década. Los estudios iniciales que administran las células progenitoras pluripotentes y que infunden factores de crecimiento vasculares mostraron resultados prometedores, pero la traducción para el entorno clínico mostró incapacidad de estas terapias para regenerar la neovasculatura de una manera adecuada para permitir que se recupere el músculo cardíaco destruido.

Bonauer et al. (“MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice”; Science; vol.324, n° 5935, páginas 1710-1713; 2009) enseñan la implicación de miR-92a en angiogénesis y el uso del inhibidor de mir-92a en modelos de ratón de isquemia e infarto de miocardio.

35 D’Angelo et al. (“Improved delivery of angiogenesis inhibitors from PLGA:poloxamer blend micro- and nanoparticles”; Journal of Microencapsulation; vol.27, n° 1, páginas 57-66; 2010) enseñan el suministro de inhibidores de la angiogénesis en micropartículas.

40 Hoy en día, la angiogénesis y la repoblación del corazón dañado con la terapia celular, así como los fármacos específicos y la terapia de resincronización pueden disminuir la progresión de este fenómeno, pero la prevención de su ocurrencia sigue siendo un reto dudoso para la medicina cardíaca. Por lo tanto, se requieren nuevas estrategias de tratamiento que impidan el remodelado ventricular izquierdo adverso.

Sumario de la invención

50 La presente invención se refiere al tratamiento de los trastornos cardíacos, de preferencia isquémicos, mediante la administración de una composición que revierte o previene la remodelación ventricular mediante la modulación de la actividad o expresión de miR-92a. Más particularmente, la invención proporciona una composición que comprende

un inhibidor de un miR-92a involucrado en la angiogénesis, en donde el inhibidor se incorpora preferentemente en un nuevo vehículo de suministro capaz de liberar el inhibidor localmente al tejido diana isquémico. Además, la invención proporciona composiciones y kits útiles para un método para revertir o prevenir la remodelación ventricular.

5 Esta invención se refiere a una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un inhibidor de un miARN involucrado en la angiogénesis, en el que el inhibidor se microencapsula en microesferas poliméricas biodegradables y biocompatibles, en el que por lo menos 50% de dichas microesferas presentan un diámetro comprendido entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ , y en el que el dicho por lo menos un inhibidor consiste en un oligonucleótido antisentido dirigido a o que es complementario a miR-92a.

10 En algunas realizaciones de la composición descrita anteriormente, el dicho inhibidor de un miARN es un oligonucleótido de 8-49 nucleótidos de longitud que tiene una secuencia dirigida a tal miARN. En algunas realizaciones, el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido que es por lo menos parcialmente complementario a la secuencia de miARN diana. El oligonucleótido antisentido puede seleccionarse del grupo que consiste en un ribonucleótido, un desoxirribonucleótido, un antagomir, un LNA, un PNA, un oligonucleótido de morfolino o una combinación de los mismos.

15 En algunas realizaciones de la composición descrita anteriormente, el dicho inhibidor de un miARN consiste en un antagomir, comprendiendo dicho antagomir preferiblemente una secuencia nucleotídica que comprende por lo menos 16 nucleótidos contiguos complementarios a los nucleótidos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID No. 1, 2, 21, 22 y 23.

20 En algunas realizaciones de la composición descrita anteriormente, el dicho inhibidor de un miARN consiste en un antagomir que comprende la secuencia de SEC ID No. 59 o 60 y modificaciones sin incluir las sustituciones base de la misma, y fragmentos que consisten en subsecuencias de la SEC ID NO: 59 o 60 de por lo menos 8 nucleótidos contiguos de los mismos.

25 En algunas realizaciones de la composición descrita anteriormente, las dichas microesferas se presentan en un diámetro que no excede 25  $\mu\text{m}$ , que abarca microesferas que tienen un diámetro comprendido entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ .

En algunas realizaciones de la composición descrita anteriormente, las dichas microesferas se elaboran de un polímero que consiste en poli-d,l-lactida (PLA), siendo el polímero mezclado opcionalmente con uno o más de otros polímeros.

30 Esta invención también se refiere a cualquier composición como se define anteriormente para revertir o prevenir la remodelación ventricular en un paciente en necesidad del mismo.

De este modo, la invención también se refiere a cualquier composición como se define anteriormente para revertir o prevenir la remodelación ventricular en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una composición.

35 Esta invención también se refiere a una población de microesferas biodegradables y biocompatibles para el uso en el tratamiento o la prevención de infarto de miocardio, en el que las microesferas:

- tienen un diámetro medio comprendido entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ ;
- se elaboran de poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA); poli-d,l-lactida (PLA) o una mezcla de las mismas;
- se incorporan de 1% a 15% p/p de un agente terapéutico capaz de prevenir la remodelación ventricular,

40 en el que el agente terapéutico consiste en un inhibidor de una miARN seleccionado del grupo que consiste en miR-92a.

#### Descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la morfología de microesferas de antagomir-92a - PLGA determinada por microscopía electrónica de barrido;

45 La Figura 2 ilustra la distribución de tamaños de microesferas de antagomir-92a - PLGA determinada por dispersión de luz láser;

La Figura 3 ilustra los efectos en hemodinámica y contractilidad ventricular izquierda por inyecciones repetidas de microesferas hasta 120 mg;

La Figura 4 ilustra los efectos en hemodinámica y contractilidad ventricular izquierda por inyecciones repetidas de microesferas hasta 240 mg;

La Figura 5 ilustra el protocolo del estudio del efecto molecular de una sola inyección intracoronaria de microesferas de acuerdo con la invención;

La Figura 6 ilustra la especificidad de inhibición de miR-92a por las microesferas de acuerdo con la invención;

5 La Figura 7 ilustra que el antagomir-92a encapsulado induce la angiogénesis en el tejido infartado. La densidad vascular en la zona infartada, calculada dividiendo el número total de vasos por el área infartada total. N = 20. \* P < 0,01;

10 Figura 8: Índice de resistencia microvascular basal y mínimo medido un mes después de AMI, en la arteria relacionada con el infarto de cerdos enanos tratados con antagomir-92a encapsulado, placebo o disolución salina. (a) El índice de resistencia microvascular basal (MRI) se calculó multiplicando la presión (mmHg) evaluada con un alambre de presión colocado en la LAD apical (Pd) y flujo coronario (ml/min.) cuantificado por un detector colocado en el segmento distal de LAD. El índice de resistencia microvascular mínimo (MRI<sub>hyp</sub>) se calculó con los mismos parámetros medidos en hiperemia máxima alcanzada con la infusión intravenosa de 140 micro/kg/min. de adenosina administrada a través de la vaina de la vena femoral 12F. n = 12 \* p < 0,01 \*\*p = 0,05 (b) Correlación entre el número total de vasos en el área necrótica y la MRI. R<sup>2</sup> 0,41, p = 0,02, n = 12. (C) Correlación entre el número total de vasos en la zona necrótica y la MRI mínimo. R<sup>2</sup> 0,27, p = 0,08, n = 12;

15 Figura 9: Un mes después de AMI, se evaluó la presencia de discinesia septoapical por un ecocardiógrafo que desconocía el tratamiento asignado. Se muestra el porcentaje de animales con discinesia septoapical en animales tratados y no tratados (83,3% frente a 16,7%, p = 0,03). n = 20.

20 Descripción detallada de la invención

Se dan a continuación algunas definiciones que son relevantes en cuanto a la descripción de las realizaciones completas que están comprendidas por la presente invención.

Los microARN (miRs) son ARNs pequeños no codificantes que están surgiendo como reguladores cruciales de los procesos biológicos.

25 “MicroARN”, “miARN” o “miR” significa un ARN no codificante de aproximadamente 18 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. Estos miRs podrían provenir de múltiples orígenes, que incluyen: un gen individual que codifica un miARN, de intrones del gen que codifica la proteína, o de transcrito policistrónico que a menudo codifican múltiples microARNs, estrechamente relacionados.

30 El conocimiento actual demuestra que miARNs se transcriben por ARN polimerasa II (pol II) o ARN polimerasa III (pol III) y surgen de transcritos iniciales, denominados transcritos de miARN primarios (pri-miARNs), que son generalmente varios miles de bases de longitud. Pri-miARNs se procesan en el núcleo por la RNasa Drosha en precursores en forma de horquilla de aproximadamente 70 a 100 nucleótidos (pre-miARNs). Tras el transporte al citoplasma, el pre-miARN de horquilla se procesa adicionalmente por Dicer para producir un microARN de doble hebra; una de las hebras, llamada microARN maduro, (a veces pueden usarse ambas hebras) se incorpora después en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), en donde se asocia con sus ARNms diana por complementariedad de pares de bases. En los casos relativamente raros en los que una base de miARN se empareja perfectamente con una diana de ARN mensajero (ARNm), promueve la degradación de ARNm. Más comúnmente, los microARNs forman heterodúplex imperfectos con ARNms diana, que afectan la estabilidad del ARNm o que inhiben la traducción del ARNm.

35 “Secuencia de tallo-bucle” significa un ARN que tiene una estructura de horquilla y que contiene una secuencia de microARN maduro. Las secuencias de pre-miARN y las secuencias de tallo-bucle pueden solapar. Ejemplos de las secuencias de tallo-bucle se encuentran en la base de datos de microARN conocidas como miRBase.

40 “Precursor de microARN” significa un transcrito que se origina a partir de un ADN genómico y que comprende un ARN estructurado no codificante que comprende una o más secuencias de microARN. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un precursor de microARN es un pre-miARN. Un precursor de microARN es un pri-miARN.

45 La siguiente memoria descriptiva seguirá el sistema de nomenclatura estándar con el “mir-X” en minúsculas que se refiere al pre-miARN, mientras que un “miR-X” con mayúsculas se refiere a la forma madura. Cuando dos microARNs maduros se originan en los brazos opuestos del mismo pre-miARN, se denotan con el sufijo -3p o -5p. Cuando se conocen los niveles relativos de expresión, un asterisco después del nombre indica un microARN expresado en niveles bajos con relación al microARN en el brazo opuesto de una horquilla.

En la siguiente memoria descriptiva, a menos que se especifique lo contrario, el uso de la expresión de miR-X se refiere al miARN maduro, incluyendo ambas formas -3p y -5p, si existieran.

Para evitar dudas, en la presente memoria descriptiva, las expresiones microARN, miARN y miR designan el mismo producto.

En el contexto de la presente invención, es un objetivo modular la angiogénesis o procesos angiogénicos con, como consecuencia, un enfoque particular en miR-92a implicados en la angiogénesis. Es por lo tanto un objetivo de la invención modular por lo menos un miR-92a que pertenece a una familia de microARNs implicados en la modulación de la angiogénesis.

- 5 Por la expresión “familia de microARN”, se pretende un grupo de microARN con una función relacionada que consiste en la modulación de la angiogénesis o procesos angiogénicos. Más particularmente, sin limitación, tales microARNs se seleccionan del grupo que consiste en microARNs que presentan una actividad antiangiogénica.

Para evitar dudas, la expresión de microARN en la siguiente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario, se referirá al ARN maduro o procesado después de que se ha escindido de su precursor. Para las formas no maduras, se usará la expresión “precursores” o “precursores de microARN”.

10

La siguiente tabla 1 reagrupa las diferentes secuencias de los precursores de microARN.

Tabla 1

SEC ID nº:	Nombre	Secuencia
1	mir-92a-1	CUUUCUACACAGGUUGGCAUCGGUUGCAAUGCTUGUUUUCUGUAUGGUUAUUG CACUUGUCCCGGCCUGUUGAGUUUGG
2	mir-92a-2	UCAUCCUUGGGUGGGGAUUUGUUGCAUUACTUUGUUGUUAUUAUAAGUAUUG CACUUGUCCCGGCCUGUGGAAGA
3	mir-92b	CGGGCCCCGGGCGGGCGGGAGGGACGGGACGGGUGCAGUGUUGUUUUUCC CCCGCCAAUAUUGCACUCGUCGCCGCCUCCGGCCCCCCCCGGCCC
4	mir-17	GUCAGAAUAUUGUCAAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGUGAUUAUGUGCAUCUAC UGCAGUGAAGGCACUUGUAGCAUUAUGGUGAC
5	mir-503	UGCCCUAGCAGCGGGAACAGUUCUGCAGUGAGCGAUCGGUGCUCUGGGGUUAU UGUUUCCGUCUGCCAGGGUA
6	mir-16-1	GUCAGCAGUGCCUUAAGCAGCACGUAUUAUUGCCGUUAAGAUUCUAAAAUUA UCUCCAGUAUUAACUGUCUGCUGCUGAAGUAAGGUUGAC
7	mir-16-2	GUUCCACUCUAGCAGCACGUAUUAUUGCCGUUAAGAUUAUUAUUAACA CCAUAUUAUCUGUCUGCUUAGUGUGAC
8	mir-374a	UACAJCGGCCAUUAUUAACAACCUGAUUAAGUGUUAUAGCACUUAUCAGAUU GUAUUGUAAUUGUCUGUGUA
9	mir-374b	ACUCGGAUGGAUUAUUAACAACCUGCUAAGUGUCCUAGCACUUAAGCAGGUUG UAUUAUCAUUGUCCGUGUCU
10	mir-374c	ACACGGACAAUGAUUAUUAACAACCUGCUAAGUGUCCUAGGACACUUAAGCAGGUUG UAUUAUUAUCCAUCGAGU
11	mir-24-1	CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUAUCAGUUCUCAUUUUAACACACUGGCUCAGU UCAGCAGGAACAGGAG
12	mir-24-2	CUCUGCCUCCCGUGCCUACUGAGCUGAAACACAGUUGGUUGUGUACACUGG CUCAGUUCAGCAGGAACAGGG
13	mir-483	GAGGGGAAGACGGGAGGAAAGAGGGAGUGGUUCCAUCACGCCUCCUCACU CCUCUCCUCCCGUCUUCUCCUCUC
14	mir-34a	GGCCAGCUGUGAGUGUUCUUGGCGAGUGUCUUAAGCUGGUUGUUGUGAGCAA UAGUAAGGAAGCAUUCAGCAAGUAUACUGCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUG GGCCC
15	mir-34b	GUGCUCGGUUUGUAGGCAGUGUCAUUAAGCUGAUUGUACUGUGGUGGUUAACA UCACUAACTUCCACUGCCAUAACAACAAGGCAC
16	mir-34c	AGUCUAGUUAUCUAGGCAGUGUAGUUAAGCUGAUUGCUAAUAGUACCAUUCACU AACCACACGGCCAGGUAAAAAGAUU
17	mir-20a	GUAGCACUAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAGUGUUAAGUUAUCUACUGCAUUA UGAGCACUUAAGUACUGC

ES 2 606 636 T3

18	mir-20b	AGUACCAAAGUGCUCUAUAGUGCAGGUAGUUUUGGCAUGACUCUACUGUAGUA UGGGCACUUCAGUACU
19	mir-15a	CCUUGGAGUAAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUGUGGAUUUUGAAAAGGUGCA GGCCAUAUUGUGCUGCCUCAAAAAUACAAGG
20	mir-15b	UUGAGGCCUAAAAGUACUGUAGCAGCACAUCAUGGUUUACAUGCUACAGUCA AGAUGCGAAUCAUUAUUGCUGCUCUAGAAAUUUAAGGAAAUCAU

La siguiente tabla 2 indica, para cada microARN, las secuencias del microARN y los residuos correspondientes en las secuencias precursoras correspondientes (véase la tabla 1).

Tabla 2

SEC ID nº:	Nombre	Secuencia	Restos del precursor
21	miR-92a-3p	uauugcacuuguccggccugu	48-69
22	miR-92a-1-5p	agguugggaucgguugcaaugcu	11-33
23	miR-92a-2-5p	ggguggggaauuuguugcauuac	9-30
24	miR-92b-3p	uauugcacucguaccggccucc	61-82
25	miR-92b-5p	agggacgggacgcggugcagug	20-41
26	miR-17-3p	acugcagugaaggcacuuguag	51-72
27	miR-17-5p	caaagucuuacagugcagguag	14-36
28	miR-503-3p	gggguauuguuuccgcugccagg	46-68
29	miR-503-5p	uagcagcgggaacaguucugcag	6-28
30	miR-16-1-3p	ccaguauuaacugugcugcuga	56-77
31	miR-16-2-3p	ccaauauuacugugcugcuua	53-74
32	miR-16-5p	uagcagcacguaaaauuuggcg	14-35 (para miR-16-1) o 10-31 (para miR-16-2)
33	miR-374a-3p	cuuaucauguuauuguaauu	42-63
34	miR-374a-5p	uuauauacaaccuguaagug	12-33
35	miR-374b-3p	cuuagcagguuguauuaucauu	41-62
36	miR-374-5p	auauauacaaccugcuaagug	11-32
37	miR-374c-3p	cacuuagcagguuguauuauau	39-60
38	miR-374c-5p	auauauacaaccugcuaagugcu	13-34
39	miR-24-1-3p	uggcucaguucagcaggaacag	44-65
40	miR-24-1-5p	ugccuacugagcugauaucagu	7-28
41	miR-24-2-3p	uggcucaguucagcaggaacag	50-71
42	miR-24-2-5p	ugccuacugagcugaaacacag	13-34
43	miR-483-3p	ucacuccucuccuccgucuu	48-68
44	miR-483-5p	aagacgggaggaaagaaggag	8-29
45	miR-34a-3p	caaucagcaaguauacugccu	64-85
46	miR-34a-5p	uggcagugucuagcugguugu	22-43

47	miR-34b-3p	caaucacuaacuccacugccau	50-71
48	miR-34b-5p	uaggcagugucuuagcugauug	13-35
49	miR-34c-3p	aaucacuaaccacacggccagg	46-67
50	miR-34c-5p	aggcaguguaguauagcugauugc	13-35
51	miR-20a-3p	acugcauuagagcacuuaaag	44-65
52	miR-20a-5p	uaaagugcuuauagugcagguag	8-30
53	miR-20b-3p	acuguaguaugggcacuccag	44-65
54	miR-20b-5p	caaagugcucauagugcagguag	6-28
55	miR-15a-3p	caggccauauugugcugccuca	51-72
56	miR-15a-5p	uagcagcacauaauugguuugug	14-35
57	miR-15b-3p	cgaaucauuuuugcugcucua	58-79
58	miR-15b-5p	uagcagcacaucaugguuuaca	20-41

A menos que se indique lo contrario, las secuencias del precursor y de microARN a que se hace referencia en la solicitud son secuencias humanas. Sin embargo, en algunos casos, las secuencias de microARN humanas son homólogas a las secuencias de microARN de otras especies.

5 Como ejemplo, se puede mencionar en la presente que el miR-92a humano es homólogo a miRs de otras especies. Más particularmente, miR-92a humano es homólogo a miRs de *dme* (*Drosophila melanogaster*), *mmu* (*Mus musculus*), *rno* (*Rattus norvegicus*), *dps* (*Drosophila pseudoobscura*), *aga* (*Anopheles gambiae*), *dre* (*Danio rerio*), *mml* (*Macaca mulata*), *xrt* (*Xenopus tropicalis*), *ame* (*Apis mellifera*), *odi* (*Oikopleura dioica*), *cin* (*Ciona intestinalis*), *esa* (*Ciona savignyi*), *cfa* (*Canis familiaris*) y cerdo o *ssc* (*Sus scrofa*).

10 Con base en su conocimiento general, la persona experimentada en la técnica encontrará fácilmente la homología entre otras secuencias de microARN humanas y las secuencias de microARN de otras especies.

15 Las secuencias nucleotídicas de microARNs maduros y sus secuencias de tallo-bucle correspondientes descritas en la presente son las secuencias encontradas en miRBase, una base de datos en línea de secuencias de microARN y anotación. Las entradas en la base de datos miRBase Sequence representan una porción de horquilla predicha de un transcrito de microARN (el tallo-bucle), con información sobre la ubicación y la secuencia de la secuencia de microARN maduro. Las secuencias de tallo-bucle de microARN en la base de datos no son estrictamente miARNs precursores (pre-miARNs), y pueden, en algunos casos, incluir el pre-miARN y alguna secuencia de flanqueo del transcrito primario presunto.

20 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar composiciones para el tratamiento o la prevención de la remodelación ventricular después de AMI, que comprende un inhibidor de miR-92a, o una combinación de inhibidores de varios miR-92a, involucrados en diferentes reacciones que regulan la fisiología de la angiogénesis, o precursores de los mismos.

25 Sin embargo, en la mayoría de los estudios publicados, la vía intravenosa se usa para la administración de inhibidores de microARN en animales. La manipulación de microARN implicado en la regulación de la expresión de genes vasculares representa una nueva diana terapéutica en la enfermedad isquémica. Dentro del sector biomédico, ha habido un aumento exponencial en la investigación sobre la administración de moduladores de ARN especialmente diseñados para inhibir una secuencia de ARN particular.

30 Dimmeler et al. han mostrado una mejora en la contractilidad y la recuperación de la función del ventrículo izquierdo después de la inhibición de miR-92a por el inhibidor de microARN específico administrado sistémicamente. Dado que el racimo 17-92a microARN policistrónico se ha relacionado con la tumorigénesis y debido a la ubicuidad de tipo celular de microARNs, la administración intravenosa en las inyecciones repetitivas de miR o anti-miRs plantea problemas sobre la seguridad.

35 Debido al hecho de que los microARNs controlan los procesos complejos y están presentes en diversas rutas celulares, es altamente probable que también provoquen efectos secundarios significativos. Un problema, entre otros, en la actualidad es que los tratamientos con inhibidores de miARN no son selectivos.

- Además, dada la ubicuidad y la baja especificidad por el órgano de estas moléculas, la administración sistémica podría conducir a ejercer funciones de regulación en los tejidos en los que estos miARNs tienen diferentes funciones específicas celulares o en los que no se expresan normalmente. Esta regulación errónea podría llevar probablemente a desencadenar efectos secundarios. Entre los riesgos potenciales, la tumorigénesis asociada con la manipulación de microARN sigue siendo una de las principales preocupaciones cuando se aplica esta terapia a la patología humana. Por otra parte, para obtener una concentración prolongada adecuada en las células diana, los inhibidores de microARN deben inyectarse repetidamente a dosis muy altas. Aunque la experimentación en animales pequeños en condiciones controladas conlleva limitaciones menores, la transposición a los seres humanos presupone obstáculos para la bioseguridad, así como impedimentos logísticos y económicos.
- Para resolver estos problemas y permitir que este nuevo enfoque terapéutico sea transferido a los pacientes, se considera generar un vehículo de liberación para el transporte de inhibidores de microARN y la liberación de éstos directamente en el órgano diana. Un vehículo apropiado dirigiría el inhibidor de microARN directamente al tejido enfermo permitiendo de este modo una reducción de la dosis, con el fin de evitar la administración de inyecciones repetidas y minimizar los efectos biológicos potencialmente no deseados en otros órganos.
- Por lo tanto, el objetivo es mejorar la selectividad con el fin de evitar los efectos secundarios de estos tratamientos por medio de la liberación de los inhibidores de microARN solo en el tejido diana. Este problema se resuelve, de acuerdo con la invención, microencapsulando los inhibidores de microARN en microesferas biodegradables y biocompatibles.
- Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar composiciones para el tratamiento o la prevención de la remodelación ventricular después de AMI, que comprende por lo menos un inhibidor microencapsulado de miR-92a que pertenece a la familia de microARN relacionada con la modulación de la angiogénesis.
- Microencapsulando los inhibidores de microARN en microesferas, se facilita la administración intra-arterial después de la angioplastia transluminal, de modo que las microesferas se liberan y retienen solamente en los microvasos, también llamados capilares, de la zona dañada; de esta manera los inhibidores de microARN encapsulados pueden liberarse localmente.
- La inyección intracoronaria a través de la arteria causante del AMI permite la retención de las microesferas en la microcirculación coronaria y la liberación sostenida de los inhibidores de microARN directamente en el tejido isquémico diana. Los inhibidores de microARN inducen la neoangiogénesis que mejora la recuperación funcional de la contractilidad del tejido dañado, así como la remodelación post-infarto favorable.
- Inesperadamente, se muestra en la presente que, cuando se microencapsula en las microesferas apropiadas, un inhibidor de microARN y especialmente un inhibidor de un miR-92a que pertenece a la familia de microARN relacionada con la modulación de la angiogénesis, el microARN se libera con éxito a la zona dañada del miocardio para bloquear la actividad biológica del microARN diana. Como se muestra en los ejemplos en la presente, la administración, por vía intracoronaria selectiva, de un inhibidor de miR-92a, que está microencapsulado en microesferas biodegradables y biocompatibles poliméricas a las personas que han sufrido de un infarto de miocardio conduce a una recuperación funcional del miocardio.
- Por lo tanto, las microesferas retenidas en la microcirculación permiten la liberación prolongada del inhibidor de microARN directamente en el tejido isquémico diana. El efecto prolongado de los inhibidores de microARN (también conocidos como reducción) de microARN seleccionado diana dio como resultado un crecimiento significativo de los vasos y la supresión de remodelado adverso en el área de curación un mes después de la lesión.
- Como se muestra en los ejemplos en la presente, se ha demostrado que la ocurrencia de la remodelación ventricular adversa puede ser prevenida mediante la inducción de la vasculogénesis a través de la inhibición local y prolongada de un miR-92a perteneciente a la familia de microARN relacionada con la modulación de la angiogénesis por el inhibidor de microARN apropiado encapsulado administrado en la arteria relacionada infartada. Esto representa un nuevo método de suministro que facilitará la siguiente traslación segura de la terapia de modulación génica a pacientes que sufren de un infarto agudo del miocardio.
- Estos resultados muestran claramente que una composición que comprende un inhibidor de miR-92a que consiste en un oligonucleótido antisentido dirigido a o que es complementario a miR-92a como se describe en la presente, permite una liberación local eficaz del inhibidor en cantidades terapéuticamente efectivas y a una velocidad de liberación terapéuticamente efectiva.
- En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un inhibidor de un microARN involucrado en la angiogénesis, en el que dicho inhibidor se microencapsula en microesferas poliméricas biodegradables y biocompatibles, en el que por lo menos 50% de dichas microesferas presentan un diámetro comprendido entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ , y en el que el dicho por lo menos un inhibidor consiste en un oligonucleótido antisentido dirigido a o que es complementario a miR-92a.
- Por la expresión "microesferas", debe entenderse partículas esféricas de tamaño de 1  $\mu\text{m}$  a pocos cientos de  $\mu\text{m}$ , que incluye un diámetro comprendido entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ . La expresión "micropartículas" incluye tanto "microesferas"



como “microcápsulas”. En la presente memoria descriptiva, se usa la expresión “microesferas”, pero debe entenderse que, cuando la sustitución con una “microcápsula” es posible y de interés de según la persona experta en la técnica, el uso de “microesferas” y “microcápsulas” es equivalente.

5 Por la expresión “encapsulado” o “microencapsulado”, debe entenderse que incluye o se incrusta en partículas de protección o de liberación modificada.

10 En otras palabras, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un inhibidor de un microARN involucrado en la angiogénesis, en el que dicho inhibidor se microencapsula en microesferas poliméricas biodegradables y biocompatibles, en el que por lo menos 50% de dichas microesferas presentan un diámetro comprendido entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ , y en el que el dicho por lo menos un inhibidor consiste en un oligonucleótido antisentido dirigido a o que es complementario a miR-92a.

“Composición farmacéutica” significa una mezcla de sustancias adecuadas para su administración a un individuo que incluye un agente farmacéutico. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender un inhibidor de miARN y una disolución acuosa estéril.

15 En una realización de la composición de la invención, el dicho microARN consiste en el miR-92a maduro que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID No. 21, 22 o 23, o una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad de nucleótidos con una de SEC ID No. 21, 22 o 23.

En otra realización de la composición de la invención, el dicho miR-92a consiste en el miR-92a maduro que comprende la secuencia SEC ID No. 21 o una secuencia que tiene por lo menos 90%, preferiblemente 95% de identidad de nucleótidos con SEC ID No. 21.

20 En otra realización de la composición de la invención, el dicho miR-92a consiste en el miR-92a maduro que comprende la secuencia SEC ID No. 22 o una secuencia que tiene por lo menos 90%, preferiblemente 95% de identidad de nucleótidos con SEC ID No. 22.

25 En otra realización de la composición de la invención, el dicho miR-92a consiste en el miR-92a maduro que comprende la secuencia SEC ID No. 23 o una secuencia que tiene por lo menos 90%, preferiblemente 95% de identidad de nucleótidos con SEC ID No. 23.

30 En el sentido de la presente invención, el “porcentaje de identidad” entre dos secuencias de ácidos nucleicos significa el porcentaje de residuos de nucleótidos idénticos entre las dos secuencias a ser comparadas, obtenido después de la alineación óptima, siendo este porcentaje puramente estadístico y distribuyéndose las diferencias entre las dos secuencias aleatoriamente a lo largo de su longitud. La comparación de dos secuencias de ácidos nucleicos se lleva a cabo tradicionalmente mediante la comparación de las secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, siendo tal comparación capaz de ser llevada a cabo por segmento o usando una “ventana de alineamiento”. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, además de la comparación manual, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981), por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970), por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) o por medio de programas de computadora que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o por el programa de comparación BLAST NR o BLAST P).

35 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos se determina comparando las dos secuencias alineadas de manera óptima, en la que la secuencia de ácido nucleico a comparar puede tener adiciones o eliminaciones en comparación con la secuencia de referencia para un alineamiento óptimo entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones en las que el residuo de nucleótidos es idéntico entre las dos secuencias, de preferencia entre las dos secuencias completas, dividiendo el número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de alineamiento y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre las dos secuencias.

40 Tal como se pretende en la presente, las secuencias nucleotídicas que tienen por lo menos 90% de identidad de nucleótidos con una secuencia de referencia abarcan las que tienen por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con tal secuencia de referencia.

En términos generales, un inhibidor es una molécula que reprime o impide que otra molécula se acople en una reacción.

45 Tal como se usa en la presente, el término “inhibidor de mir-X, o mir-X” se refiere a cualquier molécula o compuesto que disminuye o reduce la expresión y/o la actividad de miR-X o mir-X. Esta inhibición debería, como consecuencia, evitar la inhibición de la neo-angiogénesis, es decir, promover la neoangiogénesis a fin de evitar el remodelado adverso del músculo cardíaco después del infarto.

50 En una realización de la invención, el dicho inhibidor de miR-92a es un oligonucleótido de 8-49 nucleótidos de longitud que tiene una secuencia dirigida a tal miR-92a.

La expresión “dirigido a” significa que tiene una secuencia nucleotídica que va a permitir la hibridación a un ácido nucleico diana para inducir un efecto deseado. En algunas realizaciones, un efecto deseado es la reducción y/o inhibición de un ácido nucleico diana.

5 “Hibridar” significa la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que se produce a través de “complementariedad de nucleótidos”, es decir, la capacidad de dos nucleótidos para emparejarse de forma no covalente vía enlazamiento de hidrógeno.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos del inhibidor de miARN tienen 8-49 nucleótidos de longitud.

10 Un experto en la técnica apreciará que esto es un ejemplo de oligonucleótidos de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo dentro. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de acuerdo con la invención, son de 10 a 20 nucleótidos de longitud. Un experto en la técnica apreciará que esto es un ejemplo de oligonucleótidos de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo dentro.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene una secuencia que es complementaria a un miR-92a.

15 En una realización de la composición de la invención, el dicho oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido que es al menos parcialmente complementario a la secuencia de miR-92a.

La expresión “oligonucleótido antisentido” se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia nucleotídica complementaria a una secuencia nucleotídica específica (referida como una secuencia sentido) y capaz de hibridarse con la secuencia sentido.

20 “Complementariedad” significa la capacidad de apareamiento de nucleótidos entre un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia nucleotídica que es complementaria a un miR-92a, lo que significa que la secuencia del oligonucleótido antisentido es por lo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99%

25 idéntica al complemento de un miR-92a, o que las dos secuencias se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica del oligonucleótido antisentido puede tener uno o más pares de bases no coincidentes con respecto a miR-92a, y es capaz de hibridarse a su secuencia diana. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene una secuencia que es totalmente complementaria a miR-92a, lo que significa que la secuencia nucleotídica del oligonucleótido antisentido es 100%  
30 idéntica del complemento de miR-92a.

35 En el contexto de la presente invención, “complementario” se entiende un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia nucleotídica que es por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% o 100%, idéntica al complemento de la secuencia nucleotídica de miR-92a, sobre una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos, o que las dos secuencias se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas.

40 “Porcentaje de complementariedad” significa el número de nucleótidos complementarios en un ácido nucleico dividido por la longitud del ácido nucleico. En algunas realizaciones, el porcentaje de complementariedad de un oligonucleótido significa el número de nucleótidos que son complementarios al ácido nucleico diana, dividido por la longitud del oligonucleótido.

En una realización, la secuencia del oligonucleótido antisentido es “totalmente complementaria” a la secuencia del miR-92a diana, lo que significa que cada nucleótido del oligonucleótido antisentido es capaz de aparearse con un nucleótido en cada posición correspondiente en el microARN diana.

45 En alguna realización, el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, tiene una secuencia que es parcial o totalmente complementaria a la secuencia de miR-92a que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID No. 21, 22 o 23 o una secuencia que tiene identidad de nucleótidos de por lo menos 90% con una de las SEC ID No. 21, 22 o 23.

50 En una realización, el oligonucleótido antisentido comprende una cadena principal modificada. Ejemplos de tales cadenas principales se proporcionan por cadenas principales de morfolino, cadenas principales de carbamato, cadenas principales de siloxano, cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona, cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo, cadenas principales de metilenformacetilo, cadenas principales de riboacetilo, cadenas principales que contienen alqueno, cadenas principales de sulfamato, sulfonato y sulfonamida, cadenas principales de metilenimino y metilendiazino, y cadenas principales de amida.

- Los oligonucleótidos de morfolino tienen una cadena principal no cargada, en la que el azúcar desoxirribosa del ADN se sustituye por un anillo de seis miembros y el enlace fosfodiéster se reemplaza por un enlace fosforodiamidato. Los oligonucleótidos de morfolino son resistentes a la degradación enzimática y parecen funcionar como agentes antisentido mediante la detención de traducción o interfieren con el ajuste de pre-ARNm en lugar de la activación de la ARNasa H.
- Una cadena principal modificada se destina típicamente para aumentar la resistencia a nucleasa. Una cadena principal modificada también puede ser preferida debido a su afinidad alterada para la secuencia diana en comparación con una cadena principal no modificada. Una cadena principal no modificada puede ser ARN o ADN.
- Otro oligonucleótido antisentido adecuado comprende un ácido nucleico peptídico (PNA), que tiene una cadena principal de poliamida modificada. Las moléculas a base de PNA son verdaderos imitadores de las moléculas de ADN en términos de reconocimiento de pares de bases. La cadena principal del PNA se compone de unidades de 7V-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos, en donde las nucleobases se enlazan a la cadena principal por enlaces metilencarbonilo.
- Una cadena principal adecuada adicional comprende un análogo nucleotídico de morfolino o equivalente, en el que el azúcar de ribosa o desoxirribosa se sustituye por un anillo de morfolino de 6 miembros. Un análogo nucleotídico más preferido o equivalente comprende un oligómero de fosforodiamidato morfolino (PMO), en el que el azúcar de ribosa o desoxirribosa se reemplaza por un anillo de morfolino de 6 miembros, y el enlace fosfodiéster aniónico entre los anillos adyacentes de morfolino se reemplaza por un enlace de fosforodiamidato no iónico.
- En aún una realización adicional, un oligonucleótido antisentido de la invención comprende una sustitución de uno de los oxígenos sin puente en el enlace fosfodiéster. Esta modificación desestabiliza ligeramente el apareamiento de bases, pero añade una resistencia significativa a la degradación por nucleasas.
- Un oligonucleótido antisentido adecuado adicional de la invención comprende uno o más restos de azúcar que están mono- o disustituidos en la posición 2', 3' y/o 5', tal como un -OH; -F; alquilo inferior (C1-C10) sustituido o no sustituido, lineal o ramificado, alquenilo, alquinilo, alcarilo, alilo, arilo o aralquilo, que puede estar interrumpido con uno o más heteroátomos; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; O-, S- o N-alilo; O-alquil-O-alquilo, -metoxi, -aminopropoxi; -aminoxi; -metoxietoxi; -dimetilaminooxietoxi y -dimetilaminoetoxietoxi.
- El resto de azúcar puede ser una piranosa o derivado de la misma, o una desoxipiranosa o derivado de la misma, de preferencia una ribosa o un derivado de la misma, o una desoxirribosa o un derivado de la misma. Tales restos de azúcares derivatizados preferidos comprenden el ácido nucleico bloqueado.
- Un LNA es un nucleótido de ARN modificado en el que el radical de ribosa del nucleótido de LNA se modifica con un puente adicional que conecta los carbonos 2' y 4'. Esto mejora el apilamiento y la pre-organización de bases, y aumenta significativamente la estabilidad térmica. Este puente "bloquea" la ribosa en la conformación estructural 3'-endo, que a menudo se encuentra en la forma A de ADN o ARN. Los nucleótidos de LNA usados en la presente invención se pueden mezclar con las bases de ADN o ARN en el oligonucleótido siempre que se desee.
- De acuerdo con la invención, el dicho oligonucleótido antisentido se selecciona en el grupo constituido por un ribonucleótido, un desoxirribonucleótido, un antagomir, un LNA, un PNA, un oligonucleótido de morfolino o una combinación de los mismos.
- En una realización preferida de la composición de la invención, el dicho oligonucleótido antisentido es un antagomir.
- Los antagomirs son oligonucleótidos diseñados químicamente que se usan para silenciar el microARN endógeno. Un antagomir es un ARN o ADN sintético pequeño que es perfectamente complementario a la diana de microARN específico, ya sea con desemparejamiento en el sitio de escisión o algún tipo de modificación de base para inhibir la escisión. Por lo general, los antagomirs tienen algún tipo de modificación para que sea más resistente a la degradación y facilitar la internalización celular. No está claro cómo funciona la antagomirización (el proceso por el cual un antagomir inhibe la actividad de microARN), pero se cree que inhibe de forma irreversible la unión del microARN. Los antagomirs se usan para inhibir constitutivamente la actividad de microARNs específicos.
- En una realización de la invención, el dicho antagomir comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos contiguos complementarios al mir-92a de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID No. 1 y 2.
- En una realización de la invención, el dicho antagomir comprende una secuencia nucleotídica que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos contiguos complementarios al miR-92a de secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID No. 21, 22 o 23.
- En otra realización, el dicho antagomir comprende una secuencia nucleotídica que comprende por lo menos 16 nucleótidos contiguos complementarios a los nucleótidos de la secuencia SEC ID No. 21.
- En una realización de la invención, el dicho antagomir posee una cadena principal de ADN.

En tal realización de la composición de la invención, el dicho antagomir comprende la secuencia de SEC ID No. 59 y las modificaciones que excluyen las sustituciones de bases de la misma, y fragmentos que consisten en subsecuencias de la SEC ID NO: 59 de por lo menos 8 nucleótidos contiguos de la misma.

En otra realización de la invención, el dicho antagomir posee una cadena principal de ARN.

- 5 En tal realización de la composición de la invención, el dicho antagomir comprende la secuencia de SEC ID No. 60 y modificaciones sin incluir sustituciones de bases de la misma, y fragmentos que consisten en subsecuencias de la SEC ID NO: 60 de por lo menos 8 nucleótidos contiguos de la misma.

En una realización, el antagomir, de acuerdo con la invención, es un fragmento que consiste en una subsecuencia de la SEC ID NO: 59 o 60 de por lo menos 8 nucleótidos contiguos de la misma.

- 10 En una realización, el antagomir de acuerdo con la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de la SEC ID NO: 59 o 60 de por lo menos 9 nucleótidos contiguos de la misma.

En una realización, el antagomir de acuerdo con la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de la SEC ID NO: 59 o 60 de por lo menos 10 nucleótidos contiguos de la misma.

- 15 En una realización, el antagomir de acuerdo con la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de la SEC ID NO: 59 o 60 de por lo menos 11 nucleótidos contiguos de la misma.

En una realización, el antagomir de acuerdo con la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de la SEC ID NO: 59 o 60 de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de la misma.

En una realización, el antagomir de acuerdo con la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de la SEC ID NO: 59 o 60 de por lo menos 13 nucleótidos contiguos de la misma.

- 20 En una realización, el antagomir de acuerdo con la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de la SEC ID NO: 59 o 60 de por lo menos 14 nucleótidos contiguos de la misma.

En una realización, el antagomir de acuerdo con la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de la SEC ID NO: 59 o 60 de por lo menos 15 nucleótidos contiguos de la misma.

- 25 En otra realización, el dicho antagomir de la secuencia de SEC ID No. 59 o 60 presenta por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos modificados por enlace o enlaces de fosfotioato entre nucleótidos adyacentes.

En otra realización de la invención, el dicho antagomir puede incluir el nucleótido modificado 2'-O-metilo, un grupo colesterol o cualquier modificación similar o equivalente.

- 30 En general, si una formulación farmacéutica que contiene un ácido nucleico, un péptido y una proteína se administra por vía oral o parenteral, se degrada por enzimas en el cuerpo, y la eficacia de la formulación farmacéutica desaparece rápidamente. Se han realizado diversas pruebas para resolver el problema. Una de las cuales es formular un inyectable de liberación sostenida prolongada.

- 35 En la práctica, se está llevando a cabo investigación sobre el uso de endoprótesis como un sistema para la administración selectiva de microARNs. Sin embargo, la rápida endotelización de las endoprótesis podría plantear un problema con respecto a la liberación sostenida de microARNs, especialmente para los procesos biológicos que requieren la modulación génica prolongada. Además, los liposomas y nanopartículas se han desarrollado y usado in vivo, pero no se ha evitado el paso al sistema circulatorio con el riesgo de efectos secundarios graves. Además, ningún estudio ha demostrado eficacia y seguridad después de la administración intracoronaria percutánea sin pinzamiento aórtico anterior.

Otro aspecto de la invención se basa en el uso de microesferas biodegradables y biocompatibles.

- 40 De acuerdo con la invención, se ha diseñado y fabricado un sistema de liberación adecuado para la liberación localizada de oligonucleótidos en la región cardíaca, con base en la microencapsulamiento de tales oligonucleótidos con polímeros biodegradables biocompatibles. La invención permite obtener microesferas sustancialmente cargadas con oligonucleótidos, que tienen alta eficiencia de encapsulamiento y ninguna modificación/degradación molecular.
- 45 De acuerdo con la invención, se conserva la pureza y la calidad de la molécula, sin añadir un agente estabilizante o una sustancia de retención, gracias a las condiciones de fabricación usadas, en particular las características de la emulsión creada, la concentración de la disolución polimérica y la relación entre los volúmenes de las fases que intervienen en el proceso de microencapsulamiento. Además, las microesferas tienen una distribución de tamaño de partículas adecuada para que puedan ser retenidas en los microvasos de la zona infartada sin causar embolia arterial y sin ser destruidas por la acción fagocítica de los macrófagos.

- 50 Un objetivo de la presente invención es proporcionar una microesfera de liberación sostenida, que encapsula de forma estable un ácido desoxirribonucleico de cadena corta o un ácido ribonucleico de cadena corta, y es capaz de

inhibir, durante un largo período, la inhibición de la expresión de una proteína específica, especialmente una proteína cuya inhibición está relacionada con una enfermedad.

5 En términos generales, "biocompatible" significa compatible con células vivas, tejidos, órganos o sistemas, y que no supone un riesgo de lesiones, toxicidad, o el rechazo por el sistema inmune. Una microesfera biocompatible significa que la microesfera, y cualquier producto de degradación de la microesfera, no es tóxica para el receptor y tampoco presenta efectos nocivos o adversos significativos en el cuerpo del receptor, tal como una reacción inmunológica en el sitio de inyección.

En términos generales, "biodegradable" significa capaz de ser descompuesto por la acción de agentes biológicos.

10 Una microesfera biodegradable, tal como se define en la presente, significa que la microesfera se degradará o erosionará in vivo para formar especies químicas más pequeñas. La degradación puede resultar, por ejemplo, por procesos enzimáticos, químicos y/o físicos.

15 Los polímeros biodegradables, biocompatibles adecuados incluyen, por ejemplo, poli(lactida)s, poli(glicolida), poli(lactida-co-glicolida), poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona, policarbonatos, poliesteramidas, polianhídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poliacetilos, policianoacrilatos, polieterésteres, poli(dioxanona), poli(alquilato de alquileo), copolímeros de polietilenglicol y poliortoéster, poliuretanos biodegradables, mezclas y copolímeros de los mismos.

Un número de técnicas para producir micropartículas se han descrito en la técnica anterior.

20 El perfil de liberación del fármaco para una micropartícula depende de numerosos factores, que incluyen las propiedades fisicoquímicas de los polímeros usados, las interacciones entre polímero-fármaco-excipiente y/o morfología y la composición de las micropartículas resultantes.

25 Para que las microesferas sean retenidas por los capilares del miocardio deben tener una distribución de tamaño muy específica de manera que se minimice su destrucción a través de la fagocitosis por los macrófagos, por un lado, o la embolia de las arterias, por otro lado; el microencapsulamiento usando un polímero biodegradable, biocompatible permite la liberación controlada del producto desde las horas iniciales durante un máximo de 2-3 semanas, el principal período durante el cual se produce la remodelación ventricular post-AMI.

En el contexto de la presente invención, ya que se prefiere la vía intracoronaria, el tamaño promedio de estas microesferas tiene en cuenta el tamaño de los capilares del miocardio; éste varía entre 5 y 15 micrómetros, a retener en la región cardíaca, y sin partículas superiores a 25 micrómetros para prevenir la embolia arterial.

En una realización de la invención, estas microesferas presentan un diámetro que no excede 25  $\mu\text{m}$ .

30 En una realización, 50 a 100% de las microesferas están comprendidas en el intervalo de 5 a 25  $\mu\text{m}$ , y no hay partículas superiores a 25  $\mu\text{m}$ .

En una realización preferida, de 60 a 100% de las microesferas están comprendidas en el intervalo de 5 a 25  $\mu\text{m}$ , y no hay partículas superiores a 25  $\mu\text{m}$ .

35 En otra realización preferida, de 70 a 100% de las microesferas están comprendidas en el intervalo de 5 a 25  $\mu\text{m}$ , y no hay partículas superiores a 25  $\mu\text{m}$ .

En una realización más preferida, de 80 a 100% de las microesferas están comprendidas en el intervalo de 5 a 25  $\mu\text{m}$ , y no hay partículas superiores a 25  $\mu\text{m}$ .

De acuerdo con la invención, el diámetro promedio de las microesferas está en el intervalo de 5 a 15  $\mu\text{m}$ .

En una realización alternativa, estas microesferas presentan un diámetro promedio de 8 a 11  $\mu\text{m}$ .

40 Las microesferas de acuerdo con la invención cargan una alta cantidad del dicho inhibidor de microARN en un polímero biodegradable y biocompatible para la liberación sostenida del fármaco en el área infartada.

La carga de inhibidor de microARN es de aproximadamente 1 a 20% (p/p), de preferencia de 1 a 15% (p/p), y más preferentemente de 1 a 10 y aún más preferentemente de 5 a 10%. Se conserva la integridad del fármaco.

En una realización, las microesferas de acuerdo con la invención se incorporan de 1% a 15% p/p de inhibidor.

45 En otra realización, las microesferas de acuerdo con la invención, se incorporan de 5% a 15% p/p de inhibidor.

Todavía en otra realización, las microesferas de acuerdo con la invención, se incorporan de 1% a 10%, de preferencia de 5% a 10% p/p de inhibidor.

Otra característica de la invención se refiere a la naturaleza del polímero usado para la generación de las microesferas.

5 En una realización de la invención, estas microesferas están hechas de un polímero que consiste en poli-d,l-lactida (PLA). En una realización, las dichas microesferas se elaboran de PLA como el único polímero. En una realización, estas microesferas se elaboran de PLA que se mezcla con uno o más de otros polímeros biocompatibles.

En otra realización de la invención, estas microesferas están hechas de un copolímero que consiste en poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA). En una realización, estas microesferas están hechas de PLGA como el único polímero. En una realización, estas microesferas se elaboran de PLGA que se mezcla con uno o más de otros polímeros biocompatibles.

10 En aún otra realización de la invención, estas microesferas están hechas de una mezcla de polímeros que consiste en poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA) y poli-d,l-lactida (PLA).

Por la expresión "mezcla", debe entenderse que una mezcla de dos o más polímeros se realiza antes de la disolución de esta mezcla en el mismo disolvente orgánico.

15 El experto en la técnica comprenderá fácilmente que, contrariamente al copolímero de PLGA, la proporción de lactida:glicolida en el polímero PLA está comprendida entre la relación molar de 100:0.

Con respecto al copolímero de PLGA, la proporción de lactida:glicolida en el polímero de PLGA está comprendida en una relación molar de 50:50 a 95:5.

En una realización preferida, la relación de lactida:glicolida en el copolímero de PLGA está comprendida en una relación molar de 50:50 a 90:10, y de preferencia en una relación molar de 50:50 a 80:20.

20 En una realización de la invención, la viscosidad inherente del polímero está comprendida entre 0,1 y 0,7 dl/g.

En una realización preferida, la viscosidad inherente del polímero está comprendida entre 0,15 y 0,7 dl/g, de preferencia 0,15 a 0,5 dl/g.

Este aspecto es de interés en el sentido de que la viscosidad inherente está relacionada con el peso molecular del polímero y, por lo tanto, influye en la velocidad de liberación de inhibidor de las microesferas poliméricas.

25 Por consiguiente, se describe en la presente un método para producir un inhibidor microencapsulado de miR-92a que no incluye ningún adyuvante y que consiste en una sola población de partículas en términos de la composición polimérica.

30 Por lo tanto, también se describe en la presente un método para microencapsular un inhibidor de microARN en microesferas poliméricas, que comprende: (a) disolver el inhibidor de microARN en agua purificada, sin ningún estabilizante, (b) disolver el polímero en un disolvente orgánico; (c) añadir (a) a (b) para producir una primera emulsión; (d) añadir la emulsión de la etapa (c) a una disolución acuosa que contiene un tensioactivo y un agente osmótico para producir una segunda emulsión; (e) endurecer y cosechar las microesferas resultantes de la etapa (d); y (f) secar.

35 Más particularmente, se describe en la presente un método para producir una composición como la descrita anteriormente, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

a) disolver el inhibidor de miARN en agua purificada, sin ningún estabilizante;

b) disolver el polímero en un disolvente orgánico;

c) añadir (a) a (b) para producir una primera emulsión;

40 d) añadir la emulsión de la etapa (c) a una disolución acuosa que contiene un tensioactivo y un agente osmótico para producir una segunda emulsión; y

e) endurecer y cosechar las microesferas resultantes de la etapa (d); y

f) secar las microesferas obtenidas.

Otro aspecto de la invención consiste en el uso de la composición de acuerdo con la invención en el tratamiento de infarto de miocardio.

45 En otras palabras, la invención se refiere a una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un inhibidor de microARN, en la que dicho inhibidor se microencapsula en microesferas poliméricas biodegradables y biocompatibles, en la que por lo menos 50% de dichas microesferas presentan un diámetro comprendido entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ , y en la que el dicho por lo menos un inhibidor consiste en un oligonucleótido antisentido dirigido a o que es complementario a miR-92a, para uso en el tratamiento de infarto de miocardio.

En una realización preferida, el dicho infarto de miocardio consiste en el infarto agudo de miocardio.

La invención también se refiere a una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un inhibidor de microARN, en la que el inhibidor se microencapsula en microesferas poliméricas biodegradables y biocompatibles, en el que por lo menos 50% de dichas microesferas presentan un diámetro comprendido entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ , y en el que el dicho por lo menos un inhibidor consiste en un oligonucleótido antisentido dirigido a o que es complementario a miR-92a, para uso en un método para revertir o prevenir la remodelación ventricular en un sujeto que lo necesite.

De este modo, la invención también se refiere a una composición como se define anteriormente para revertir o prevenir la remodelación ventricular en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de dicha composición.

Como ya se ha mencionado, la composición de acuerdo con la invención es adecuada para una administración por vía intracoronaria.

Para la administración por vía intracoronaria, las microesferas deben suspenderse en un vehículo apropiado, ya sea una disolución salina (PBS) con o sin un tensioactivo o en otro vehículo apropiado para la administración intravenosa. Los dispersantes adecuados incluyen, por ejemplo, tensioactivos tales como polisorbato 80, polisorbato 20, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 60, carboximetilcelulosa, o polisacáridos tales como alginato de sodio; también es posible añadir un agente isotonicante, tal como, por ejemplo, cloruro de sodio, manitol, sorbitol o glucosa. Dado el tamaño de las arterias coronarias, la concentración de microesferas en el medio de administración se ajusta con el fin de limitar la alteración del flujo sanguíneo y prevenir el riesgo de embolia arterial. Esta concentración puede variar entre 0,05% y 1%, de preferencia entre 0,1% y 0,5%. La administración puede ser por una sola inyección o inyecciones repetidas, seguido opcionalmente por una inyección de disolución salina. La administración puede llevarse a cabo después de la angioplastia coronaria percutánea, sin limitación, usando el mismo catéter.

El método de la invención se caracteriza por que dicha administración consiste en una administración por vía intracoronaria.

Este aspecto es de particular interés ya que aborda varias limitaciones presupuestas de la administración intravenosa directa de compuestos, tal como el oligonucleótido como antagomir. Entre otras limitaciones presupuestas, se puede mencionar i) la bioseguridad de nivel bajo debido a la ubicuidad y la baja especificidad de órganos de miARNs, ii) las dosis altas e inyecciones repetidas para que el inhibidor de microARN produzca su efecto, y iii) alto coste teórico de la dosis intravenosa calculada.

Sorprendentemente, como será evidente después de la lectura de los siguientes ejemplos, todos estos aspectos se abordan por la invención.

Más particularmente, se demuestra que:

a) es posible administrar selectivamente el antagomir encapsulado en la arteria que irriga el tejido enfermo (véase el Ejemplo 5);

b) las microesferas se retienen en la coronaria (véase el Ejemplo 6);

c) la administración intra-arterial de microesferas se usa para la embolia del tumor, lo que permite la interrupción del flujo sanguíneo permanente y la prevención de la progresión del tumor, opcionalmente en combinación con sustancias activas de liberación. Teniendo en cuenta estos elementos, se consideró la existencia del riesgo de embolia. Por esta razón, se diseñaron estudios con el objetivo de comprobar que las microesferas no causaran ningún daño al músculo cardíaco o produjeran alteraciones significativas en la tasa de flujo coronario (véase el Ejemplo 7);

d) buena estabilidad del inhibidor de microARN en el vehículo y la liberación sostenida de dicho inhibidor desde las microesferas; esto se demuestra por su efecto biológico mientras se inhibe microARN durante un tiempo de hasta 10 días después de que se administra (Ejemplo 8);

e) la administración de microesferas con el inhibidor de miARN promueve la recuperación contráctil del tejido dañado y evita la aparición de remodelación adversa post-infarto (véase el Ejemplo 9);

f) con la administración localizada de microesferas, la dosis de inhibidor podría reducirse a una sola inyección, lo que supone una reducción significativa de los efectos secundarios potenciales y una clara reducción en el coste.

La disponibilidad de un vehículo/sistema apropiado para la administración controlada, el suministro y liberación de inhibidores de microARN, de acuerdo con la invención tiene las siguientes ventajas:

- bioseguridad mejorada, dado que está limitada la bio-distribución del fármaco por los tejidos y órganos que no son la diana del tratamiento
  - evita inyecciones intravenosas repetidas i) reduce los ingresos hospitalarios y las visitas al hospital para pacientes externos, mejorando la calidad de apoyo al paciente, ii) evita la necesidad de mantenimiento prolongado para la administración de fármacos, así como los riesgos potenciales como resultado de esto, y iii) minimiza los riesgos inherentes a la administración intravenosa de productos (infecciones, reacciones localizadas...)
- 5
- la reducción de la dosis permite la reducción de los efectos adversos relacionados dependientes de la dosis
  - reducción de los costes debido a una reducción en la dosis requerida, así como el personal y los equipos necesarios para inyecciones repetidas.
- 10
- En otra realización, la invención se refiere a una población de microesferas biodegradables y biocompatibles para el uso en el tratamiento o la prevención de la remodelación ventricular tras un infarto de miocardio, en donde tales microesferas:
- tienen un diámetro promedio comprendido entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ ;
  - se elaboran de poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA); poli-d,l-lactida (PLA) o una mezcla de los mismos;
- 15
- se incorporan de 1% a 15% p/p de un agente terapéutico capaz de prevenir la remodelación ventricular, que incluye de 1% a 10% p/p de dicho agente terapéutico;
- en las que dicho agente terapéutico consiste en un inhibidor de un microARN que consiste en miR-92a, en las que dicho inhibidor de microARN es preferentemente un antagomir.
- 20
- La invención también se refiere a un kit que comprende por lo menos: i) una composición y/o microesferas de acuerdo con la invención y ii) una jeringuilla o vial o ampolla en la que se dispone la composición.
- En una realización, el kit de la invención además comprende un disolvente dispuesto en un recipiente de disolvente. El recipiente del disolvente puede ser un vial, una ampolla o una jeringuilla llenada previamente.
- Las microesferas y el disolvente pueden estar dispuestos en una jeringuilla llenada previamente de compartimiento doble.
- 25
- En una realización, el kit de la invención puede comprender las microesferas en un vial y el disolvente en un vial separado.
- En una realización, el kit de la invención puede comprender las microesferas en un vial y el disolvente en una ampolla separada.
- 30
- En una realización, el kit de la invención puede comprender las microesferas en un vial y el disolvente en una jeringuilla llenada previamente.
- En una realización, el kit de la invención puede comprender las microesferas en una jeringuilla llenada previamente y el disolvente en un vial separado.
- En una realización, el kit de la invención puede comprender las microesferas en una jeringuilla llenada previamente y el disolvente en una ampolla separada.
- 35
- En una realización, el kit de la invención puede comprender las microesferas y el disolvente separadamente en una jeringuilla de compartimiento doble.

La invención se entenderá mejor con respecto a los siguientes ejemplos.

#### **Ejemplo 1: Preparación de microesferas cargadas con antagomir-92a**

- 40
- Las microesferas se prepararon mediante un método de evaporación de emulsión w/o/w /disolvente usando un copolímero de PLGA 50:50, viscosidad intrínseca de aproximadamente 0,2 dl/g, que contiene grupos carboxilo terminales libres. Se añadieron 3 ml de cloruro de metileno a 0,6 g de PLGA. Se añadieron 0,3 ml de una disolución concentrada de antagomir-92a (I-Ssc-miR-92a; masa molecular: 5366 g/mol; secuencia: CCGGGACAAGTGCAAT; Bases de ADN: 9; Bases de LNA: 7; fabricante: IDT (Exiqon)) (222 mg/ml) en agua purificada a la disolución orgánica de PLGA, y se emulsionó mediante ultrasonidos durante 20 s. Esta emulsión primaria se añadió a una fase
- 45
- externa que consiste en una disolución acuosa de 1% (p/v) de alcohol polivinílico y 1% (p/v) de cloruro de sodio, y se homogeneizó durante 60 s a aproximadamente 10300 rpm. La segunda emulsión (w/o/w) obtenida se añadió a un volumen de agua purificada, y el cloruro de metileno se dejó evaporar por agitación. Las microesferas obtenidas se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con agua purificada, y luego se liofilizaron. El diámetro promedio



de las microesferas fue de 9  $\mu\text{m}$  (82% entre 5-25  $\mu\text{m}$  y 0% por encima de 25  $\mu\text{m}$ ) mientras que la eficiencia de encapsulamiento fue de 74%.

Una imagen de las microesferas obtenidas se representa en la Figura 1.

La Figura 2 ilustra la distribución del tamaño de las microesferas.

#### 5 **Ejemplo 2: Preparación de microesferas cargadas con ARN**

Las microesferas se prepararon mediante un método de evaporación de emulsión w/o/w /disolvente usando un copolímero de PLGA 50:50, viscosidad intrínseca de aproximadamente 0,2 dl/g, que contiene grupos carboxilo terminales libres. Se añadieron 3 ml de cloruro de metileno a 0,6 g de PLGA. Se añadieron 0,3 ml de una disolución concentrada de ARN (222 mg/ml) (RNA Sigma 5000-10000 Da) en agua purificada libre de ARNasa a la disolución orgánica de PLGA y se emulsionó por ultrasonidos durante 20 s. Esta emulsión primaria se añadió a una fase externa que consiste en una disolución acuosa libre de ARNasa de 1% (p/v) de alcohol polivinílico y 5% (p/v) de manitol, y se homogeneizó durante 60 s a aproximadamente 10300 rpm. La segunda emulsión (w/o/w) obtenida se añadió a un volumen de agua purificada libre de ARNasa, y el cloruro de metileno se dejó evaporar por agitación. Las microesferas obtenidas se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con agua purificada libre de ARNasa, y luego se liofilizaron. El diámetro promedio de las microesferas fue 10  $\mu\text{m}$ , (86% entre 5-25  $\mu\text{m}$  y 0% por encima de 25  $\mu\text{m}$ ) mientras que la eficiencia de encapsulamiento fue de 73%.

#### **Ejemplo 3: Preparación de microesferas de placebo**

Las microesferas se prepararon mediante un método de evaporación de emulsión w/o/w /disolvente usando un copolímero de PLGA 50:50, la viscosidad intrínseca de aproximadamente 0,2 dl/g, que contiene grupos carboxilo terminales libres. Se añadieron 3 ml de cloruro de metileno a 0,6 g de PLGA. Se añadieron 0,3 ml de agua purificada a la disolución orgánica de PLGA y se emulsionó mediante ultrasonidos durante 20 s. Esta emulsión primaria se añadió a una fase externa que consiste en una disolución acuosa de 1% (p/v) de alcohol polivinílico y 1% (p/v) de cloruro de sodio, y se homogeneizó durante 60 s a aproximadamente 10.300 rpm. La segunda emulsión (w/o/w) obtenida se añadió a un volumen de agua purificada, y el cloruro de metileno se dejó evaporar por agitación. Las microesferas obtenidas se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con agua purificada, y luego se liofilizaron. El diámetro promedio de las microesferas fue 7  $\mu\text{m}$  (84% entre 5-25  $\mu\text{m}$  y 0% por encima de 25  $\mu\text{m}$ ).

#### **Ejemplo 4: Preparación de microesferas cargadas con albúmina marcada con isotiocianato de fluoresceína**

Las microesferas se prepararon mediante un método de evaporación de emulsión w/o/w /disolvente usando un copolímero de PLGA 50:50, viscosidad intrínseca de aproximadamente 0,2 dl/g, que contiene grupos carboxilo terminales libres. Se añadió 1 ml de cloruro de metileno a 0,2 g de PLGA. Se añadieron 0,1 ml de una disolución acuosa de albúmina marcada con isotiocianato de fluoresceína (20 mg/ml) a la disolución orgánica de PLGA y se emulsionó mediante ultrasonidos durante 15 s. Esta emulsión primaria se añadió a una fase externa que consiste en una disolución acuosa de 1% (p/v) de alcohol polivinílico y 1% (p/v), y se homogeneizó durante 60 s a aproximadamente 10300 rpm. La segunda emulsión (w/o/w) obtenida se añadió a un volumen de agua purificada, y el cloruro de metileno se dejó evaporar por agitación. Las microesferas obtenidas se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con agua purificada, y luego se liofilizaron. El diámetro promedio de las microesferas fue 9  $\mu\text{m}$  (91% entre 5-25  $\mu\text{m}$  y 0% por encima de 25  $\mu\text{m}$ ).

#### **Ejemplo 5: Estudio de la administración selectiva en la arteria que irriga el tejido diana**

Después provocar un AMI en un cerdo Large White, 30 mg de microesferas que contienen albúmina fluorescente, preparadas como se indica en el Ejemplo 4, se administraron por vía intra-coronaria, por medio de un balón coaxial de 2,5/12 colocado en la arteria responsable del AMI, que irriga la zona infartada. Las microesferas se suspendieron *in situ* en 10 ml de disolución salina normal que contiene Tween-80; la administración se realizó en 2 inyecciones consecutivas de 5 ml, cada una seguida de 5 ml de disolución salina normal. Los experimentos mostraron que el antagonista encapsulado se puede administrar de forma selectiva en la arteria que irriga el tejido enfermo.

#### 45 **Ejemplo 6: Estudio de retención de las microesferas en los capilares del tejido enfermo sin permitir el flujo de salida al torrente sanguíneo**

En un modelo de cerdo, se llevaron a cabo 4 experimentos mediante la administración por vía intra-coronaria a través de un balón coaxial colocado en la rama descendente anterior medial, 2 inyecciones con 5 ml cada una de microesferas fluorescentes preparadas de acuerdo con el ejemplo 4. Los 4 animales se sacrificaron y se obtuvieron las muestras miocárdicas del tejido contiguo a la rama descendente anterior y el tejido de control irrigado por otras arterias coronarias. Las muestras se observaron a través de un microscopio de fluorescencia óptica y se demostró la presencia de microesferas retenidas en los capilares del músculo cardíaco dañado, así como su ausencia en el tejido de control.

Para descartar la biodistribución sistémica, en dos de los animales anteriores, además del tejido del miocardio isquémico y de control, se obtuvieron muestras 5 de réplicas de pulmón, bazo e hígado y se visualizaron por

microscopía óptica con luz B. La fluorescencia se detectó exclusivamente en la pared del miocardio anterior. Este análisis reveló que las microesferas quedan retenidas en el corazón evitando la liberación sistémica de antagomir 92a (reducción de efectos secundarios).

#### 5 **Ejemplo 7: Estudio de retención de microesferas en los capilares del tejido enfermo sin dañar el propio tejido diana**

Se llevaron a cabo experimentos para investigar la toxicidad cardíaca local potencial y el intervalo de seguridad terapéutica de la dosis. Para detectar el daño isquémico local al músculo cardíaco, se emplearon 2 pares de cristales piezoeléctricos, los cuales son altamente sensibles en su capacidad para detectar la isquemia. Cuando el tejido muscular cardíaco es afectado por isquemia, el tejido restante se convierte en discinético y se hincha; esto, junto con la presión sanguínea producida por el tejido sano contiguo restante, provoca que los microcristales se separen y se muevan más lejos el uno del otro. En dos cerdos, después de realizar una toracotomía y una pericardiectomía, se insertaron dos pares de microcristales, un par de control en la región lateral y un par en la región anterior suministrada por la rama descendente anterior, a través de la cual se administraron las microesferas. Para cada par de cristales de tamaño medio, se midió la distancia entre ellos en dos puntos durante el ciclo cardíaco: la diástole final (EDL) y la sístole final (ESL). La relación entre EDL y ESL se expresa por el parámetro SS (acortamiento sistólico: (EDL-ESL)/EDL. Cuando la contracción ventricular izquierda se disipa completamente EDL = ESL y SS = 0. Los valores normales oscilan entre  $0,2 \pm 0,1$ . Como se muestra en la ilustración adjunta, las oscilaciones mínimas y transitorias después de cada inyección que duran unos pocos segundos, se indujeron con la dosis del estudio, que corresponde a la primera y segunda inyecciones. Además y sorprendentemente, no se observaron efectos secundarios locales con inyecciones intracoronarias repetidas de microesferas fluorescentes preparadas de acuerdo con el ejemplo 4, alcanzando 14 veces la dosis del estudio. No se asoció una dosis máxima limitante con el daño isquémico irreversible, repercusión hemodinámica o arritmias.

Además, para detectar cambios en el flujo coronario, se colocó un sensor de flujo en el centro de la LAD que mide el flujo coronario. No se observaron cambios significativos en el flujo coronario después de las inyecciones intracoronarias.

Los resultados se ilustran en la Figura 3, en la que se inyectaron 120 mg de microesferas, y en la Figura 4, en la que se inyectaron 240 mg de microesferas.

#### 30 **Ejemplo 8: Estudio del efecto molecular de una sola inyección intracoronaria de microesferas con una dosis pequeña de antagomir**

Para demostrar que pequeñas dosis de antagomir microencapsulado podrían producir una respuesta molecular, la expresión de miR-92a in vivo, en el tejido isquémico y de control, se midió después de la administración intracoronaria de antagomir-92a encapsulado. En 3 cerdos, se suministraron en LAD 60 mg de microesferas que contienen antagomir-92a preparadas de acuerdo con el ejemplo 1 (0,1 mg/kg). Los animales se sacrificaron a uno, tres y 10 días después del tratamiento y se cuantificó la expresión de miR-92a y microARN endógeno como controles (miR-123, 203 y 126) en muestras de 2 réplicas de control e infartado por aislamiento de ARN total y RT-PCT cuantitativo en tiempo real usando cebadores específicos (véase la Figura 5).

En el tejido infartado, la expresión de miR-92a resultó disminuída en 8 veces en comparación con el tejido de control, mientras que la expresión de miRs endógenos no se vio afectada por el tratamiento. La inhibición comenzó a estar presente tan pronto como 1 día y todavía estuvo presente en el día 10, con niveles de expresión 5 veces menores que en el área de control.

No se detectó una regulación significativa en miRs endógenos. Estos resultados revelan que el vehículo/sistema proporciona las condiciones adecuadas para permitir el suministro y liberación controlados de antagomir-92a, produciendo así una inhibición sostenida de microARN-92a con una sola administración intracoronaria.

Estos resultados, representados en las Figura 6, también confirman que el antagomir no se degrada durante el proceso de fabricación de microesferas.

#### 45 **Ejemplo 9: Estudio del efecto biológico de una sola inyección intracoronaria de microesferas que contienen bajas dosis de antagomir**

Para demostrar si el efecto molecular del antagomir-92a transportado por microesferas está acompañado por un efecto biológico, se llevó a cabo un estudio pre-clínico con 26 cerdos enanos adultos. El propósito de este estudio fue investigar si la inhibición de mir-92a por la administración selectiva intracoronaria de antagomir-92a encapsulado, conduce a mejorar la angiogénesis en el área infartada, y, de esta manera, evita la aparición del remodelado ventricular.

Se administraron 3 formulaciones:

- disolución salina (formulación de control)

- microesferas de placebo preparadas de acuerdo con el Ejemplo 3

- microesferas de antagomir-92A preparadas de acuerdo con el ejemplo 1, en una dosis de antagomir de 3 mg/cerdo enano.

5 4 semanas después del tratamiento, se detectó una densidad vascular significativa mayor en la zona necrótica en los animales que recibieron antagomir-92a encapsulado en comparación con los controles, confirmando de ese modo la actividad proangiogénica de antagomir-92a observada en el estudio anterior ( $161,57 \pm 58,71$  frente a  $68,49 \pm 23,56$  en el grupo de placebo frente a  $73,91 \pm 24,97$  en el grupo de disolución salina,  $p = 0,001$ ) ii) la densidad vascular (véase la Figura 7).

10 La microvascularidad aumentó tanto dentro de la zona del infarto como del borde peri-infarto. Se demostró consistentemente un menor índice de resistencia microvascular en los animales tratados ( $200,67 \pm 104,46$  frente a  $511,73 \pm 202,1$  en los controles,  $p = 0,007$ ) y se correlacionó significativamente con la densidad vascular ( $R^2 0,41$ ,  $p = 0,02$ ). (Véase la Figura 8).

Estos datos indican que el antagomir-92a encapsulado induce la angiogénesis sostenida in vivo.

15 Habiendo encontrado el crecimiento de los vasos sanguíneos, por lo tanto, se investigaron adicionalmente por lo tanto sus beneficios potenciales en el proceso de curación que se presenta después de un AMI. Para determinar los efectos de antagomir-92a encapsulado en la remodelación ventricular, se compararon los parámetros morfológicos y estructurales mediante formación de imágenes de resonancia magnética ex vivo (CMR) y los parámetros funcionales analizados por ecocardiografía intravascular (IVE), en los grupos tratados y no tratados. Estuvo presente un porcentaje más significativo de animales con discinesia anterior y septoapical en IVE en los controles ( $p = 0,03$ ) (véase principalmente la Figura 9), con también un adelgazamiento significativo mayor de la pared ventricular lesionada y cambios adversos en la morfometría de remodelación en el ventrículo izquierdo en CMR ex-vivo en comparación con los animales tratados (Tabla 3).

25 Más particularmente, la Figura 9 ilustra los resultados del análisis de la disfunción del movimiento de la pared regional por ecocardiografía intravascular (IVE). IVE se realizó mediante el uso de una máquina de formación de imágenes de ultrasonido Q Vivid (GE Healthcare, Belford, UK) y un catéter de ultrasonido AcuNav 10F (Siemens) colocado en el ápice del ventrículo derecho.

Los resultados del estudio muestran que la administración de microesferas de antagomir-92a se asocia con una reducción estadísticamente significativa en el remodelado adverso después de un infarto de miocardio agudo.

Tabla 3: Parámetros de la remodelación ventricular izquierda en la CMR

	Disolución salina (N=6)	ME de placebo (N=5)	ME de antagomir-92a (N=6)	P
Número de cortes de CMR infartados	4,8±0,3	4,8±0,4	5,3±0,2	0,38
T <sub>pared infartada max</sub> , mm	6,07±0,9	5,61±0,5	9,01±0,6	0,006
T <sub>pared posterior normal</sub> , mm	13,23±0,5	13,52±1,8	11,82±0,7	0,49
Porcentaje de adelgazamiento mínimo, %	54,79±4,9	56,74±4,1	22,71±5,5	0,000
T <sub>pared infartada min</sub> , mm	3,17±0,4	4,02±0,9	4,35±0,5	0,33
Porcentaje de adelgazamiento máximo, %	76,40±2,1 8	69,86±4,72	62,54±4,19	0,05
Longitud del adelgazamiento de la pared, mm	32,2±1,8	31,7±4	20,5±3,6	0,03
D <sub>R</sub> /D <sub>N</sub>	1,93±0,2	2,02±0,2	1,29±0,1	0,03
D <sub>N</sub> , mm	14,88±0,6 8	13,78±1,59	17,5±1,37	0,12
% de remodelación adverso (n)	83,3 (5)	80 (4)	16,7 (1)	0,03

30 El antagomir-92a encapsulado previene la remodelación ventricular izquierda adversa 1 mes después del infarto agudo del miocardio. Se determinaron los diferentes parámetros de remodelación calculados en todos los cortes infartados de CMR ex-vivo en cada cerdo enano. Se muestra el corte L2 representativo (siendo L1 el vértice) de los

cuatro cerdos enanos.  $T_{\text{pared infartada máx}}$  = grosor de pared infartada máximo medio calculado como  $\Sigma$  del grosor máximo de pared del infarto en cada corte dividido por el número de cortes afectados;  $T_{\text{pared posterior normal}}$  = grosor de la pared posterior normal medido justo al lado de la inserción del músculo papilar posterior calculado como  $\Sigma$  del grosor de la pared posterior en cada corte afectado dividido por el número de cortes afectados; porcentaje medio de adelgazamiento mínimo calculado como  $[100 - (T_{\text{pared infartada máx}}/T_{\text{pared posterior normal}} \times 100)]$ ;  $T_{\text{pared infartada mín}}$  = grosor mínimo medio de pared infartada calculado como  $\Sigma$  del grosor mínimo de la pared infartada en cada corte afectado dividido por el número de cortes afectados; porcentaje medio de adelgazamiento máximo calculado como  $[100 - (T_{\text{pared infartada mín}}/T_{\text{pared posterior normal}})] \times 100$ ;  $D_R$ : diámetro máximo medio entre la pared infartada y la pared normal contralateral calculado como  $\Sigma$  del diámetro máximo entre la pared infartada en cada corte infartado dividido por el número de cortes afectados;  $D_N$ : diámetro máximo medio entre las paredes normales, formando un ángulo recto con  $D_R$  y extraído más cerca del centro de la cavidad ventricular, calculado como  $\Sigma$  del diámetro máximo entre las paredes normales en cada corte infartado dividido por el número de cortes afectados;  $D_R/D_N$ : índice de esfericidad medio calculado como  $\Sigma$  de  $D_R/D_N$  de cada corte infartado dividido por el número de cortes afectados. Los datos de la tabla se expresan como la media  $\pm$  s.e.m.

15 Los resultados de una CMR representativa muestran que:

A: RMN cardíaca e IVE de 14 cerdos enanos (muerte inmediatamente después de la inducción del AMI): debido a la ocurrencia de la muerte inmediatamente después del AMI, no hubo tiempo suficiente para que el proceso de remodelación se activara. Esta es la razón de por qué se observó que un ventrículo izquierdo concéntrico tiene dimensiones similares en todos los segmentos.

20 B: RMN cardíaca e IVE del cerdo enano 20 a los 30 días post-AMI: evidencia de remodelado ventricular adverso: se observó un mes después del AMI, emaciación extrema de las secciones anterior y septal en la CMR, así como una formación de aneurismas con discinesia en el IVE, que es típico del remodelado adverso post-AMI.

25 C: RMN cardíaca e IVE del cerdo enano 22 a los 30 días post-AMI: ninguna remodelación ventricular: un mes después del AMI, se observó ligera reducción de la región parietal en las zonas anterior y septal sin formación de aneurismas y sin discinesia en el IVE. Este es un caso típico de las reacciones de reparación favorables después de AMI.

**Ejemplo 10: Estudio de la inducción de tumores vasculares o efectos en la mortalidad a corto plazo de antagomir-92a encapsulado**

30 No se observaron tumores vasculares en el análisis de la necropsia realizado a todos los animales, sugiriendo de ese modo la ausencia de supresión sistémica ectópica de microARN-92a en otros órganos a distancia. La mortalidad del estudio fue de 23%. No se observaron diferencias en la mortalidad a corto plazo. Solo murió un cerdo enano asignado a antagomir-92a encapsulado ( $p = 0,39$ ).

Tabla 4

N=26	Salina (n=9)	ME de placebo (n=9)	ME de antagomir-92a (n=8)
Seguimiento de 1 mes	6	7	7
Muerte	3	2	1

35

**Ejemplo 11: Estudio del perfil proarrítmico de antagomir-92a encapsulado.**

Con el fin de conocer el potencial arritmogénico de antagomir-92a encapsulado, todos los eventos arrítmicos durante los procedimientos se registraron y analizaron por el programa 5S Collect (GE). Además, para abordar esta cuestión, un grabador de bucle insertable se implantó de forma aleatoria en 10 de los 26 cerdos enanos del estudio para detectar episodios potenciales de arritmia hasta el sacrificio, en un mes post-infarto y tratamiento. No se observó un mayor número de taquiarritmias malignas ni bradiarritmias en el grupo tratado en comparación con los controles, lo que indica que el antagomir-92a intracoronario encapsulado no ejerce un efecto proarrítmico.

40

Tabla 5: Arritmias detectadas durante el estudio

	Disolución salina (n=9)	ME de placebo (n=9)	ME de antagomir-92a (n=8)	p
<i>Fase isquémica (n= 26)</i>				
Sin arritmias, n(%)	2 (22,2)	0	1 (12,5)	0,37

ES 2 606 636 T3

	Disolución salina (n=9)	ME de placebo (n=9)	ME de antagomir-92a (n=8)	p
Arritmias, n(%)	7 (77,8)	(100)	7 (87,5)	
PVC, n	5	7	5	
NSVT, n	0	1	1	
Fibrilación ventricular, n	3	3	3	
<i>Fase de reperfusión (n=26)</i>				
Sin arritmias, n(%)	5 (55,6)	3 (33,3)	3 (37,5)	0,6
Arritmias, n(%)	4 (44,4)	6 (66,7)	5 (62,5)	
Pausas sinusales, n	1	1	0	
Ritmo nodal, n	1	0	0	
IVR, n	0	2	1	
PVC, n	4	3	3	
NSVT, n	0	0	1	
<i>Durante 30 días después de AMI (n=10)</i>				
<i>Grabador de bucle implantable</i>	n=4	n=3	n=3	0,88
Sin arritmias, n(%)	0(0)	0(0)	0(0)	0,38
Arritmias, n(%)	2(50)	3 (100)	3 (100)	
Taquicardia sinusal	2	3	3	
Pausa sinusal	0	1	0	
PVC o PSVC	0	0	1	
No evaluable	2(50)	0	0	
PVC: complejos ventriculares prematuros, NSVT: taquicardia ventricular no sostenida, IVR: ritmo idioventricular, PSVC: complejos supraventriculares prematuros AMI: infarto agudo de miocardio				

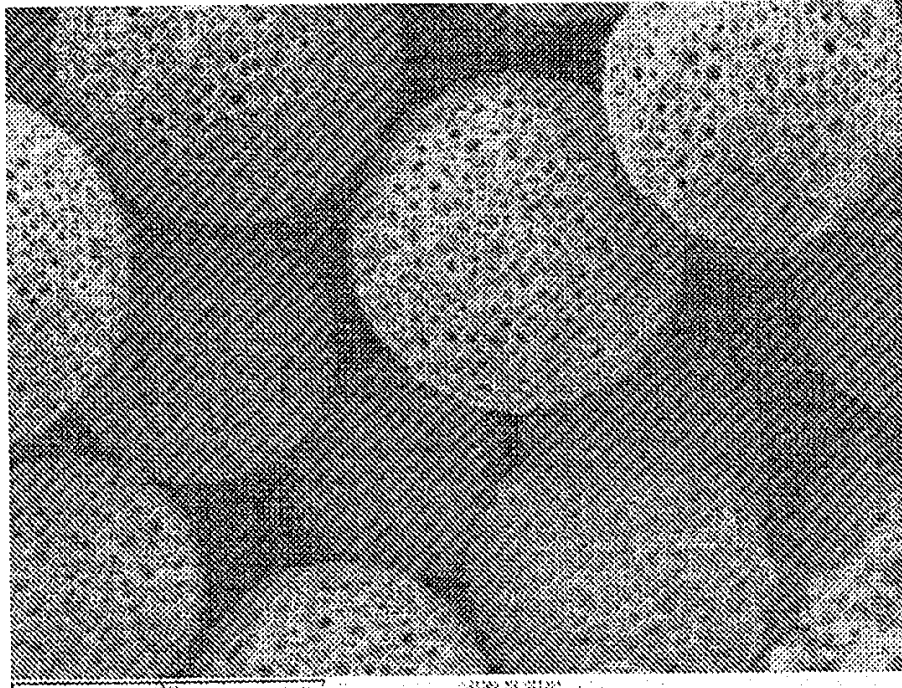
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un inhibidor de un miARN involucrado en la angiogénesis, en la que tal inhibidor se microencapsula en microesferas biodegradables y biocompatibles poliméricas, en la que por lo menos 50% de dichas microesferas presentan un diámetro comprendido entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ , y en la que el dicho por lo menos un inhibidor consiste en un oligonucleótido antisentido dirigido a o que es complementario a miR-92a.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho miARN consiste en el miR-92a maduro que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID No. 21, 22 o 23 o una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad de nucleótidos con una de las SEC ID No. 21, 22 o 23.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, en la que el dicho oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de 8-49 nucleótidos de longitud.
4. La composición de la reivindicación 1, el dicho oligonucleótido antisentido es por lo menos parcialmente complementario a la secuencia del miARN diana.
- 15 5. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho oligonucleótido antisentido se selecciona del grupo que consiste en un ribonucleótido, un desoxirribonucleótido, un antagomir, un LNA, un PNA, un oligonucleótido de morfolino, o una combinación de los mismos.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que que dicho oligonucleótido antisentido es un antagomir.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que dicho antagomir comprende una secuencia nucleotídica que comprende por lo menos 16 nucleótidos contiguos complementarios a los nucleótidos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID No. 1 y 2.
- 20 8. La composición de la reivindicación 7, en la que dicho antagomir comprende la secuencia de SEC ID No. 59 o 60 y las modificaciones que excluyen las sustituciones de bases de la misma, y fragmentos que consisten en las subsecuencias de SEC ID NO: 59 o 60 de por lo menos 8 nucleótidos contiguos de la misma.
9. La composición de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dichas microesferas presentan un diámetro que no excede 25  $\mu\text{m}$ .
- 25 10. La composición de las reivindicaciones 1 a 9, en la que las microesferas incorporan de 1% a 15% p/p de inhibidor.
11. La composición de las reivindicaciones 1 a 9, en la que las microesferas incorporan de 1% a 10% p/p de inhibidor.
- 30 12. La composición de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dichas microesferas se elaboran de un polímero que consiste en poli-d,l-lactida (PLA), siendo el dicho polímero opcionalmente mezclado con uno o más de otros polímeros.
13. La composición de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dichas microesferas se elaboran de un copolímero que consiste en poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA), siendo el polímero opcionalmente mezclado con uno o más de otros polímeros.
- 35 14. La composición de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dichas microesferas se elaboran de una mezcla de polímeros que consiste en poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA) y poli-d,l-lactida (PLA).
15. La composición de la reivindicación 13 o 14, en la que la relación de lactida:glicolida en el polímero de PLGA está comprendida entre una relación molar de 50:50 a 95:5.
- 40 16. La composición de las reivindicaciones 13 a 15, en la que la viscosidad inherente del polímero está comprendida entre 0,1 y 0,70 dl/g.
17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso en el tratamiento de infarto de miocardio.
- 45 18. La composición de la reivindicación para uso según la reivindicación 17, en la que dicho infarto de miocardio consiste en infarto agudo de miocardio.
19. La composición de las reivindicaciones 1 a 18 para uso en la reversión o prevención del remodelado ventricular en un sujeto que lo necesite.
20. Una población de microesferas biodegradables y biocompatibles, para uso en el tratamiento o prevención de infarto de miocardio, en la que tales microesferas:

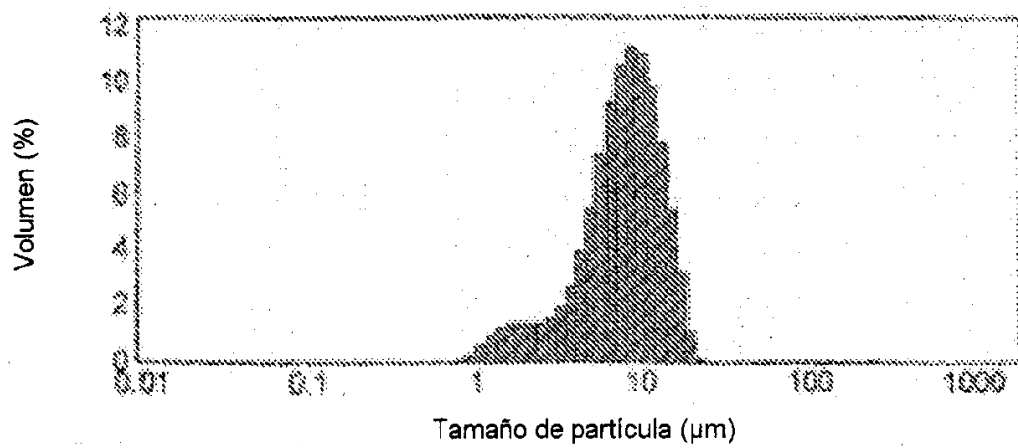
- tienen un diámetro promedio comprendido entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ ;
- se elaboran de poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA); poli-d,l-lactida (PLA) o una mezcla de los mismos;
- incorporan de 1% a 15% p/p de un agente terapéutico capaz de prevenir el remodelado ventricular,

en las que el agente terapéutico consiste en un inhibidor antisentido de un miARN que consiste en miR-92a.

- 5 21. Las microesferas para uso según la reivindicación 20, en las que dicho inhibidor es un antagomir.
22. Un kit que comprende por lo menos i) una composición según la reivindicación 1 a 16 y/o microesferas según las reivindicaciones 20 o 21, y ii) una jeringuilla o vial o ampolla en la que se coloca la composición.
23. El kit de la reivindicación 22, que comprende además un disolvente colocado en un recipiente para disolvente.



**Figura 1**



**Figura 2**



Administración de microesferas de albúmina: 15 mg x 6 + 30 mg x 1 + SF 10 ml + SF 20 ml + Isc 5 min./Rep 10 min

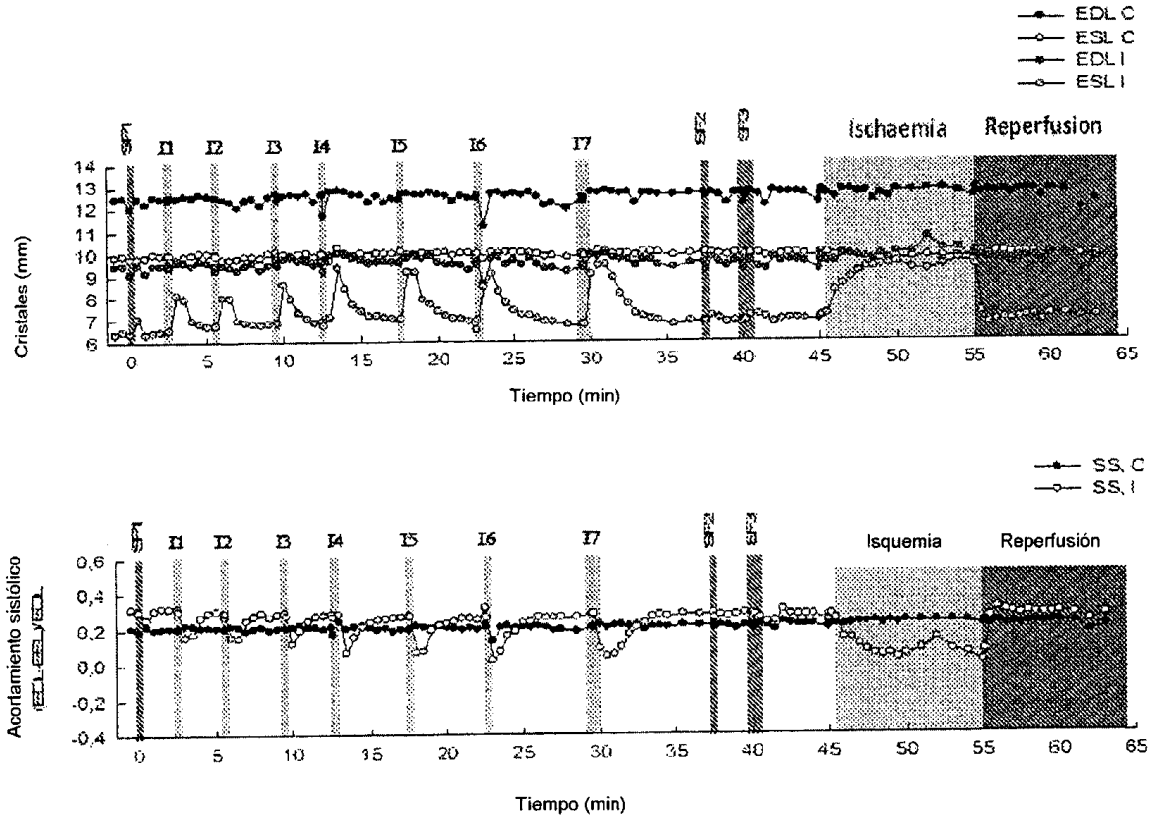


Figura 3

Administración de microesferas de albúmina: SF 10 ml + 15 mg x 6 + 30 mg x 2 + 15 mg x 4 + 30 mg x 1

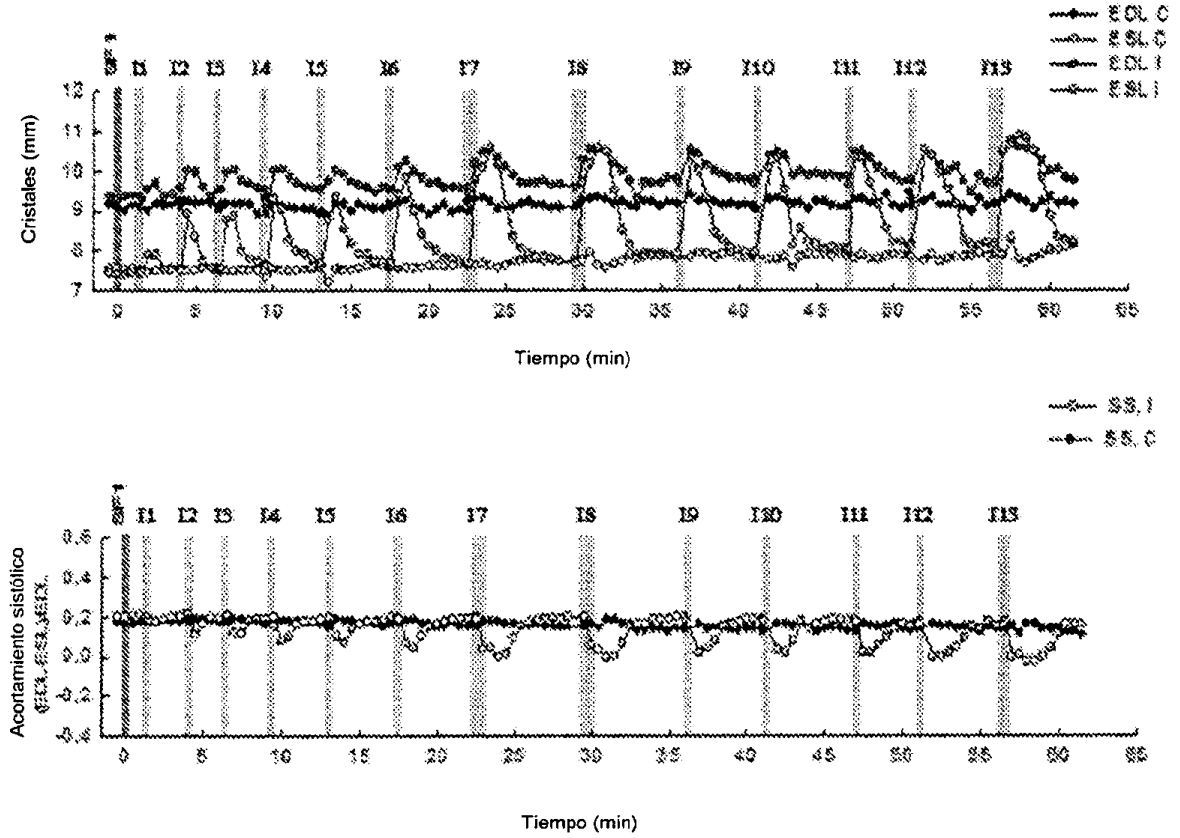


Figura 4

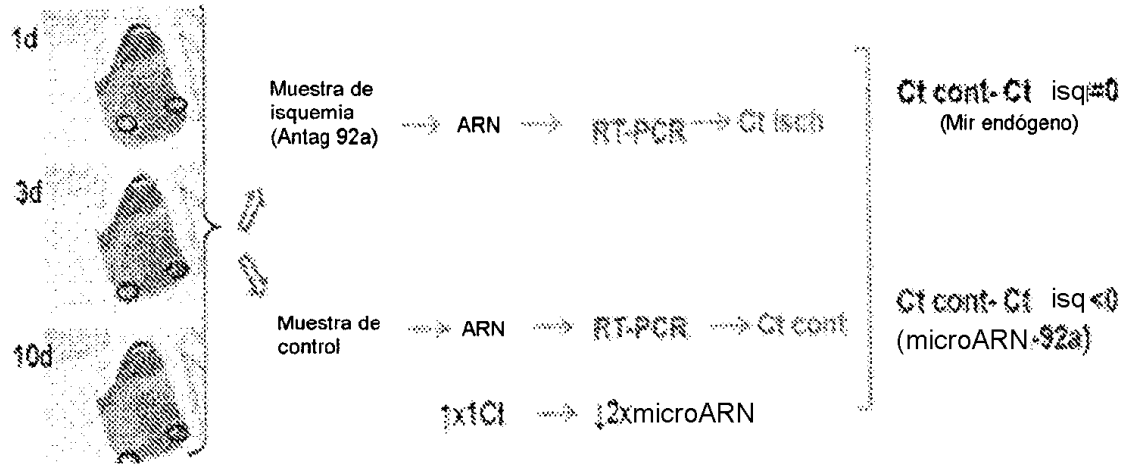


Figura 5

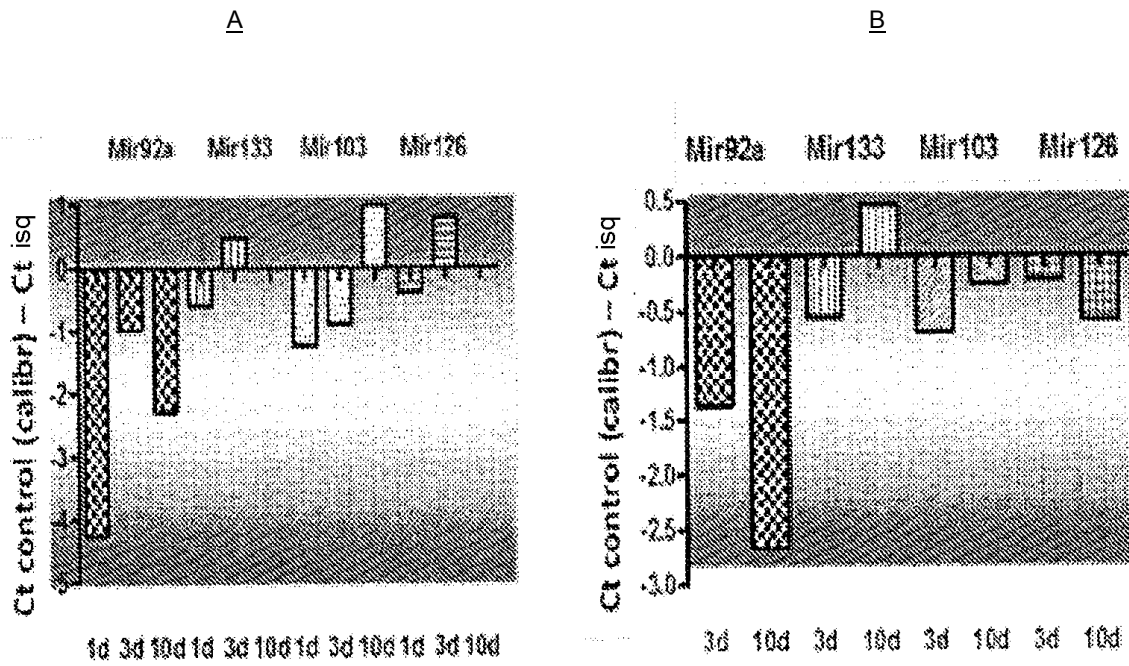


Figura 6

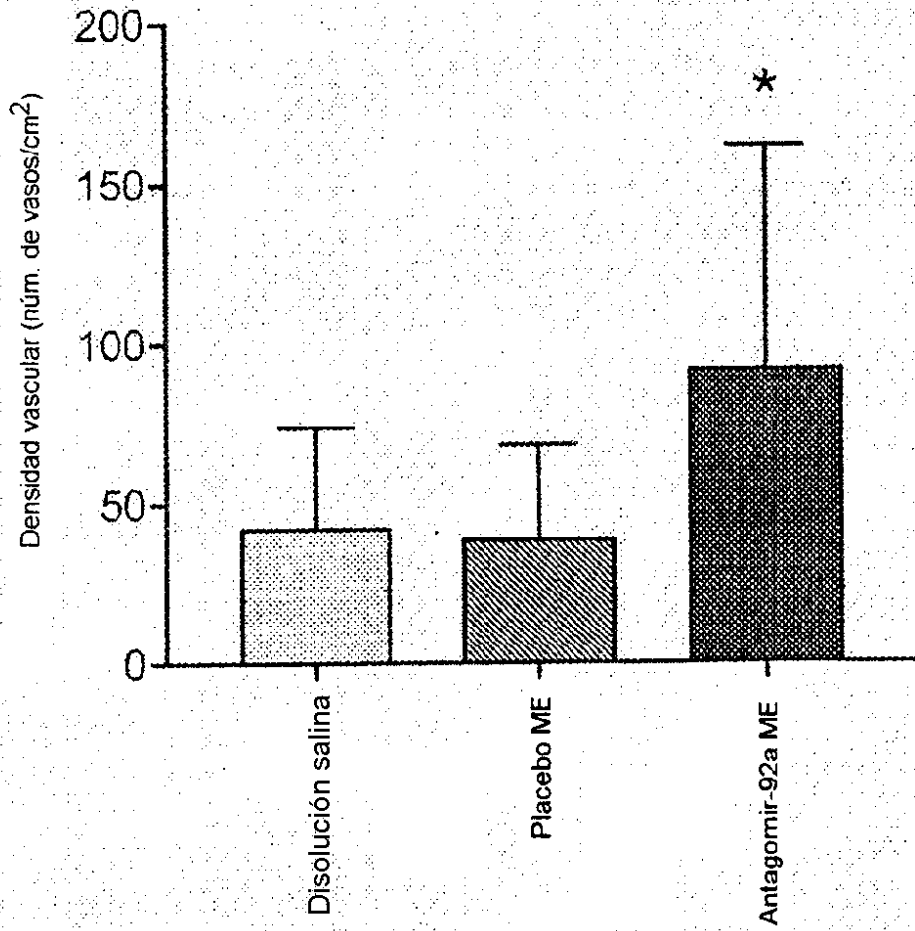


Figura 7

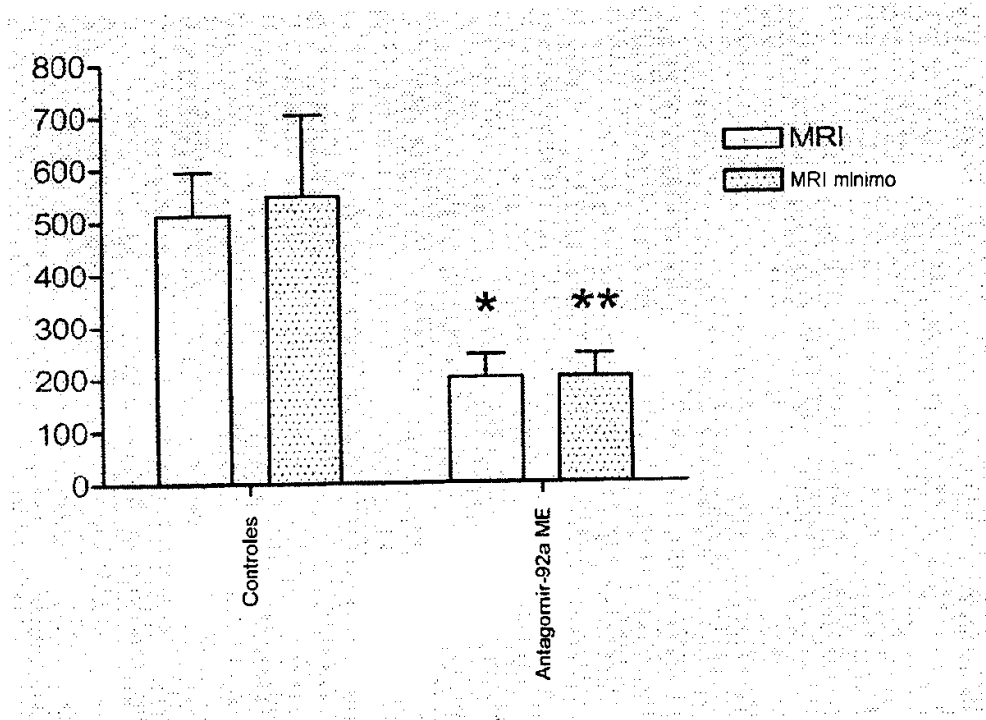


Figura 8

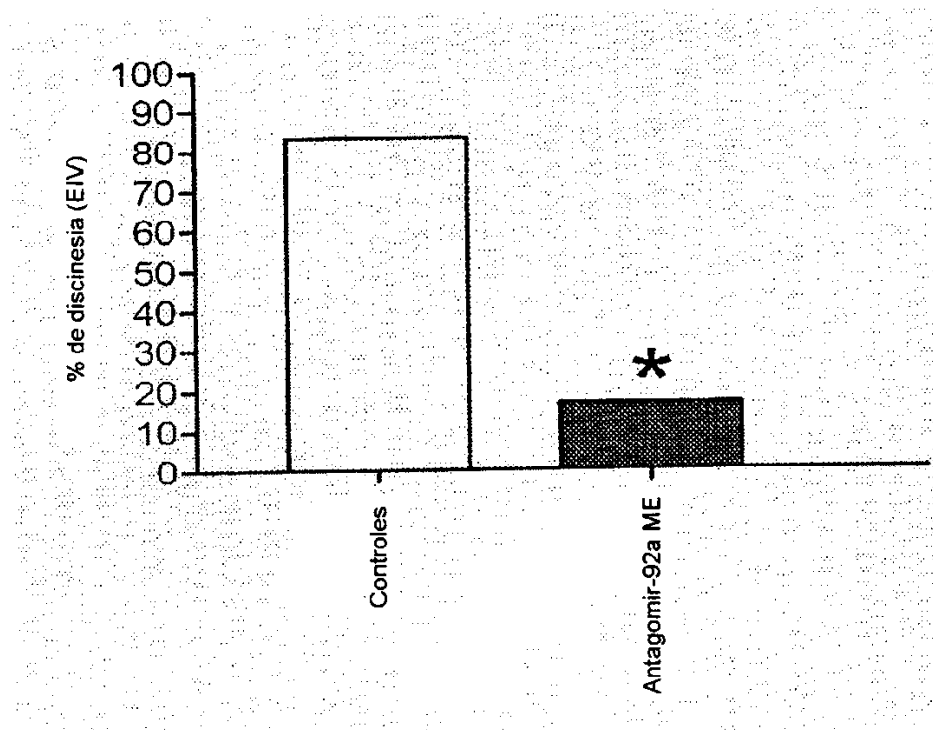


Figura 9