



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 286 644**

⑯ Int. Cl.:

**C12N 15/864** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **04741142 .6**

⑯ Fecha de presentación : **19.07.2004**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1644509**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

⑮ Título: **Compuestos destinados al tratamiento de enfermedades coronarias y/o vasculares periféricas.**

⑯ Prioridad: **17.07.2003 EP 03016259**

⑰ Titular/es: **Bayerische  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Sanderring 2  
97070 Würzburg, DE**

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2007**

⑰ Inventor/es: **Laser, Martin;  
Hauck, Christof y  
Strotmann, Jörg**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2007**

⑰ Agente: **Díaz de Bustamante Terminel, Isidro**

ES 2 286 644 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

Compuestos destinados al tratamiento de enfermedades coronarias y/o vasculares periféricas.

5 La presente invención se refiere a compuestos destinados al tratamiento de enfermedades coronarias y/o vasculares periféricas.

10 Las cardiopatías isquémicas como la angina del pecho o el ataque cardíaco cuentan entre las enfermedades fatales más frecuentes en la Unión Europea y otros países industrializados. El método seleccionado para tratar este tipo de enfermedades es la intervención en las arterias coronarias por medio de dilatación de globo de las arterias y/o mediante la implantación de un stent. Sin embargo, un 20 por ciento a un 60 por ciento de los pacientes, dependientemente de las lesiones vasculares y el perfil de riesgo, padecen de una reoclusión de los vasos debido a una reestenosis después de la implantación de un stent dentro de los 6 meses tras el tratamiento inicial y por eso, tienen que someterse a una revascularización. Los mecanismos patofisiológicos que causan la reestenosis son principalmente conocidos. En 15 general, la reestenosis se causa por la proliferación y la migración de células musculares lisas vasculares (CML) desde la túnica media hacia la túnica íntima, lo que resulta en la formación de una neoíntima reduciendo el diámetro del lumen de vaso.

20 En vista de eso, es deseable reducir el riesgo de la reestenosis. Los enfoques aplicados en la técnica anterior están basados en mejoramientos del diseño del stent, el uso del ultrasonido, de sustancias frías o fotoquímicas así como el uso de stents cubiertos con sustancias radioactivas. Además de dichos medios físicos, igualmente medios químicos se usan para impedir la reestenosis, en donde se prefieren en particular los citostáticos así como las sustancias antiinflamatorias como el sirolimus, el tacrolimus, la actinomicina D, el taxol, el paclitaxel, la dexametasona, los inhibidores de metaloproteasas de matriz, las estatinas, los antagonistas de la integrina, los vasodilatadores y los donantes 25 de NO.

30 El estudio refiriéndose al uso de un stent particular contenido un fármaco, es decir, el stent Cypher eluyendo el sirolimus (Cordis, Johnson & Johnson), en relación con la prevención de la reestenosis, ha sido publicado en la Zeitschrift für Kardiologie, 91, suppl. 3, 2002, 49-57. Problemas posibles asociados a la inducción de una trombosis en el uso del mismo se han observado: Véase <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/cordisltr.pdf> y <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2003/NEW00919.html>.

35 Otro enfoque aplicable para el tratamiento de la reestenosis se basa en la terapia genética. En la técnica anterior, varios genes candidatos como VEGF, c-myc, p53, eNOS y otros, constituyeron los genes diana por este fin. Sin embargo, además del problema de seleccionar la diana óptima, hasta el presente día problemas particulares han surgido a causa del contacto corto entre las membranas citoplasmáticas de las células musculares lisas migratorias y los vectores administrados dirigidos a los genes candidatos.

40 Los compuestos químicos administrados con el fin de tratar la reestenosis se aplican normalmente mediante stents particulares llamados stents liberadores de fármacos (*drug-eluting stents*), en donde dichos compuestos se liberan por los stents. Sin embargo, para la liberación de compuestos farmacéuticamente activos por medio de un stent es necesario que las sustancias se apliquen en forma de recubrimiento sobre los stents, de preferencia en forma de recubrimiento con polímeros. Este tipo de recubrimiento lleva a un volumen aumentado del stent en comparación con el stent no recubierto y por lo tanto, trae consigo un riesgo más alto de inflamación y de reestenosis. Además, la producción 45 de este tipo de stent resulta difícil. No obstante, se necesita otro medio para el tratamiento y/o la prevención de la reestenosis y de enfermedades asociadas a la reestenosis o causadas por la misma.

50 Según un primer aspecto, el problema de la presente invención se resuelve por el uso de un virus adeno-asociado, en donde el virus adeno-asociado comprende lo siguiente:

- 50 a) la FRNK o un derivado de la misma que conserva la actividad funcional de la FRNK, o
- b) un ácido nucleico codificando la FRNK o un derivado de la misma que conserva la actividad funcional de la FRNK.

55 Según un segundo aspecto, el problema de la presente invención se resuelve por el uso de un ácido nucleico codificando para un virus adeno-asociado, en donde el ácido nucleico comprende un ácido nucleico que codifica la FRNK, para la producción de un medicamento.

60 Según un tercero aspecto, el problema de la presente invención se resuelve por el uso de un ácido nucleico codificando para un virus adeno-asociado, en donde el ácido nucleico comprende un ácido nucleico codificando la FRNK, para el recubrimiento de un implante.

65 Según un modo de realización preferido del tercero aspecto de la presente invención, el uso sirve para el recubrimiento de un stent y/o para el recubrimiento de un catéter.

Según otro modo de realización de cualquier aspecto de la presente invención, la FRNK comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ. ID. NO. 1 o la SEQ. ID. NO. 2.

# ES 2 286 644 T3

Según aún otro modo de realización de cualquier aspecto de la presente invención, la FRNK está codificada por una secuencia de aminoácidos según la SEQ. ID. NO. 3 o la SEQ. ID. NO. 4.

5 Según otro modo de realización de cualquier aspecto de la presente invención, la FRNK está codificada por un ácido nucléico que hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos según la SEQ. ID. NO. 3 o la SEQ. ID. NO. 4.

Según otro modo de realización de cualquier aspecto de la presente invención, la FRNK está codificada por un ácido nucléico que, sin la degenerescencia del código genético, hibridaría con la secuencia de ácidos nucleicos según la SEQ. ID. NO. 3 o la SEQ. ID. NO. 4, preferiblemente bajo condiciones astringentes.

10 Según otro modo de realización de cualquier aspecto, el virus adeno-asociado y/o el medicamento que comprende el virus adeno-asociado y/o el ácido nucleico codificando el virus adeno-asociado se administra(n) por medio de un catéter o un implante.

15 En un modo de realización preferido, el implante es un stent.

Según un quinto aspecto, el problema de la presente invención se resuelve por un stent recubierto con un virus adeno-asociado o un ácido nucleico codificando el virus adeno-asociado como descrito en relación con cualquier aspecto de la presente invención.

20 Según un sexto aspecto, el problema de la presente invención se resuelve por un catéter recubierto con un virus adeno-asociado o con un ácido nucleico codificando el virus adeno-asociado como descrito en relación con cualquier aspecto de la presente invención.

25 Según un séptimo aspecto, el problema de la invención se resuelve por el uso de un stent como descrito en relación con el quinto aspecto de la presente invención en la producción de un medicamento o en la producción de un dispositivo médico.

30 Según un octavo aspecto, el problema de la invención se resuelve por el uso de un catéter como descrito en relación con el sexto aspecto de la presente invención en la producción de un medicamento o en la producción de un dispositivo médico.

35 Según un modo de realización preferido del uso según los varios aspectos de la presente invención, el medicamento y/o el dispositivo médico está(n) destinado(s) al tratamiento y/o la prevención de una enfermedad coronaria y/o vascular periférica.

Según un modo de realización aún más preferido del uso según los varios aspectos de la presente invención, la enfermedad coronaria y/o vascular periférica se selecciona del grupo que comprende las siguientes enfermedades: la reestenosis, la angiogénesis, la angina de pecho, el ataque cardíaco, el síndrome coronario agudo, la enfermedad de 40 oclusión arterial periférica, la vasculitis, la trombosis, la estenosis carotídea, el accidente cerebrovascular, el infarto, la gangrena, la úlcera arterial, la trombosis venosa y la amputación de una extremidad cualquiera.

Los presentes inventores descubrieron de manera sorprendente que la combinación del uso de una diana distinta implicada en el proceso de la reestenosis con un sistema de vector distinto resulta en un tratamiento eficaz de 45 la reestenosis y de enfermedades o condiciones asociadas a la misma, basándose en una terapia genética. Más particularmente, la diana es la quinasa de adhesión focal (FAK, *focal adhesion kinase*) y los inhibidores de la misma son aún más preferidos como dianas. Un inhibidor particularmente preferido es la FRNK (*FAK-related non-kinase*). Basado en esto, los presentes inventores descubrieron que el uso de virus adeno-asociados como el sistema de vector distinto es ventajoso, en donde dichos virus contienen un inhibidor de la FAK o codifican para el mismo, más 50 particularmente los que codifican para la FRNK. Tales virus adeno-asociados se administran a un organismo necesitándolos, más particularmente se administran en el sitio donde la estenosis o la reestenosis va a ocurrir o ya está presente, para infectar las células musculares lisas implicadas en este proceso mediante el uso del sistema de vector. La combinación particular del uso de un virus adeno-asociado como vehículo de liberación y medio de transfección en células musculares lisas vasculares y la introducción de un inhibidor eficaz de la FAK, tal como la FRNK, lleva 55 a una sobreexpresión significante del inhibidor y una transferencia de genes casi cuantitativa del ácido nucleico codificando el inhibidor hacia las células respectivas, de preferencia hacia el músculo liso vascular. La combinación de tales mecanismos lleva a un efecto altamente eficaz y persistente sobre el patomecanismo relacionado a la estenosis y la reestenosis y sobre las células implicadas en dicho mecanismo, particularmente las células musculares lisas vasculares.

60 La causa celular de la reestenosis es una migración no deseada de células musculares lisas vasculares (CML) desde la túnica media hacia la túnica íntima del vaso respectivo, más preferiblemente de arterias. Bajo condiciones no patológicas, la migración de células musculares lisas vasculares es un proceso implicado en los procesos de la curación de heridas en el organismo adulto. La coordinación de la adhesión celular a la matriz extracelular (MEC) y el control 65 de la contractibilidad del citoesqueleto de actina intracelular son esenciales para un movimiento definido de las células eucariotas. Las integrinas forman, entre otros, los receptores celulares para las proteínas de la matriz extracelular y se acumulan en sitios determinadas a las que se refiere como adhesiones focales o sitios de adhesión focal. Además de la mediación de la interacción de la matriz extracelular y del citoesqueleto de actina intracelular, estas adhesiones focales

## ES 2 286 644 T3

son esenciales para la transducción de señales hacia la célula, incluyendo el control del crecimiento dependiente de la adhesión y de la regulación de la motilidad celular. Como las integrinas por sí mismas no disponen de actividad enzimática, la transducción de señales mediada por integrinas está basada en la actividad de enzimas asociadas a la integrina.

5 Una de dichas enzimas asociadas a la integrina es la quinasa de adhesión focal (FAK), que es una proteína tirosina quinasa presente en células adherentes tales como células epiteliales, fibroblastos o células musculares lisas. La FAK se activa al entrar en contacto con la matriz celular, a causa de estrés mecánico o tras la adición de distintos factores de crecimiento. Una autofosforilación del residuo de tirosina Y-397 de la FAK tiene lugar gracias a una actividad enzimática aumentada. El domino FAT (FAT, *focal adhesion targeting domain*) localizado en el extremo C-terminal, que media la localización de la FAK en las adhesiones focales ricas en integrinas, es esencial para la función de la FAK. En algunos tipos celulares tales como las células musculares lisas, la región C-terminal de la FAK se expresa como un transcripto y una proteína separados, respectivamente, a la que también se refiere como proteína no quinasa asociada a la FAK (FRNK, *FAK-related non kinase*). Como la FRNK comprende el dominio FAT, la FRNK se recruta 10 también en las adhesiones focales para competir aquí con la FAK por los sitios de unión. Por eso, la FRNK es una variante predominante negativa de la FAK endogénea y así puede bloquear los procesos celulares que dependen de la FAK. Sobre la base de este mecanismo, la FRNK y sus derivados pueden ser utilizados para inhibir eventos mediados 15 por la FAK, tales como la motilidad de células musculares lisas, y para así controlar la reestenosis y la estenosis, respectivamente.

20 La FRNK y sus derivados se definen en modos de realización preferidos por la secuencia de aminoácidos según la SEQ. ID. NO. 1, que representa la FRNK humana, o por la secuencia según la SEQ. ID. NO. 2, que representa la FRNK murina, o la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente codificándola, tal como la SEQ. ID. NO. 3 y la SEQ. ID. NO. 4, respectivamente. Además, la FRNK usada en la presente solicitud se refiere de preferencia a cualquier 25 derivado de la FAK que es capaz de competir con la actividad de la FAK en los sitios de adhesión focal sin ejercer la actividad de la FAK en la transducción de señales. En la presente solicitud, este tipo de actividad se denomina también actividad FRNK. Los expertos en la técnica son capaces de derivatizar la FAK de tal modo que se disponga la actividad de la FRNK. Por eso, la presente invención puede usar en modos de realización preferidos cualquier proteína que tiene la actividad de la FRNK y cualquier ácido nucleico codificándola. Parece que todo derivado debería comprender el 30 dominio FAT de la FAK, sin que esto se refiera a una teoría cualquiera. De preferencia, la FRNK comprende los residuos de los aminoácidos 693 hasta 1050 de la secuencia de aminoácidos de la FAK tal como está divulgado bajo el número de accesión # Q 05397 del banco de datos, es decir, los 359 aminoácidos carboxiterminales de la dicha FAK. En otros modos de realización, la FRNK incluye también fragmentos del extremo carboxiterminal de la FAK constituido por 359 aminoácidos que conservan por lo menos una función de unión o función biológica de la FRNK, 35 más particularmente la función responsable de la unión con las adhesiones focales y comprendiendo el sitio de unión de la paxilina y la talina. Tales fragmentos preferiblemente tienen una longitud elevándose a 100, 150 o 200 aminoácidos. Tales fragmentos pueden formarse mediante la eliminación de un segmento del extremo aminoterminal de la FRNK o una proteína que tiene la actividad de la FRNK, mediante la eliminación de un segmento del extremo carboxiterminal de la misma, mediante la eliminación de un segmento intermedio de la misma y mediante combinaciones de estas 40 posibilidades. Es importante que uno o más que uno segmento de aminoácidos heterogéneo menor, tales como por ejemplo de una longitud de 1 a 10 aminoácidos, pueden insertarse en la FRNK o fragmentos de la FRNK, en el extremo aminoterminal, en el extremo carboxiterminal, en una posición intermedia, o combinaciones de las mismas, sin que la función o la actividad de la FRNK sea modificada. Hay que destacar que la FAK y/o la FRNK y el ácido nucleico respectivo codificándolas pueden ser proteínas provenientes de toda especie; preferiblemente la especie es un 45 mamífero y aún más preferiblemente el mamífero es un humano.

Un ácido nucleico codificando la FRNK usado en la presente descripción es preferiblemente la secuencia de ácidos nucleicos según la SEQ. ID. NO. 3 y/o la SEQ. ID. NO. 4. En otro modo de realización, el ácido nucleico codificando la FRNK es un ácido nucleico que codifica para la proteína FRNK tal como descrito arriba, más preferiblemente 50 para la proteína FRNK según la SEQ. ID. NO. 1 y/o la SEQ. ID. NO. 2. Los expertos en la técnica están capaces de deducir de la secuencia de aminoácidos cualquier secuencia de ácidos nucleicos que, generalmente, codificaría para dicha secuencia de aminoácidos, particularmente frente a la degenerescencia del código genético. Secuencias de ácidos nucleicos particularmente preferidas son las que usan el codón respectivo como es pertinente en células eucariotas, más particularmente en células musculares lisas y aún más preferiblemente en células musculares lisas vasculares. También 55 el ácido nucleico codificando la FRNK y sus derivados es cualquier ácido nucleico que hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos descrita arriba, más preferiblemente las secuencias de ácidos nucleicos según la SEQ. ID. NO. 3 y/o la SEQ. ID. NO. 4, o que lo harían sin la degenerescencia del código genético. Para modos de realización preferidos de la presente invención, es esencial que cualquiera ácido nucleico descrito en la presente solicitud codifique para la FRNK o una proteína que tiene la actividad de la FRNK y derivados de la misma como se describe arriba, incluyendo 60 fragmentos activos de la misma. Las condiciones que permitirán a otros ADNs que tras expresión suministran la FRNK o una proteína que tiene la actividad de la FRNK, a hibridar a ADN codificando la FRNK como se describe arriba, pueden determinarse de acuerdo con las técnicas conocidas. A título de ejemplo, una hibridación de tales secuencias con ADN codificando la FRNK o una proteína que tiene la actividad de la FRNK, divulgada en el marco de la 65 presente invención en un ensayo estándar de hibridación, puede efectuarse bajo condiciones de astringencia reducida, astringencia media o incluso condiciones astringentes (por ejemplo condiciones representadas por una astringencia de lavado de formamida (35-40%) con solución de Denhardt (5 x), SDS (0,5%) y 1 x SSPE a 37°C, condiciones representadas por una astringencia de lavado de formamida (40-45%) con solución de Denhardt (5 x), SDS (0,5%) y 1 x SSPE a 42°C; y condiciones representadas por una astringencia de lavado de formamida (50%) con solución de

Denhardt (5 x), SDS (0,5%) y 1 x SSPE a 42°C), respectivamente. (Véase por ejemplo J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2<sup>a</sup> edición 1989)). En general, secuencias que codifican para la FRNK o una proteína que tiene la actividad de la FRNK será homólogo al menos a un 75%, un 85% o incluso un 90% o aún más a la secuencia codificando la FRNK divulgada en la presente solicitud y que, preferiblemente, codifica una proteína que conserva la actividad biológica de la FRNK como indicado arriba. En la presente solicitud, los términos FRNK, proteína FRNK y proteína que tiene la actividad de FRNK se usan como sinónimos a menos que se indique lo contrario. Lo mismo se aplica al uso de los términos proteína y polipéptido.

La proteína FRNK o el ADN codificando la FRNK pueden ser de origen natural, proviniendo de cualquier especie apropiada, incluyendo especies mamíferas, más preferiblemente humanas, o también puede ser de origen sintético.

El sistema de vector que, particularmente en combinación con la FRNK o una proteína que tiene la actividad de FRNK y el ácido nucleico codificando la misma, arriba mencionadas, permite un tratamiento muy eficaz basándose en una terapia genética de la reestenosis, de enfermedades asociadas a la reestenosis o/y la estenosis, es el virus adeno-asociado.

El virus adeno-asociado es un miembro del grupo de los parvovirus. Dichos virus comprenden una molécula circular de ADN de cadena simple con una longitud de aproximadamente 5600 bases. Normalmente pueden replicarse e iniciar un ciclo productivo infeccioso solamente en caso de que las células sean también infectadas por virus auxiliares tales como los adenovirus, los virus vaccinia o herpes. Además de las células auxiliares, una o más de una plasmida proporcionando los factores de transacción puede(n) proporcionarse y usarse para lograr la replicación de virus adeno-asociados. Una replicación productiva puede también ocurrir tras un tratamiento de las células con citostáticos como la Danublastina y/o con radiación. Virus adeno-asociados comprenden tres promotores diferentes, es decir p5, p19 y p40, que desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión de genes.

La presente invención no se limita al uso de un virus adeno-asociado particular. Sin embargo, se prefiere particularmente el uso del virus adeno-asociado del tipo 2 (Rohr U *et al.*, J. Virological Methods, 105 (2002): 265-275). Otros virus adeno-asociados que pueden usarse en el marco de la presente invención son conocidos al experto en la técnica, por ejemplo AAV-1 a AAV-6 (Grimm D *et al.*, Molecular Therapy, 2003 tomo 7 (6): 839-850).

Los presentes inventores descubrieron de manera sorprendente que las consideraciones expuestas en el arte anterior, es decir que los vectores de virus adeno-asociados no son apropiados para la transfección de células endoteliales en el vaso vasorum (Lynch, CM, Circ. Res. 80: 497-505. 1997), no son fundadas. Todo lo contrario, la liberación intraluminal usando este tipo de virus adeno-asociados comprendiendo la FRNK resulta en un efecto inesperado altamente eficaz y persistente sobre la inhibición de la reestenosis.

Preferiblemente, el ácido nucleico codificando para la FRNK y los derivados de la misma está enlazado de manera operable con al menos una secuencia reguladora que dirige la expresión de la FRNK, preferiblemente la expresión de la FRNK, dentro de una célula susceptible a la infección por dichos vectores virales. La secuencia reguladora o las secuencias reguladoras que dirige(n) la expresión de la FRNK es/son preferiblemente promotores que pueden además comprender potenciadores, otras secuencias reguladoras tales como secuencias operadoras, y secuencias similares. Es más preferible que el promotor sea un promotor específico para células musculares lisas. Tales promotores pueden preferiblemente seleccionarse del grupo que comprende el “promotor 22-alpha-actina del músculo liso” (Solway J *et al.*, J. Biol. Chem., 1995, 270: 13460-69). Además, se pueden usar promotores más universales tales como el promotor CMV o el promotor SV40 (Roh U *et al.*, J Virol. Meth., 2002, 105: 265-275).

Según la presente invención los virus adeno-asociados, presentes sea como partículas virales o sea como ácido nucleico/ácidos nucleicos codificando para tales virus adeno-asociados, pueden usarse en todo aspecto de la presente invención. Una vez preparado, el vector recombinante puede preferiblemente reproducirse en que a) se propaga el vector en un cultivo de células, en donde el cultivo de células comprende células que permiten el crecimiento y la reproducción del vector dentro de las mismas; y b) se recoge el vector recombinante del cultivo de células de acuerdo con las técnicas conocidas. Los vectores virales recogidos del cultivo pueden separarse del medio de cultivo según las técnicas conocidas, y pueden combinarse con un soporte farmacéutico apropiado para la administración a un sujeto, o pueden ser usados para la preparación del stent recubierto y el catéter recubierto, respectivamente, según la presente invención.

Los implantes recubiertos con el virus adeno-asociado, diseñados según la presente invención, pueden usarse para la prevención y/o el tratamiento de múltiples enfermedades y por eso, son apropiados para una aplicación en la producción de un medicamento respectivo. La enfermedad y el medicamento para lo cual el virus o el ácido nucleico codificando dicho virus, así diseñados, se usan, son básicamente la reestenosis y la estenosis y toda enfermedad asociada a la reestenosis o la estenosis, respectivamente. También se comprenden las enfermedades causadas por un crecimiento no deseado de células musculares lisas, más preferiblemente células musculares lisas vasculares. Preferiblemente, tales enfermedades son enfermedades coronarias y/o vasculares periféricas. En general, los varios aspectos de la presente invención se pueden aplicar en el sistema vascular arterial así como en el sistema vascular venoso, aunque debido al mecanismo molecular de la presente invención, la aplicabilidad en la rama arterial del sistema vascular es aún más ventajosa.

Con vista al modo de acción de la FRNK y cualquier proteína que tiene la actividad de la FRNK y sus derivados introducidos en las células musculares lisas vasculares, en particular las enfermedades siguientes pueden prevenirse y/o tratarse, en donde, en general, tal tratamiento puede efectuarse sea antes, sea después de la aparición de la enfermedad respectiva, o antes o después del comienzo de cualquier tratamiento de la misma, tal como la dilatación 5 de globo: Síndrome coronario agudo, enfermedad de oclusión arterial periférica, vasculitis, trombosis, estenosis carotídea, accidente cerebrovascular, cualquier infarto, incluyendo, sin que se limite a estos, el infarto de miocardio, el infarto intestinal, renal, gangrena, ulceras arteriales, trombosis venosa y amputación de cualquier extremidad.

10 En un modo de realización preferido, cualquiera de dichas enfermedades se previene y/o se trata por medio del uso de un stent o de un catéter recubierto con el virus adeno-asociado o un ácido nucleico codificando para tales virus adeno-asociados como descrito en la presente solicitud. En otras palabras, las enfermedades particulares se pueden preferiblemente tratar si una parte del sistema vascular es accesible mediante un catéter o un stent.

15 Según otro aspecto, la presente invención se refiere a stents recubiertos con un virus adeno-asociado o un ácido nucleico codificando para un virus adeno-asociado como descrito en la presente solicitud, es decir un virus adeno-asociado que expresa y/o codifica para la FRNK, derivados de la FRNK que conservan la actividad funcional de la FRNK y/o cualquiera proteína que tiene la actividad de la FRNK. Los stents son como estos que se conocen en la técnica anterior y en general son endoprótesis que se usan para formar una derivación de o para mantener un lumen de una víscera hueca, tal como la tráquea, el esófago y el sistema vascular. En general, los stents se dilatan por si 20 mismos al haber sido posicionados en dicha víscera hueca. El proceso de posicionar el stent se efectúa preferiblemente por medios endoscópicos conocidos en la técnica. Existen muchas formas de stents, y la aplicabilidad de la presente invención no se limita a modos de realización o formas de stents particulares. Preferiblemente, el virus adeno-asociado o el ácido nucleico codificando para el mismo se adsorbe al stent. Tal adsorción puede comprender medios covalentes así como no covalentes. Sin embargo, si se usan medios covalentes, se prefiere que el enlace covalente del virus adeno- 25 asociado a la superficie del stent se fraccione bajo condiciones fisiológicas, es decir después de que el stent haya sido posicionado en el sitio respectivo donde la migración de las células musculares lisas se tiene que inhibir. Se reconoce que la inmovilización del virus adeno-asociado al stent puede resultar en cinéticas de liberación características, en donde las cinéticas se pueden controlar según la enfermedad que hay que tratar. Según la presente invención, el virus adeno-asociado respectivo puede liberarse en las células en forma de una liberación única e inmediata para asegurar 30 que un número particularmente alto de células musculares lisas se transfecten. Tomando en consideración el hecho que los stents pueden permanecer en el cuerpo durante períodos de tiempo más largos, también una liberación prolongada del virus adeno-asociado es generalmente posible. Esto permitiría que otras generaciones de células musculares lisas migratorias fueran infectadas por los virus adeno-asociados así liberados más tarde o por el ácido nucleico respectivo codificando para los mismos.

35 Las mismas consideraciones, el mismo uso posible y los mismos principios de diseño se pueden aplicar en cuanto a los catéteres. Por consiguiente, los catéteres pueden ser recubiertos con virus adeno-asociados o ácidos nucleicos codificando para tales virus adeno-asociados descritos en la presente solicitud. En comparación con los stents, sin embargo, la liberación de los virus adeno-asociados descritos en la presente solicitud hacia las células musculares lisas puede efectuarse solamente durante un período de tiempo muy limitado, es decir durante el tiempo que el catéter 40 se inserta en la víscera hueca, más particularmente, en el vaso respectivo o los vasos respectivos a donde el virus adeno-asociado tiene que liberarse. En general, la aplicación de catéteres quiere llegar a un bloqueo bastante corto del lumen de la víscera hueca tal como el lumen de un vaso, de manera que según la forma particular del catéter usado, el contacto entre las células musculares lisas y los virus adeno-asociados liberados mediante el catéter sea 45 bastante corto. Sin embargo, hay que reconocer que también existen catéteres que no bloquean la circulación del fluido corporal a través del lumen de la víscera hueca en la que el catéter se inserta. Esto permitiría un contacto de duración más larga entre el catéter y el sitio del vaso donde el crecimiento y más particularmente, la migración de las células musculares lisas tiene que ser inhibido por la FRNK y sus derivados introducidos por medio del virus adeno- 50 asociado. Generalmente, se pueden aplicar las mismas técnicas de recubrimiento y adsorción y inmovilización como las que han sido descritas para los stents que se pueden aplicar en la administración de los virus adeno-asociados descritos en la presente solicitud por medio de catéteres.

Un sistema particularmente ventajoso para adsorber o inmovilizar el virus adeno-asociado sobre un stent o un catéter, respectivamente, es el uso de un polímero. El virus adeno-asociado está incorporado en el polímero respectivo. 55 En general, el polímero exhibe una estructura reticular que sirve como una jaula contenido el virus adeno-asociado. El polímero es preferiblemente un polímero que puede degradarse bajo condiciones fisiológicas, más particularmente bajo condiciones que predominan en el sitio donde el virus adeno-asociado se administra o a donde el mismo se libera. Alternativamente, el polímero también no puede ser degradable, permaneciendo sobre el dispositivo recubierto, así 60 permitiendo la absorción de virus adeno-asociados u de otras formulaciones sobre la superficie. Preferiblemente, el recubrimiento es de manera que facilita una liberación inmediata del virus adeno-asociado a las células musculares lisas. Más preferiblemente, el recubrimiento se halla sobre la superficie sea del stent sea del catéter, que es diferente de la superficie que tiene contacto inmediato con el fluido corporal que pasa por la víscera hueca respectiva y más particularmente, por el vaso respectivo. Según otro aspecto, la presente invención se refiere a la producción de un stent y/o de un catéter recubierto con un virus adeno-asociado como descrito en la presente solicitud.

65 A continuación, la invención se describirá de manera más detallada por medio de las figuras y los ejemplos que permitirán deducir otros aspectos, modos de realización, características y ventajas de la presente invención. Más particularmente,

# ES 2 286 644 T3

la Fig. 1 muestra una representación esquemática de los dominios funcionales de la FAK y de la FRNK;

la Fig. 2A muestra un diagrama mostrando el vector basado en el virus adeno-asociado con un sitio de clonación múltiple en el que la FRNK con un marcador 3 x HA (*HA-tag*) se introdució por clonación;

5 la Fig. 2B muestra la secuencia de aminoácidos de la FRNK introducida por clonación en el virus adeno-asociado mostrado en la Fig. 2A;

10 la Fig. 3A muestra un análisis Western Blot de la expresión de la FAK y su fosforilación en lisatos celulares completos de células musculares lisas coronarias suspendidas y adherentes estimuladas por la vitronectina;

la Fig. 3B muestra un diagrama del impacto de la vitronectina sobre la haptotaxis de las células musculares lisas;

15 la Fig. 3C muestra una fotografía de células musculares lisas tratadas con la albumina de suero bovino y la vitronectina, respectivamente, después de coloración con violeta de cristal;

la Fig. 4A muestra una fotografía de células musculares lisas infectadas con un virus adeno-asociado codificando para la beta-galactosidasa;

20 la Fig. 4B muestra un análisis Western Blot de lisatos celulares de células musculares lisas humanas después de infección con un virus adeno-asociado codificando la FRNK; y

la Fig. 4C muestra un diagrama mostrando la migración haptotáctica de células musculares lisas humanas estimuladas por la vitronectina y transfectadas con un virus adeno-asociado expresando la FRNK.

25 La Fig. 1 muestra una representación esquemática de los dominios funcionales de la FAK y de la FRNK. La FRNK comprende múltiples dominios, es decir, el dominio de homología a la banda 4.1, seguido por el dominio de la quinasa y dos extensiones ricas en prolina (Pro-1 y Pro-2) que pueden servir de dominio SH3 conteniendo sitios de acoplamiento para proteínas, tal como p130CAs y Rho-GAP GRAF, y por el dominio denominado focal adhesion targeting domain, al que se refiere también como el dominio FAT. Cerca del dominio de la quinasa, el residuo de la tirosina en la posición 397 es la diana de la autofosforilación de la FAK, que es un requisito esencial de la transducción de señales mediada por la FAK como descrito en más detalle en el ejemplo 2.

30 La FRNK comprende la extensión del extremo C-terminal que sigue al dominio de la quinasa de la FAK. Según un modo de realización de la FRNK expuesto en la Fig. 1, la FRNK comprende tanto las extensiones Pro-1 y Pro-2 como el dominio FAT.

35 El dominio de homología a la banda 4.1 está implicado en interacciones proteína-proteína que unen la FAK a las proteína tirosina quinasas tales como el receptor EGF u otros. El dominio de la quinasa ya descrita arriba es responsable de la transducción de señales por medio de fosforilación, incluyendo la autofosforilación de la FAK. El dominio probablemente más importante de la FAK es el dominio FAT que media la localización de la FAK en las integrinas. El dominio FAT comprende un haz de 4 hélices alfa que están asociados una a otra por medio de interacciones hidrofóbicas. Dicha extensión, particularmente el dominio FAT de la misma, se expresa como un transcripto separado en algunos tipos de células, incluyendo las células musculares lisas. Este transcripto se denomina no quinasa asociada a la FAK (FRNK). Como la FRNK comprende el dominio FAT, la FRNK es capaz de competir con la FAK por los sitios de unión respectivos. Frente a la carencia de cualquier actividad de quinasa de la FRNK en comparación con la FAK, la FRNK es una variante predominante negativa de la FAK endógena y así es un inhibidor eficaz de eventos celulares que dependen de la FAK.

40 Ejemplo 1

## *Construcción de un virus adeno-asociado expresando la FRNK*

45 La secuencia codificadora de la FRNK murina, es decir, la secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 693 a 1050 de la FAK, también mostrada en la figura 2B, se amplificó por PCR. Los sitios de restricción para enzimas de restricción EcoR1 y Xba1 se introducieron adicionalmente en el extremo 5' de los partidores, respectivamente. A continuación, el fragmento resultante de PCR se introdució en el vector pAAV-MCS, que forma parte del sistema de virus adeno-asociado comercialmente disponible por Stratagene, La Jolla, California. El fragmento de inserción no solo comprendió la secuencia de aminoácidos de la FRNK, sino también un marcador HA en el extremo 3' que se introdució para permitir una detección específica de la FRNK expresada por el virus adeno-asociado. Las secuencias de los vectores del sistema pAAV son accesibles al visitar el sitio Internet siguiente: <http://www.stratagene.com/vectors/selection/aavvectors.html>.

50 Los vectores del sistema pAAV se usaron para la producción de partículas de virus adeno-asociado infecciosas defi-  
55 cientes de replicación según el protocolo suministrado, que usa células humanas 293T al utilizar el medio DMEM que contiene suero de ternera (10%) (PAA Labor, Linz, Austria) a 37°C, CO<sub>2</sub> (5%). En general, las células se almacenaron dentro de platos de cultivo de tejido de un diámetro de 10 cm conteniendo 10 ml de dicho medio. La confluencia celular se mantuvo entre el 20-90%. Simultáneamente, el vector pAAV-LacZ de Stratagene conteniendo el gen

de la beta galactosidase (LacZ) de *Escherichia coli* se usó para producir partículas AAV recombinantes codificando LacZ. Después de congelación-descongelación repetida de las células humanas 293T transfectadas y la liberación de las partículas del virus codificando la FRNK, también llamado AAV-FRNK, y de las partículas del virus codificando LacZ (AAV-LacZ), respectivamente, el título de las partículas virales infecciosas se determinó. Para dicho fin, células

5 musculares lisas vasculares humanas se infectaron con diluciones diferentes de la preparación viral según el protocolo indicado abajo y 5 días más tarde, el número de las células positivas para LacZ se determinó. Enseguida, el número de partículas infecciosas por unidad de volumen de la preparación se pudo determinar. Las células musculares lisas humanas primarias son comercialmente disponibles, entre otros, por Clonetics.

10 La estrategia de clonación, más particular el vector de clonación, se muestra otra vez en la Fig. 2A y la secuencia de aminoácidos introducida por clonación en el MCS se muestra en la Fig. 2B.

#### Ejemplo 2

##### 15 *Fosforilación de la tirosina por la FAK en células musculares lisas después de estimulación por integrinas*

Este experimento confirmó la importancia de la FAK como diana en cuanto a la inhibición de la migración de células musculares lisas y así, de la reestenosis. Se comprobó que la FAK es una de las proteínas en las que la tirosina es más fosforizada tras la estimulación de las células musculares lisas por factores de crecimiento o proteínas de la

20 matriz extracelular tal como la vitronectina, que se identificaron como activadores de la migración de las células musculares lisas en relación con la reestenosis.

Para caracterizar proteínas celulares estimuladas por acoplamiento a la matriz extracelular, se les privó a las células musculares lisas de suero durante 16 horas en DMEM conteniendo suero de ternera (0,5%), dichas células musculares lisas se separaron del plato por medio de digestión limitada de tripsina y se conservaron en suspensión a 37°C en DMEM conteniendo albumina de suero bovino (0,2%) (medio de suspensión). Al cabo de 1 hora en suspensión, sea, las células se granularon y se lisaron en tampón RIPA modificado (25 mM de Hepes (pH 7,4), SDS (0,1%), desoxicolato de sodio (0,5%), Triton X-100 (1%), 150 mM de NaCl, 20 mM de MgCl<sub>2</sub>, glicerol (10%), 10 mM de pirofosfato de sodio, 100 mM de NaF, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y 10 µg/ml de la aprotinina, la leupeptina, el pepfabol y la pepstatins respectivamente) (muestra de suspensión) o sea, las células se plaquearon a un plátillo de cultivo de células de 10 cm recubierto durante 16 horas a 4°C con 5 ml de 1 µg/ml de vitronectina en PBS antes de que las células acopladas a la vitronectina se hayan lisado en tampón RIPA modificado (estimulado por la VN). Cantidades equivalentes de los lisados celulares purificados se añadieron a un volumen igual de 2 x tampón de muestra de reducción SDS, las proteínas se separaron por medio de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas PVDF. Un Western Blot con anti-fosfotirosina y anticuerpos anti-FAK, respectivamente, se efectuó como descrito (Schlaepfer, D. D. y Hunter T., Trends Cell Biol., 1998. 8 (4): p. 151-157).

Como mostrado en la Fig. 3A, la fosforilación de la tirosina por la FAK se aumentó significativamente por medio de la estimulación de las integrinas celulares plaqueándolas sobre la vitronectina (VN) en comparación con células que se habían quedado en suspensión sin estímulo de integrina (SUS). En la barra superior de la Fig. 3A, la FAK fosforilado se detecta mediante un análisis Western Blot usando un anticuerpo anti-fosfotirosina (Ptyr), es decir un anticuerpo que detecta específicamente residuos de tirosina fosforilada. La barra inferior de la Fig. 3A muestra un análisis Western Blot de las mismas muestras usando un anticuerpo monoclonal anti-FAK (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania) confirmando que los efectos observados no son debidos a efectos transcripcionales o translacionales modificando el

45 nivel de proteína FAK, sino que dependen del estado de fosforilación de la FAK. En las células suspendidas así como en las células replaqueadas sobre la vitronectina, la FAK se expresó a un nivel similar.

Para analizar las respuestas migratorias de células musculares lisas primarias humanas frente a la vitronectina inmovilizada, las células se analizaron en un ensayo de migración haptotáctica en cámara de Boyden modificada. Para este fin, cámaras Millicell (tamaño de poro de 8 µm; Millipore, Bedford, MA) se recubrieron al lado inferior de la membrana porosa con las cantidades indicadas de la vitronectina durante 2 horas a temperatura ambiente y entonces, se pusieron en placas de 24 pocillos contenido 400 µl de medio de suspensión. 1 x 10<sup>5</sup> células musculares lisas privadas de suero en 300 µl de medio de suspensión se añadieron en la cámara y se les permitió a migrar durante 6 horas a 37°C, CO<sub>2</sub> (5%). Entonces, las células permaneciendo en la cámara interior se quitaron mediante un aplicador a punta de algodón y células que habían migrado hacia la superficie recubierta con la vitronectina al lado inferior de la membrana porosa de la cámara Boyden se fijaron (etanol (37,5%), ácido acético (25%) en H<sub>2</sub>O) y se coloraron con violeta de cristal. Las células coloradas se contaron en 4 campos aleatorios/cámara mediante un microscopio invertido de magnificación a baja potencia (40x) y el nombre de células medio ± la desviación estándar se muestra en la figura 3B. Los resultados muestran que la vitronectina estimula la haptotaxis de células musculares lisas de una manera que es función de la concentración en comparación con cámaras recubiertas con albumina de suero bovino. La importancia de dicho estudio se debe al hecho de que las células usadas para este fin son células musculares lisas humanas primarias de la arteria coronaria que se suponen desempeñar un papel importante en el fenómeno de la reestenosis.

Además, el potencial motogénico de la vitronectina se demostró por microfotografías de la membrana inferior de dos cámaras de migración representativas del experimento de la migración haptotáctica descrito arriba, donde las células musculares lisas al lado inferior de la membrana de la cámara de Boyden se fijaron y se coloraron por medio de violeta de cristal después de 6 horas de migración. La Fig. 3C muestra que las células expuestas a la BSA no migraron y por eso, ninguna célula fue visible al lado inferior de la membrana, mientras que las células puestas en

cámaras Millicell recubiertas con la vitronectina (aquí la concentración fue de 10  $\mu$ g/ml) mostraron una respuesta migratoria fuerte y por eso, varias células musculares lisas coloradas con violeta de cristal se hallaron al lado inferior de la membrana porosa (Figura 3C).

5 Ejemplo 3

*Inhibición de la haptotaxis de células musculares lisas estimulado por la vitronectina tras infección por un virus adeno-asociado expresando la FRNK*

10 En este experimento, se usaron los vectores basados en el virus adeno-asociado producidos en el ejemplo 1 (AAV-LacZ y AAV-FRNK). Para demostrar la propiedad del virus para la transfección, células musculares lisas porcinas así como células musculares lisas humanas se infectaron por AAV-LacZ. Por eso, células musculares lisas se cultivaron en platillos de cultivo de células de 10 cm conteniendo 10 ml de medio de crecimiento SmBM (número de catálogo CC-3181; CellSystems, St. Katharinen, Alemania) con suplemento de factor de crecimiento SmGM-2 (número de catálogo CC-4149; CellSystems, St. Katharinen, Alemania) a 37°C y CO<sub>2</sub> (5%) durante un o dos días. Después de que la población celular hubiera alcanzado una confluencia de un 20%, el medio se retiró y se sustituye por 5 ml de DMEM con suero de ternera (2%) inactivado por calor (PAA Labor, Linz, Austria) y las células se incubaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 50 partículas virales infecciosas por célula a 37°C y CO<sub>2</sub> (5%) durante 2 horas. A continuación, 5 ml de medio de crecimiento se añadieron al cultivo. Cinco días más tarde, las células musculares lisas transducidas sea se fijaron y se coloraron para detectar una actividad LacZ, sea se lisaron para determinar la expresión de proteínas, sea se usaron en experimentos de migración.

25 Para analizar la actividad de LacZ, las células infectadas se fijaron en formalina (1,8%), glutaraldehída (0,05%) en PBS durante 5 min a temperatura ambiente dos días después de la infección por el virus adeno-asociado codificando la beta-galactosidasa (AAV-LacZ). Después de la fijación, las células se incubaron con solución de coloración de LacZ (5 mM de fericianido de potasio, 5 mM de ferociánido de potasio, 1 mg/ml X-Gal, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> en PBS) durante 2 horas a 37°C, donde las células positivas para LacZ exhibieron una coloración azul. Como expuesto en la Fig. 4A, las células musculares lisas porcinas así como humanas muestran una coloración azul como un resultado de la actividad de betagalactosidasa, lo que demuestra que se les haya transducido con éxito usando el vector de virus adeno-asociado.

30 Para evaluar la capacidad del virus adeno-asociado codificando la FRNK para transducir células musculares lisas primarias, las células se lisaron en tampón RIPA modificado cinco días tras la infección por AAV-FRNK y se analizaron por medio de un Western Blot con anticuerpos del marcador anti-HA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) como descrito arriba en el ejemplo 2.

35 La Fig. 4B muestra la expresión de HA-FRNK en células musculares lisas transducidas por AAV-FRNK (pista a la derecha), mientras que células de control no infectadas (pista a la izquierda) no muestran una banda de proteína correspondiente con el peso molecular esperado de HA-FRNK.

40 Para analizar las consecuencias funcionales de la expresión de FRNK en células musculares vasculares humanas, un ensayo de migración hipotáctica en cámara de Boyden con células infectadas por el virus se llevó a cabo como descrito en el ejemplo 2. Como estímulo migratorio, las cámaras se recubrieron al lado inferior de la membrana porosa sea con albumina de suero bovina (BSA (0,2%) en DMEM) como control negativo sea con la vitronectina (VN; 10  $\mu$ g/ml en DMEM). Cinco días antes del ensayo de la haptotaxis, las células se infectaron por el virus adeno-asociado de control (AAV-LacZ) o por el virus adeno-asociado codificando la FRNK (AAV-FRNK) como descrito en el ejemplo 2. Como expuesto en la Fig. 4C, las células musculares lisas humanas infectadas por AAV-LacZ exhiben una respuesta a la vitronectina inmovilizada y migran hacia la superficie inferior de la membrana. Sin embargo, la infección de las células por AAV-FRNK y la expresión resultando de HA-FRNK en células musculares lisas humanas primarias reduce de manera eficaz la migración hipotáctica estimulada por la vitronectina cerca de los niveles basales de migración destacados para las células de control en cámaras de migración tratadas con BSA.

Ejemplo 4

*Tratamiento de la reestenosis después de una PTCA y la implantación de un stent por transferencia genética de la FRNK*

*Modelo animal*

60 A continuación, se describirá un protocolo aplicado para prevenir la reestenosis después de una PTCA y la implantación de un stent, en donde la reestenosis se previene más particularmente por medio de la transferencia de un gen de la FRNK mediada por un virus adeno-asociado del tipo 2 (AAV-2) usando un catéter de globo doble. El modelo animal es un cerdo.

65 La arteria carótida común derecha se prepara bajo anestesia completa y respiración artificial. Después de introducir un introductor de catéter 7F, una angiografía de la arteria coronaria izquierda se efectúa por medio de un catéter de guía 5F. Un stent de 3,0/10 mm se implanta en el tercero proximal del ramus interventricularis y en el tercero proximal del ramus circumflexus de la arteria coronaria izquierda. Para inducir una reestenosis suficiente, se necesita una relación stent-arteria de 1,3:1. Después de la implantación del stent, un catéter de globo de perfusión con dos

## ES 2 286 644 T3

globos se introduce en la sección del vaso sanguíneo donde se halla el stent. Los dos globos de oclusión se extienden a lo largo de la longitud completa del stent más dos milímetros en cada lado. Para proporcionar una perfusión activa de la arteria coronaria distal a la sección ocluida, se usa sangre arterial que se extrae desde la compuerta lateral del introductor 7F insertado en la arteria carótida. La perfusión se efectúa mediante una bomba de rodillos. La sangre 5 se completa con una mezcla de heparina y nitratos en forma de infusión continuo antes de entrar en la bomba de rodillos. Para impedir lesiones vasculares causadas por los globos, la dilatación se efectúa bajo una presión mínima (0,5 atm). 10 ml de una solución viral que comprende el virus adeno-asociado codificando  $10^8$ - $10^{10}$  partículas virales/ml para proteína de fluorescencia verde (AAV-GFP) y virus adeno-asociado codificando una proteína de fusión de la FRNK y proteína de fluorescencia verde (AAV-FRNK-GFP), respectivamente, se administran durante diez minutos.

10 A continuación, el catéter de perfusión activa se retira, la arteria carótida se liga y el corte se cierra.

Durante un período de cuatro semanas después de la operación, los animales reciben una combinación de 75 mg de Clopidogrel y de 100 mg de ácido acetilsalicílico por día *per os*. Después de cuatro semanas, otra angiografía se efectúa con extirpación subsiguiente de los órganos. El corazón se fijó en solución de formaldehído en una perfusión 15 Langendorff. Después de eso, las secciones coronarias comprendiendo los stents se preparan y se analizan en cuanto a la histología y la morfometría.

### *Histología y morfometría*

20 Después de la prueba descrita arriba en la que los stents se hallan en el cuerpo durante cuatro semanas, se evalúan la morfometría de la reestenosis, la distribución viral en secciones histológicas, la formación de la neointima en el sitio de los globos así como un análisis toxicológico de lesiones de órganos y de la liberación sistemática del virus en los órganos.

25 Para la morfometría, secciones fijadas por perfusión de la arteria coronaria se incorporaron en metacrilato y las secciones se prepararon por medio de un microtomo. Se efectúa una morfometría planimétrica después de la coloración con HE para una evaluación cuantitativa de la reestenosis.

30 Además, las mismas secciones se irradian con luz fluorescente (longitud de onda de excitación 500 nm) para detectar la proteína de fluorescencia verde (GFP) que ha sido co-transfектada por el virus y que permite la evaluación de la eficacia de la transfección. Adicionalmente, tres secciones de los vasos se analizan por medio de un análisis Western Blot en cuanto a la FRNK así como en cuanto a los marcadores FLAG y HA co-transfектados. El segmento del vaso de la muestra se aísla inmediatamente después de la extirpación de los órganos. La sangre y el stent se extraen en tampón frío. El tejido se almacena en nitrógeno líquido antes de un tratamiento subsiguiente para la análisis de las 35 proteínas. De manera similar, muestras de tejido de segmentos adjuntos del vaso sanguíneo, el miocardio así como los órganos tal como el pulmón, el hígado, el riñón y el músculo esquelético se analizan para detectar marcadores virales para determinar la distribución local y sistémica. Las muestras de sangre se almacenan antes y después de las pruebas y se analizan para detectar lesiones causadas en el sistema hematopoiético y para determinar los parámetros del hígado, del corazón, del músculo y del riñón

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un virus adeno-asociado, en donde el virus adeno-asociado comprende lo siguiente:

5 a) una proteína no quinasa asociada a la quinasa de adhesión focal (FRNK) o un derivado de la misma conservando la actividad funcional de la FRNK, o

10 b) un ácido nucleico que codifica la FRNK o un derivado de la misma conservando la actividad funcional de la FRNK, o

15 uso de un ácido nucleico que codifica para un virus adeno-asociado, en donde el ácido nucleico comprende un ácido nucleico codificando la FRNK, para el recubrimiento de un stent y/o el recubrimiento de un catéter.

15 2. El uso según la reivindicación 1, en donde la FRNK comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ. ID. NO. 1 o la SEQ. ID. NO. 2.

20 3. El uso según la reivindicación 1, en donde la FRNK está codificada por un ácido nucleico según la SEQ. ID. NO. 3 o la SEQ. ID. NO. 4.

25 4. El uso según la reivindicación 1, en donde la FRNK está codificada por un ácido nucleico que hibrida con la secuencia de ácido nucleico según la SEQ. ID. NO. 3 o la SEQ. ID. NO. 4.

25 5. El uso según la reivindicación 1, en donde la FRNK está codificada por un ácido nucleico que, sin la degenerescencia del código genético, hibridaría con la secuencia de ácido nucléico según la SEQ. ID. NO. 3 o la SEQ. ID. NO. 4.

30 6. Stent recubierto con un virus adeno-asociado como descrito en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, o recubierto con un ácido nucleico que codifica el virus adeno-asociado como descrito en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

35 7. Catéter recubierto con un virus adeno-asociado según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, o recubierto con un ácido nucléico que codifica el virus adeno-asociado como descrito en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

8. Uso de un stent según la reivindicación 6 para la producción de un medicamento o de un dispositivo médico.

9. Uso de un catéter según la reivindicación 7 para la producción de un medicamento o de un dispositivo médico.

40 10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9, en donde el medicamento y/o el dispositivo médico sirve para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad coronaria y/o vascular periférica.

45 11. El uso según la reivindicación 10, en donde la enfermedad coronaria y/o vascular periférica se selecciona del grupo que comprende las siguientes enfermedades: la reestenosis, la angiogénesis, la angina de pecho, el ataque cardíaco, el síndrome coronario agudo, la enfermedad de oclusión arterial periférica, la vasculitis, la trombosis, la estenosis carotídea, el accidente cerebrovascular, el infarto, la gangrena, la úlcera arterial, la trombosis venosa y la amputación de una extremidad cualquiera.

50

55

60

65

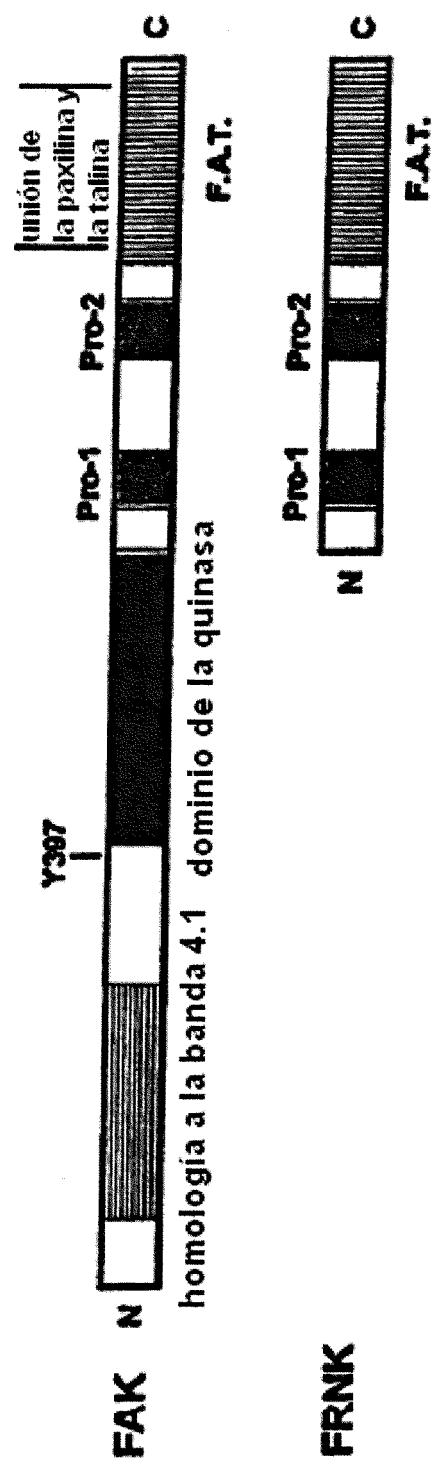
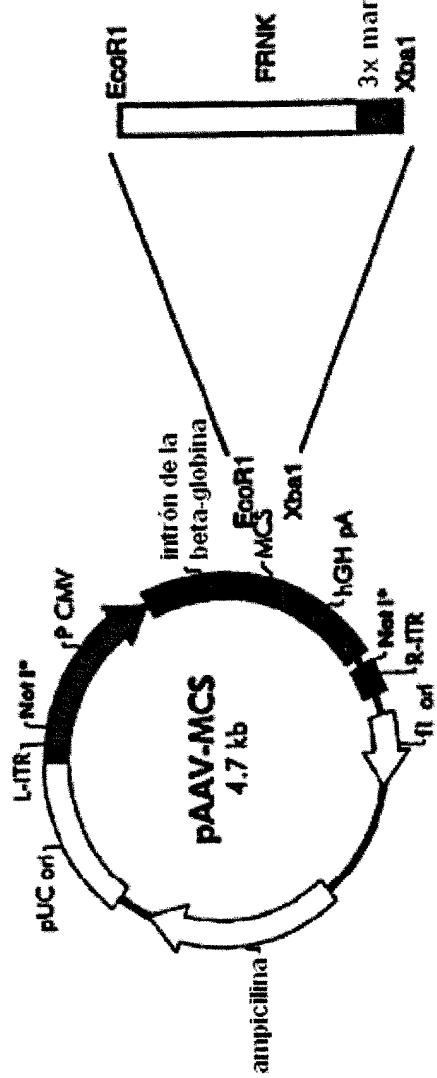


Fig. 1



2A

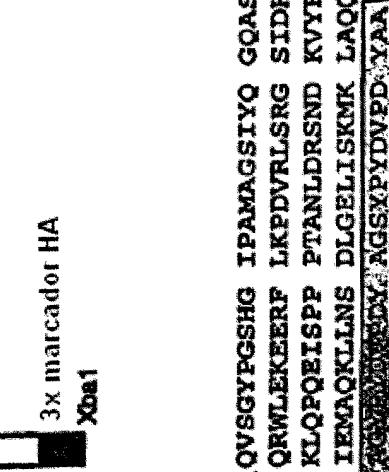


Fig. 2B

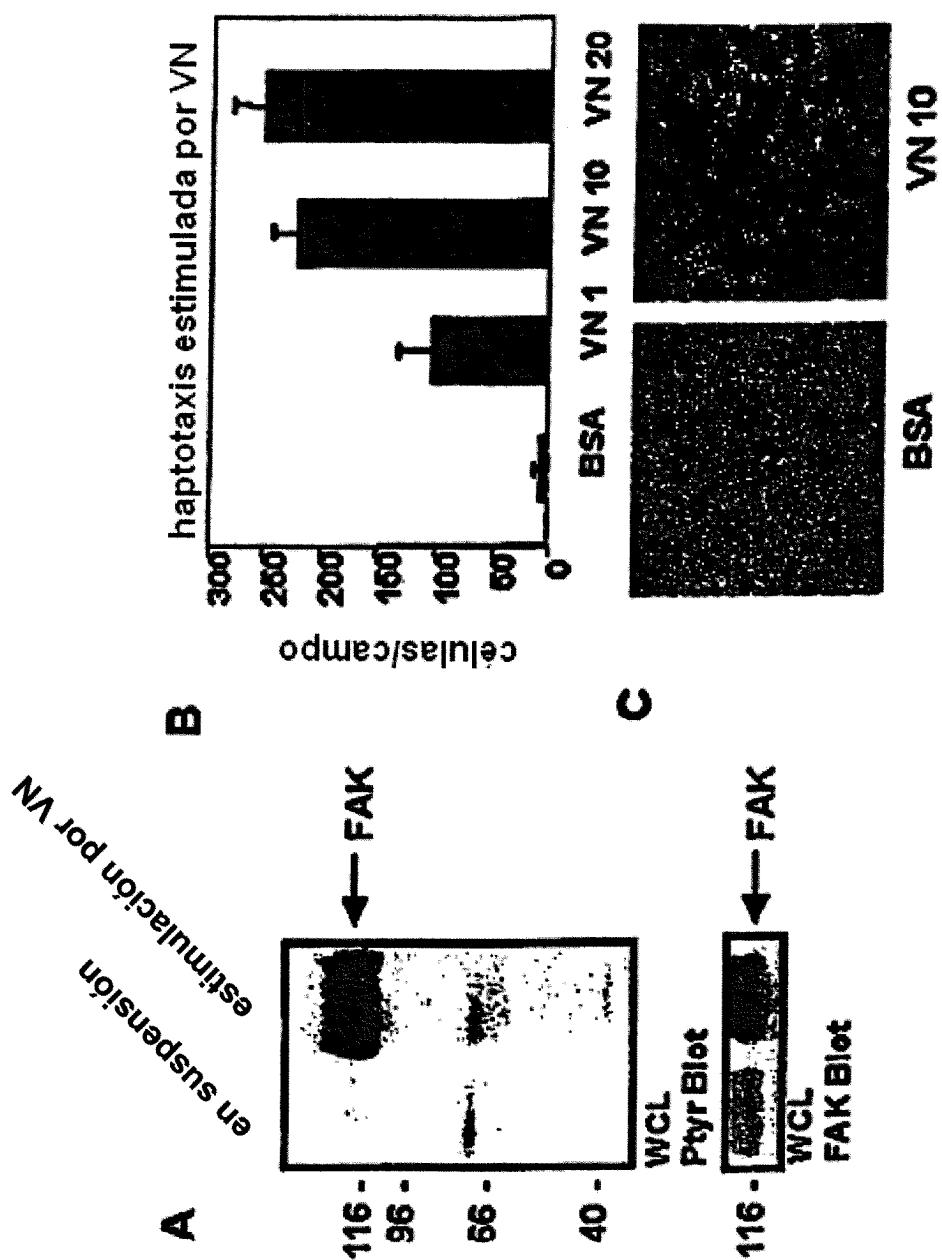


Fig. 3

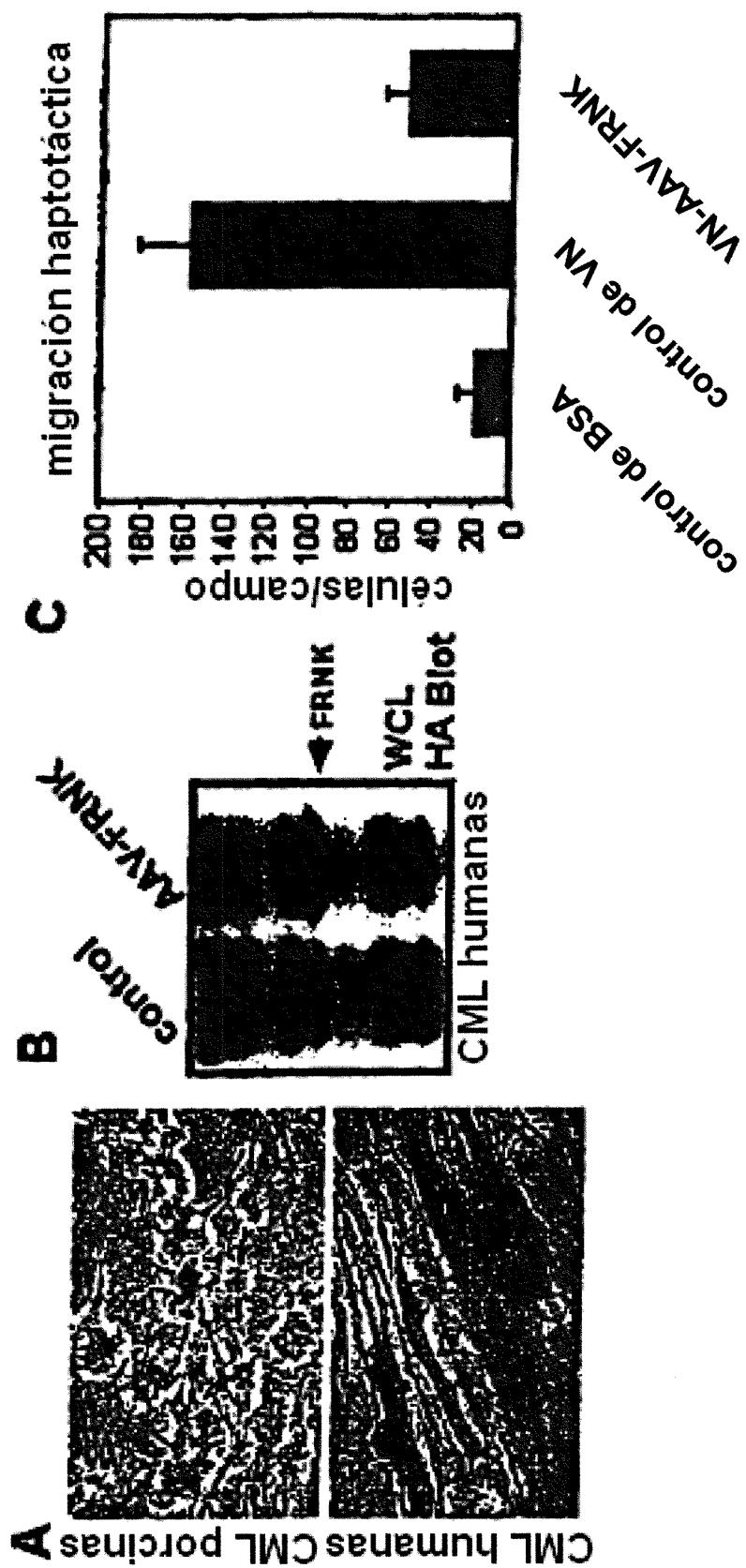


Fig. 4

ES 2 286 644 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
<120> Uso de la proteína no quinasa asociada a la FAK para la inhibición de la estenosis y la reestenosis  
<130> U 10009 PCT  
<160> 4

10 <170> PatentIn version 3.1  
<210> 1  
<211> 360  
<212> PRT  
15 <213> *Homo sapiens*  
<220>  
<221> MISC\_\_FEATURE  
20 <223> secuencia de aminoácidos de la FRNK humana  
<400> 1

25 Met Glu Ser Arg Arg Gln Ala Thr Val Ser Trp Asp Ser Gly Gly Ser  
1 5 10 15

30 Asp Glu Ala Pro Pro Lys Pro Ser Arg Pro Gly Tyr Pro Ser Pro Arg  
20 25 30

35 Ser Ser Glu Gly Phe Tyr Pro Ser Pro Gln His Met Val Gln Thr Asn  
35 40 45

40 His Tyr Gln Val Ser Gly Tyr Pro Gly Ser His Gly Ile Thr Ala Met  
50 55 60

45 Ala Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Gln Ala Ser Leu Leu Asp Gln Thr Asp  
65 70 75 80

50 Ser Trp Asn His Arg Pro Gln Glu Ile Ala Met Trp Gln Pro Asn Val  
85 90 95

55 Glu Asp Ser Thr Val Leu Asp Leu Arg Gly Ile Gly Gln Val Leu Pro  
100 105 110

60 Thr His Leu Met Glu Glu Arg Leu Ile Arg Gln Gln Gln Glu Met Glu  
115 120 125

65 Glu Asp Gln Arg Trp Leu Glu Lys Glu Glu Arg Phe Leu Lys Pro Asp  
130 135 140

70 Val Arg Leu Ser Arg Gly Ser Ile Asp Arg Glu Asp Gly Ser Leu Gln  
145 150 155 160

ES 2 286 644 T3

Gly Pro Ile Gly Asn Gln His Ile Tyr Gln Pro Val Gly Lys Pro Asp  
165 170 175

5

Pro Ala Ala Pro Pro Lys Lys Pro Pro Arg Pro Gly Ala Pro Gly His  
180 185 190

10

Leu Gly Ser Leu Ala Ser Leu Ser Ser Pro Ala Asp Ser Tyr Asn Glu  
195 200 205

15

Gly Val Lys Leu Gln Pro Gln Glu Ile Ser Pro Pro Pro Thr Ala Asn  
210 215 220

20

Leu Asp Arg Ser Asn Asp Lys Val Tyr Glu Asn Val Thr Gly Leu Val  
225 230 235 240

25

Lys Ala Val Ile Glu Met Ser Ser Lys Ile Gln Pro Ala Pro Pro Glu  
245 250 255

Glu Tyr Val Pro Met Val Lys Glu Val Gly Leu Ala Leu Arg Thr Leu  
260 265 270

30

Leu Ala Thr Val Asp Glu Thr Ile Pro Leu Leu Pro Ala Ser Thr His  
275 280 285

35

Arg Glu Ile Glu Met Ala Gln Lys Leu Leu Asn Ser Asp Leu Gly Glu  
290 295 300

40

Leu Ile Asn Lys Met Lys Leu Ala Gln Gln Tyr Val Met Thr Ser Leu  
305 310 315 320

45

Gln Gln Glu Tyr Lys Lys Gln Met Leu Thr Ala Ala His Ala Leu Ala  
325 330 335

50

Val Asp Ala Lys Asn Leu Leu Asp Val Ile Asp Gln Ala Arg Leu Lys  
340 345 350

Met Leu Gly Gln Thr Arg Pro His  
355 360

55 <210> 2

<211> 360

<212> PRT

60 <213> *Mus musculus*

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> secuencia de aminoácidos de la FRNK murina

65

ES 2 286 644 T3

<400> 2

5           Met Glu Ser Arg Arg Gln Ala Thr Val Ser Trp Asp Ser Gly Gly Ser  
1                       5                           10                           15

10           Asp Glu Ala Pro Pro Lys Pro Ser Arg Pro Gly Tyr Pro Ser Pro Arg  
20                   25                           30

15           Ser Ser Glu Gly Phe Tyr Pro Ser Pro Gln His Met Val Gln Thr Asn  
35                   40                           45

20           His Tyr Gln Val Ser Gly Tyr Pro Gly Ser His Gly Ile Pro Ala Met  
50                   55                           60

25           Ala Gly Ser Ile Tyr Gln Gly Gln Ala Ser Leu Leu Asp Gln Thr Glu  
65                   70                           75                           80

30           Leu Trp Asn His Arg Pro Gln Glu Met Ser Met Trp Gln Pro Ser Val  
85                   90                           95

35           Glu Asp Ser Ala Ala Leu Asp Leu Arg Gly Met Gly Gln Val Leu Pro  
100                   105                           110

40           Pro His Leu Met Glu Glu Arg Leu Ile Arg Gln Gln Gln Glu Met Glu  
115                   120                           125

45           Glu Asp Gln Arg Trp Leu Glu Lys Glu Glu Arg Phe Leu Lys Pro Asp  
130                   135                           140

50           Val Arg Leu Ser Arg Gly Ser Ile Asp Arg Glu Asp Gly Ser Phe Gln  
145                   150                           155                           160

55           Gly Pro Thr Gly Asn Gln His Ile Tyr Gln Pro Val Gly Lys Pro Asp  
165                   170                           175

60           Pro Ala Ala Pro Pro Lys Lys Pro Pro Arg Pro Gly Ala Pro Gly His  
180                   185                           190

65           Leu Ser Asn Leu Ser Ser Ile Ser Ser Pro Ala Asp Ser Tyr Asn Glu  
195                   200                           205

70           Gly Val Lys Leu Gln Pro Gln Glu Ile Ser Pro Pro Pro Thr Ala Asn  
210                   215                           220

75           Leu Asp Arg Ser Asn Asp Lys Val Tyr Glu Asn Val Thr Gly Leu Val

# ES 2 286 644 T3

	225	230	235	240
5	Lys Ala Val Ile Glu Met Ser Ser Lys Ile Gln Pro Ala Pro Pro Glu			
	245	250	255	
10	Glu Tyr Val Pro Met Val Lys Glu Val Gly Leu Ala Leu Arg Thr Leu			
	260	265	270	
15	Leu Ala Thr Val Asp Glu Thr Ile Pro Ala Leu Pro Ala Ser Thr His			
	275	280	285	
20	Arg Glu Ile Glu Met Ala Gln Lys Leu Leu Asn Ser Asp Leu Gly Glu			
	290	295	300	
25	Leu Ile Ser Lys Met Lys Leu Ala Gln Gln Tyr Val Met Thr Ser Leu			
	305	310	315	320
	Gln Gln Glu Tyr Lys Lys Gln Met Leu Thr Ala Ala His Ala Leu Ala			
	325	330	335	
30	Val Asp Ala Lys Asn Leu Leu Asp Val Ile Asp Gln Ala Arg Leu Lys			
	340	345	350	
	Met Leu Gly Gln Thr Arg Pro His			
	355	360		
35	<210> 3			
	<211> 1083			
	<212> ADN			
40	<213> <i>Homo sapiens</i>			
	<220>			
	<221> misc_feature			
45	<223> secuencia codificando la FRNK humana			
	<400> 3			
50	atggagtcga gaagacaggc cacagtgtcc tgggactccg gagggtctga tgaagcacccg			
	cccaagccca gcagaccggg ttatcccaagt ccgaggtcca gcgaaggatt ttatcccagc			
55	ccacagcaca tggcacaaac caatcattac caggttctg gctaccctgg ttcacatgga			
	atcacagcca tggctggcag catctatcca ggtcaggcat ctctttgga ccaaacagat			
	tcatggaatc atagacctca ggagatagca atgtggcage ccaatgtgga ggactctaca			
60	gtattggacc tgcgaggat tggcaagtg ttgcacaccc atctgatgga agagcgtcta			
	atccgacagc aacagggaaat ggaagaagat cagcgctggc tggaaaaaga gggaaagattt			
65	ctgaaacctg atgtgagact ctctcgaggc agtattgaca gggaggatgg aagtcttcag			

# ES 2 286 644 T3

	<pre> ggtcggattg gaaaccaaca tataatcatc cctgtggta aaccagatcc tgcagctcca ccaaagaaac cgcctcgccc tggagctccc ggteatctgg gaagccttgc cagcctcagc 5 agccctgtcg acagctacaa cgagggtgcc aagttttagc cccagggaaat cagccccccct cctactgcca acctggaccc gtcgaatgtat aagggtgtacg agaatgtgac gggcctggtg 10 aaagctgtca tcgagatgtc cagtaaaatc cagccagccc caccagagga gtatgtccct atggtgaagg aagtccggctt ggcctgaggg acattattgg ccactgtgga tgagaccatt 15 cccctctac cagccagcac ccaccgagag attgagatgg cacagaagct attgaactct gacctgggtg agctcatcaa caagatgaaa ctggcccagc agtatgtcat gaccagccctc cagcaagagt acaaaaagca aatgtgtact gctgtcaag ccctggctgt ggatgccaaa 20 aacttactcg atgtcattgtt ccaagcaaga ctgaaaatgc ttgggcagac gagaccacac tga </pre>	540 600 660 720 780 840 900 960 1020 1080 1083	
25	<210> 4		
	<211> 1083		
	<212> ADN		
30	<213> <i>Mus musculus</i>		
	<220>		
	<221> misc_feature		
35	<223> secuencia codificando la FRNK murina		
	<400> 4		
40	atggaaatcca gaagacagggc taccgtgtcc tgggactctg gagggtctga tgaagcacca ccaaagccca gcagacctgg ttatccatgc ccgagatcca gtgaaggatt ttatcccagc 45 ccacagcaca tggtccagac caatcaatc caggtctctg gctacccggg ttccatgga atcccagcca tggctggcag catttaccaa ggtcaggcat ctcttctgga ccagacagaa ttgttggaaatc acagacctca ggagatgtcc atgtggcagc ccagtgtgga ggattcggca 50 gctttggacc ttcgagggat gggacaggtg cttcccccctc acctgtatgga agagcggctc atccgacagc agcaggaaat ggaagaagac cagcgctggc tggagaagga agagcgattc ctgaaacctg atgtgaggct ctctcgagggc agcatcgaca gggaaagacgg gagttttcag 55 ggccgactg gaaaccaaca catctatcatc cctgtggggta agccagatcc tgcagctcca ccaaagaaac ctccctcgccc tggagccatc ggccacctaa gcaacctgtc cagcatcagc 60 agccctgtcg acagctacaa tgagggtgcc aagttttagc cccagggaaat cagccccccct cccactgcca acctttgaccc gtcgaatgtac aaggatatgt agaatgtgac aggccctgtg 65 aaggctgtca tcgagatgtc cagcaaaatc cagccagtc ctccagaaga gtacgtccct		60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780

ES 2 286 644 T3

	<b>atggtaagg aagttggcct ggccctgcgg accttactag ccacggtgga tgagaccatt</b>	<b>840</b>
	<b>cctgcttcc cagccagcac tcatcgagag atcgagatgg cacagaagct gctgaactcc</b>	<b>900</b>
5	<b>gacttaggcg agctcatcg caagatgaag ctggcgccgc agtacgtcat gaccagcctg</b>	<b>960</b>
	<b>cagcaggagt ataagaagca gatgctgaca gctgctcacg ccctggctgt ggatgccaag</b>	<b>1020</b>
10	<b>aacctacttg atgttattga tcaagcaaga ctgaaaatgc tagggcagac acggccacac</b>	<b>1080</b>
	<b>tga</b>	<b>1083</b>

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65