



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 941**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07777420 .6**

96 Fecha de presentación : **06.06.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2024511**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.02.2009**

54

Título: **Complejo regulador de colesterol de SIRT1 y LXR y métodos de uso.**

30

Prioridad: **06.06.2006 US 811154 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.07.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.07.2011

73

Titular/es: **Massachusetts Institute of Technology
77 Massachusetts avenue
Cambridge, Massachusetts 02139, US**

72

Inventor/es: **Guarente, Leonard;
Krieger, Monty y
Li, Xiaoling**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 362 941 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

Complejo regulador de colesterol de sirt1 y lxr y métodos de uso

Antecedentes de la invención

5 La homeostasis del colesterol se mantiene mediante el equilibrio entre la ingesta con la dieta, la síntesis de nuevo colesterol, el transporte, el metabolismo y la excreción. Niveles bajos de lipoproteína de elevada densidad (HDL, del inglés "high density lipoprotein") y niveles altos de lipoproteína de baja densidad (LDL, del inglés "low density lipoprotein") se asocian a hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular¹ y enfermedad de Alzheimer²⁻⁶, las enfermedades asociadas a la edad que son causas principales de mortalidad en la población de media edad y de edad avanzada. Tanto los factores genéticos como los ambientales contribuyen a la progresión de la enfermedad cardiovascular y la enfermedad de Alzheimer, y el riesgo de estos trastornos aumenta con la edad. Sin embargo, se sabe poco de los mecanismos subyacentes a través de los cuales los factores genéticos son sensibles al entorno ambiental para mediar en estas enfermedades asociadas al envejecimiento.

15 El regulador de información silencioso 2 (Sir2) es un regulador crítico de la esperanza de vida como respuesta a cambios ambientales. El gen Sir2 es un determinante de longevidad en levadura, *C. elegans*⁷ y *Drosophila*^{8,9}. Tanto en levadura^{10,11} como en *Drosophila*^{8,9}, también se requiere la actividad Sir2 para la extensión de la esperanza de vida proporcionada por la restricción calórica. Bioquímicamente, la Sir2 y sus homólogos (sirtuínas) son un grupo de desacetilasas de proteína dependientes de NAD⁺ altamente conservadas¹²⁻¹⁴. El requerimiento de NAD⁺ puede hacer que las sirtuínas monitoricen el metabolismo celular y modulen los procesos celulares que afectan al envejecimiento. En mamíferos, la SIRT1, un ortólogo de mamífero de la proteína Sir2, tiene múltiples sustratos de proteína y es capaz de regular procesos relacionados con el envejecimiento, tal como el ciclo celular, la apoptosis, la respuesta al estrés oxidativo y neurodegeneración¹⁵⁻²⁰. En estos procesos, la SIRT1 es capaz de desplazar el equilibrio entre muerte celular y supervivencia celular, proporcionando de este modo resistencia al estrés²¹.

25 El metabolismo del colesterol y de la grasa está regulado por muchos factores ambientales y celulares comunes. Los Receptores Activados por Proliferador de Peroxisoma (PPARs, del inglés "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors") y los Receptores X Hepáticos (LXRs, del inglés "Liver X Receptors"), dos subclases de receptores nucleares sensibles a péptidos, desempeñan funciones críticas en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Estudios recientes han demostrado que en el tejido de grasa blanca, la SIRT1 interactúa con el receptor nuclear PPAR γ a través de co-represor de receptor nuclear (N-CoR) y promueve la movilización de grasas tras privación alimentaria²². La SIRT1 también es capaz de interactuar y modificar el coactivador PPAR γ PGC-1 α para regular la homeostasis hepática de glucosa^{23,24}. La Patente de EE.UU. 6.048.903 muestra que el nivel de lipoproteínas de densidad pesada (HDL) en la sangre de un sujeto humano puede facilitarse mediante la administración de trans-resveratrol al sujeto, y que dicha sustancia reduce el nivel de lipoproteínas de densidad ligera (LDL) en la sangre del sujeto.

35 La implicación de la SIRT1 en el metabolismo de grasas y en la homeostasis de glucosa demuestra el potencial de que esta proteína también podría regular la homeostasis de colesterol en mamíferos. La presente invención estudia estos nuevos mecanismos de homeostasis de colesterol.

Sumario de la invención

40 La presente invención se refiere de forma general a composiciones y métodos útiles en el campo de la homeostasis de colesterol y el transporte de colesterol inverso.

En un primer aspecto, la invención proporciona un complejo aislado que contiene una proteína SIRT1 de mamífero y una proteína LXR de mamífero. En determinadas realizaciones este complejo contiene adicionalmente un elemento de respuesta de LXR.

45 En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para formar un complejo que contiene una proteína SIRT1 de mamífero y una proteína LXR de mamífero. El método incluye la combinación de composiciones que contienen una proteína SIRT1 de mamífero, una proteína LXR de mamífero y un fragmento de un ácido nucleico celular que incluye un elemento de respuesta de LXR.

50 En otro aspecto adicional, la invención proporciona un método para identificar un agente que modula la formación de un complejo que comprende una proteína SIRT1 de mamífero y una proteína LXR de mamífero. Este método incluye las etapas de:

- combinar composiciones que contienen una proteína SIRT1 de mamífero, una proteína LXR de mamífero y un fragmento de un ácido nucleico celular que incluye un elemento de respuesta de LXR, proporcionando de este modo una composición de complejo;
- adicionalmente poner en contacto una de las composiciones que contiene la proteína SIRT1 de mamífero, la

composición que contiene la proteína LXR de mamífero, o la composición que contiene el fragmento de ácido nucleico celular con una cuarta composición que incluye el agente antes de la etapa de combinación, o poner en contacto la composición de complejo con la cuarta composición que incluye el agente después de la etapa de combinación; y

- 5 – determinar si la formación del complejo está modulada por el agente.

En determinadas realizaciones de este método, el agente aumenta la formación del complejo. En realizaciones adicionales, la determinación se lleva a cabo mediante comparación con una composición de control que contiene el agente.

10 La Patente de EE. UU. 6.835.563 se refiere a polipéptidos ABC1 y a métodos para aumentar el eflujo de colesterol. El documento US2005/136429 describe la evaluación de una molécula de SIRT1 en un sujeto.

También se describe un método para aumentar la relación de colesterol ligado a lipoproteína de alta densidad (HDL) respecto al colesterol total en el plasma de un mamífero, en donde el método incluye la administración al mamífero de un agente que estimula la actividad de SIRT1. Por ejemplo, el agente incluye T0901317.

15 También se describe un método para aumentar la relación de colesterol ligado a lipoproteína de alta densidad (HDL) respecto al colesterol total en el plasma de un mamífero, en donde el método incluye la administración al mamífero de un agente que promueve la formación de un complejo que contiene una proteína SIRT1 de mamífero y una proteína LXR de mamífero. Por ejemplo, el agente incluye 22(R)-hidroxicolesterol o ácido 9-cis retinoico, o ambos.

20 También se describe un método para promover el eflujo de colesterol mediado por ABCA1 desde una célula de mamífero, en donde el método incluye la introducción en la célula de un ácido nucleico que contiene una secuencia que codifica una proteína desacetilasa. Por ejemplo, la proteína desacetilasa es una Sir2 eucariótica o una SIRT1 de mamífero. Otros ejemplos de este método incluyen una etapa adicional de poner en contacto la célula con un agente que estimula la actividad de SIRT1, tal como T0901317. La célula se puede poner en contacto adicionalmente con un agente que promueve la formación de un complejo que contiene una proteína SIRT1 de mamífero y una proteína LXR de mamífero. Por ejemplo, el complejo que promueve incluye 22(R)-hidroxicolesterol o ácido 9-cis retinoico, o ambos.

25 También se describe un método para tratar a un sujeto que se considera que tiene un nivel de actividad de SIRT1 que está por debajo de lo normal. Dicho sujeto exhibe un nivel de colesterol HDL, y una relación de colesterol HDL a colesterol LDL, que se consideran por debajo de lo normal. El método incluye la administración de un ácido nucleico que codifica SIRT1 específica de especie a un sujeto, en donde el ácido nucleico es efectivo para expresar una cantidad terapéuticamente efectiva de SIRT1 en una célula del sujeto.

30 También se describe un método para determinar si una sustancia candidata modula un proceso dependiente de LXR. El método incluye la transfección de una célula con un plásmido que alberga un gen indicador dirigido operativamente por un LXRE; poner en contacto la célula con el candidato; y determinar si el candidato modula la expresión del gen indicador en comparación con una célula que no esté en contacto con el candidato; de tal modo que una diferencia detectada entre la presencia y la ausencia del candidato indica que el candidato modula el proceso dependiente de LXR.

35 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para determinar si una sustancia candidata modula un efecto dependiente de SIRT1 de un LXR. Este método incluye la transfección de una célula con un plásmido que alberga un gen SIRT1; transfectar adicionalmente la célula con un plásmido que alberga un gen indicador dirigido operativamente por un promotor LXRE; poner en contacto la célula con el candidato; y determinar si el candidato modula la expresión del gen indicador en comparación con una célula que no esté en contacto con el candidato; en donde la detección de una diferencia entre la presencia y la ausencia del candidato indica que el candidato modula el efecto dependiente de SIRT1 de un LXR.

40 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para determinar si una sustancia candidata modula la interacción de SIRT1 con un LXR. Este método incluye la transfección de una célula con un vector que alberga una secuencia que codifica un LXR etiquetado con un epítopo; transfectar adicionalmente la célula con un vector que alberga una secuencia que codifica una SIRT1; poner en contacto la célula con la sustancia candidata; lisar las células; poner en contacto los lisatos celulares con un anticuerpo específico de la etiqueta de epítopo; y recuperar los inmunoprecipitados que comprenden un complejo de la SIRT1 y el LXR con un adsorbente específico de anticuerpo; llevar a cabo un procedimiento de análisis por transferencia Western usando anticuerpos específicos de SIRT1 y un LXR; en donde la detección de una diferencia en la formación de complejo en presencia del candidato, en comparación con la ausencia del candidato, indica que el candidato modula la interacción de la SIRT1 con el LXR.

Breve descripción de las figuras

55 Figura 1. La pérdida de función de SIRT1 produce una alteración de la homeostasis de colesterol.

(a-c) Se analizaron muestras de plasma de ratones naturales (barra rellena), *SIRT1*^{+/-} (barra sombreada) y *SIRT1*^{-/-} (barra hueca) para determinar (a) el colesterol total, (b) el colesterol HDL, (c) el colesterol LDL.

(d) Perfiles de colesterol de lipoproteína de plasma FPLC en ratones naturales (diamante relleno) y *SIRT1*^{-/-} (diamante hueco).

5 (e) Contenidos de lípidos relativos en las fracciones HDL de ratones naturales (barra rellena) y *SIRT1*^{-/-} (barra abierta).

(f) Colesterol total de testículos e hígados de control natural (barra rellena) y de camada *SIRT1*^{-/-} (barra hueca).

(g) Eflujo mediado por ApoAI de [³H]-colesterol de fibroblastos embrionarios de ratón primarios (MEFs) (panel izquierdo) o de monocitos humanos THP-1 (panel derecho), con o sin pre-tratamiento con nicotinamida.

10 Figura 2. Expresión de ABCA1 e interacción con receptores nucleares de LXR.

(a) Expresión de ARNm de ABCA1 en hígados (panel izquierdo, determinado mediante PCR en tiempo real cuantitativa), y en testículos y ovarios (panel derecho, determinado mediante análisis de transferencia western de animales naturales (+/+) y *SIRT1*^{-/-} (-/-)).

(b) La inhibición de la actividad de SIRT1 reduce la actividad de promotor ABCA1.

15 (c) Efecto de deficiencia de SIRT1 sobre la actividad de promotor en MEFs.

(d) Interacción de SIRT1 con el LXRE de promotor ABCA1.

(e) La SIRT1 interactúa con LXR α y LXR β .

Figura 3. La deficiencia de SIRT1 compromete las respuestas normales a un agonista de LXR in vivo.

(a) El LXR actúa contra ARNms en hígados de ratones *SIRT1*^{-/-}.

20 (b) Niveles relativos de LXR actúan contra ARNms en hígados de ratones tratados con el agonista de LXR T0901317.

(c) Niveles de proteína ABCA1 en ratones naturales y *SIRT1*^{-/-} sin o con T0901317.

(d) Niveles de triglicéridos después de administración de T0901317 en ratones *SIRT1*^{-/-} acumulan niveles más bajos de triglicéridos en plasma e hígado.

25 (e) Inducción de colesterol en plasma tras alimentación de T0901317.

(f) Perfiles representativos de lipoproteína en plasma FPCL en ratones naturales y *SIRT1*^{-/-} antes (cuadrados rellenos) y después (cuadrados huecos) de alimentación de T0901317.

Figura 4. La SIRT1 regula la estabilidad y la actividad de LXR desacetilando la proteína LXR.

(a) Efecto de SIRT1 sobre la expresión de proteína de LXR *SIRT1*.

30 (b) Efecto de bloqueo de SIRT1 por interferencia de ARN en el nivel de LXR.

(c) Efecto de inhibidores sobre la expresión de proteína de LXR.

(d) La SIRT1 promueve la ubiquitinación de LXR.

(e) Acetilación de LXR *in vivo* y activación de LXR mediante 22(R)-HC y 9-cisRA.

(f) La SIRT1 desacetila HA-LXR β .

35 Figura 5. Representación esquemática del efecto de la inhibición de SIRT1 o de la degradación de LXR mediada por proteasoma sobre la actividad de transcripción de LXR sobre el promotor ABCA1.

Descripción detallada de la invención**Tabla de secuencias**

Tabla 1. Tabla de secuencias en la descripción.

SEC ID N°:	IDENTIFICACIÓN	N° DE ACCESO GENBANK	TIPO
1	SIRT1 humana	NP 036370	Prot
2	SIRT1 murina	NP 062786	Prot
3	Receptor X hepático humano alfa	NP 062786	Prot
4	Receptor X hepático humano beta	NP 009052.3	Prot
5	Receptor X hepático murino alfa	NP 038867.1	Prot
6	Receptor X hepático murino beta	NP 033499.1	Prot
7	SIRT1 humana	NM 012238	ARNm
8	SIRT1 murina	NM 019812	ARNm
9	Receptor X hepático humano alfa	NM 005693	ARNm
10	Receptor X hepático humano beta	NM 007121	ARNm
11	Receptor X hepático murino alfa	NM 013839	ARNm
12	Receptor X hepático murino beta	NM 009473	ARNm
13	Cebador		ADN
14	Cebador		ADN
15	Cebador		ADN
16	Cebador		ADN
17	Cebador		ADN
18	Cebador		ADN
19	Cebador		ADN
20	Cebador		ADN

5 Tal como se usa en la presente memoria, HDL (lipoproteína de alta densidad) se refiere a una clase de lipoproteína de plasma con una elevada proporción de proteína, que incluye las apolipoproteínas A, C, D y E. La HDL incorpora y transporta colesterol, tanto libre como esterificado, en el plasma en forma de complejo HDL-colesterol. El término HDL puede usarse de un modo dependiente del contexto para designar colesterol ligado a partículas de HDL.

10 Tal como se usa en la presente memoria, LDL (lipoproteína de baja densidad) se refiere a una clase de lipoproteína de plasma con una elevada proporción de lípidos, que incluye colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos. Principalmente incluye apolipoproteína B-100 y apolipoproteína E. La LDL incorpora y transporta colesterol en el plasma. El término LDL puede usarse de un modo dependiente del contexto para designar colesterol ligado a partículas de LDL.

15 Tal como se usa en la presente memoria, el término “aislado” y otros similares se refieren a una sustancia que ha sido purificada a partir de un estado natural mediante la eliminación de al menos un componente con el cual se encuentra la sustancia de forma natural. El término “purificado” puede usarse como sinónimo de “aislado”. Se entiende que estos términos no requieren que la sustancia tenga ningún nivel predeterminado de pureza.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “un complejo” y términos similares se refieren a una

combinación de dos o más sustancias combinadas unas con otras de forma suficientemente estable para someterse a un proceso de aislamiento y ser caracterizadas como combinación. Los componentes del complejo puede estar ligados directamente unos a otros, o la combinación puede incluir un componente intermedio facilitador de tal modo que los componentes identificados no están directamente en contacto unos con otros. Se puede formar un complejo mediante interacciones no covalentes que unan a los componentes o mediante enlaces covalentes entre ellos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “colesterol” generalmente se refiere a la presencia total de colesterol como colesterol y como ésteres colesterílicos. En determinados contextos, que serán evidentes para el especialista en la técnica, se puede usar “colesterol” para referirse únicamente a colesterol libre.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “tratamiento” y términos y expresiones similares se refieren a la aplicación o administración de un agente terapéutico a un sujeto que tiene una enfermedad o afección, un síntoma de enfermedad, o una predisposición hacia una enfermedad, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o línea celular procedentes del sujeto. El tratamiento pretende promover la curación o el alivio, alteración, remedio, mejoría o afectación de la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones “cantidad terapéuticamente efectiva” y “cantidad profilácticamente efectiva” se refieren a una cantidad que proporcione un beneficio terapéutico en el tratamiento de una enfermedad, o un efecto que proporcione la prevención o disminuir la gravedad de la enfermedad, respectivamente. La cantidad específica que es terapéuticamente efectiva puede determinarse fácilmente por el especialista médico empleando determinaciones de la respuesta en un sujeto tratado, y puede variar dependiendo de factores conocidos en la técnica, tales como la naturaleza de la enfermedad, el historial del sujeto y su edad, el estadio de la enfermedad y la administración de otros agentes terapéuticos.

Tal como se usa en la presente memoria, una “composición farmacéutica” se refiere a una composición que incluye una cantidad farmacológicamente efectiva de un polinucleótido y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en la presente memoria, “cantidad farmacológicamente efectiva”, “cantidad terapéuticamente efectiva” o simplemente “cantidad efectiva” se refiere a la cantidad de polinucleótido inhibidor que es eficaz para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo pretendido. Por ejemplo, si un tratamiento clínico dado se considera efectivo cuando existe al menos un cambio mínimo mensurable en un parámetro clínico asociado a una enfermedad o trastorno, una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco para el tratamiento de dicha enfermedad o trastorno es la cantidad necesaria para efectuar al menos un cambio en el parámetro.

La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a una composición para la administración de un agente terapéutico que es al menos fisiológicamente aceptable y puede ser aprobado por una agencia reguladora.

Polipéptidos SIRT1

Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones “un polipéptido SIRT1”, “una proteína SIRT1”, y otros términos y expresiones relacionados, se refieren a SIRT1 natural, a un SIRT1 mutante, a un SIRT1 variante y a fragmentos y formas maduras biológicamente activos del mismo. Una proteína SIRT1 importante para ser usada en la presente invención es la SIRT1 humana. La secuencia de aminoácidos de la SIRT1 humana se encuentra en el GenBank con N° de acceso NP_036370, donde se describe que está compuesta por 747 residuos de aminoácido, se muestra en la Tabla 2 usando el código convencional de una letra para los aminoácidos (International Union Of Biochemistry And Molecular Biology, Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology, etc., Parte 1, Sección A: Amino-Acid Nomenclature, Sección 3AA-1. Names Of Common Alpha-Amino Acids, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/> y J. Biol. Chem., 1985, 260,14-42).

Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de la SIRT1 humana.

```

1 madeaalalq pggspsaaga dreasspag eplrkrprrd gpglerspge ppgaaperev
61 paaargcpga aaaalwreae aeaaaaggeq eaqataaage gdngpplqgp srepladnl
121 ydedddege eeeeeaaai gyrdnllfgd eittngfhsc esdeedrash assdwtprp
181 rigpytfvqq hlmigtdprt ilkdllpeti pppelddmtl wqiviniise ppkrkkkrdi
241 ntiedavkll qeckkiivlt gagvsvscgi pdfrsrdgiy arlavdfpdl pdpqamfdie
301 yfrkdprpff kfakeiypgq fqpslchkfii alsdkegkll rnytqnidtl eqvagiqrii
361 qchgsfatas clickykvdc eavrgdifnq vvprcprcpa deplaimkpe ivffgenlpe
421 qfhramkydk devdllivig sslkvrpval ipssiphevp qilinreplp hlhfdvellg
481 dcdviinelc hrlggeyakl ccnpvklsei tekpprtqke laylselppt plhvsessss
541 pertspdds vivtlldqaa ksnddlvse skgcmekpq evqtsrnves iaegmenpdl
601 knvgsstgek nertsvagt v rkcwprvak eqisrldgn qylflppnry ifhgaevysd
661 seddvlsess cgnsdsdgtc qspaleepme deseieefyn gledesdvpe raggagfgtd
721 gddqeainea isvkqevtdm nypsnks
    
```

(SEC ID N°: 1)

La secuencia de aminoácidos de SIRT1 murina está disponible en el GenBank con n° de acceso NP_062786, donde se describe que está compuesta por 737 residuos de aminoácido, se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de aminoácidos de la SIRT1 murina.

```

1 madevalalq aagspsaaaa measqpade plkrprrdg pglgrspgep saavapaaag
61 ceaaaaapa alwreaagaa asaereapat avagdgngs glrrepraad dfddegeeee
121 deaaaaaaaa aigyrnlll tdgllngfh scesdddrdt shasssdwtp rprigpytfv
181 qghlmigtdp rtilkdllpe tipppelddm tlwqivini seppkrkkkr dintiedavk
241 llqeckkiiv ltgagvsusc gipdfrrsdg iyarlavdfr dlpdpqamfd ieyfrkdprp
301 ffkfakeiyp gqfqpchlck fialsdkegk llrnytqnid tleqvagiqr ilqchgsfat
361 asclickykv dceavrgdif nqvvrprcpc padeplaimk peivffgenl peqfhrmkky
421 dkdevdliiv igsslkvrpv alipssiphe vpqilinrep lphlhfdvel lgdcdviine
481 lchrlggeya klccnrvkls eitekpprpq kelvhlsepl ptplhiseds sspertvpqd
541 ssviatlvdq atnnnvndle vsesscveek pgevqtsrnv eninvenpdf kavgsstadk
601 nertsvaetv rkcwprlak eqiskrlegn qylfvppnry ifhgaevysd seddvlsess
661 cgsnsdsgtc qspsleeple desciecfyn gledtderpe caggsqfgad ggdqevvnea
721 iatrqeltdv nypsdks
    
```

(SEC ID N°: 2)

5 La secuencia de aminoácidos de receptor alfa X de hígado humano está disponible en el GenBank con n° de acceso NP_062786, donde se describe que está compuesta por 447 residuos de aminoácido, se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos de receptor alfa X de hígado humano.

```

MSLWLGAPVPDI PPDSAVELWKPGAQDASSQAQGGSSCILREEA
RMPHSAGGTAGVGLAAEPTALLTRAEPPEPTAIRPQKRKKGPAPKMLGNELCSVCG
DKASGFHYNVLSCEGCKGFFRRSVIKGAHYICHSGGHCPMDTYMRRKCQECRLRKCRCQ
AGMREECVLSEEQIRLKKLKRQEEQAHATSLPPRRSSPPQILPQLSPEQLGMIEKLV
AAQQCNRRS FSDRLRVTWPMPADPHSREARQORFAHFTELAIVSVQEI VDFAKQLP
GFLQLSREDQIALLKTS AIEVMLETSRRYNPGSESITFLKDFSYNREDFAKAGLQVE
FINPIFEFSRAMNELQLNDAEFALLIAISIFSADRPNVQDQLQVERLQHTYVEALHAY
VSIHHPHDLRMFPRMLMKLVSLRTLSSVHSEQVFALRLQDKKLPPLLSEIWDVHE
    
```

(SEC ID N°: 3)

10 La secuencia de aminoácidos de receptor beta X de hígado humano está disponible en el GenBank con n° de acceso NP_009052.3, donde se describe que está compuesta por 461 residuos de aminoácido, se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de aminoácidos de receptor beta X de hígado humano.

```

MSSPTTSSLDTPLPGNGPPQPGAPSSSPTVKEEGPEPWPGGPD
DVPGTDEASSACSTDWVIPDPEEPPERKRKKGPAPKMLGHELRCRVCGDKASGFHYNVL
SCEGCKGFFRRSVVRGGARRYACRGGGTQMDAFMRRKCQECRLRKCQECAGMREQCVL
SEEQIRKKKIRKQQQESQSQSQSPVGPQSSSSASGPGASPGGSEAGSQSGEGEV
QLTAAQELMIQQLVAAQLQCNKRS FSDQPKVTPWPLGADPQSRDARQORFAHFTELA
ISVQEI VDFAKQVPGFGLQLGREDQIALLKASTIEIMLETTARRYNHETECITFLKDF
YSKDDFHFRAGLQVEFINPIFEFSRAMRRLGLDDAEYALLIAINIFSADRPNVQEPGRV
EALQQPYVEALLSYTRIKRPDQLRFPRLMKLVSLRTLSSVHSEQVFALRLQDKKLP
PLLSEIWDVHE
    
```

(SEC ID N°: 4)

15 La secuencia de aminoácidos de receptor alfa X de hígado murino está disponible en el GenBank con n° de acceso NP_03887.1, donde se describe que está compuesta por 445 residuos de aminoácido, se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuencia de aminoácidos de receptor alfa X de hígado murino.

```

MSLWLEASMPDVSPDSATELWKTEPQDAGDQGGNTCILREARM
PQSTGVALGIGLESAEPTALLPRAETLPEPTELRPQKRKKGPAPKMLGNELCSVCGDK
ASGFHYNVLSCEGCKGFFRRSVIKGARYVCHSGGHCPMDTYMRRKCQECRLRKCRCQAG
MREECVLSEEQIRLKKLKRQEEQQAQATSVSPRVSSPPQVLPQLSPEQLGMIEKLVAA
QQCNRRS FSDRLRVTWPPIAPDQSRREARQORFAHFTELAIVSVQEI VDFAKQLPGF
LQLSREDQIALLKTS AIEVMLETSRRYNPGSESITFLKDFSYNREDFAKAGLQVEFI
NPIFEFSRAMNELQLNDAEFALLIAISIFSADRPNVQDQLQVERLQHTYVEALHAYVS
INHHPHDLRMFPRMLMKLVSLRTLSSVHSEQVFALRLQDKKLPPLLSEIWDVHE
    
```

(SEC ID N°: 5)

20 La secuencia de aminoácidos de receptor beta X de hígado murino está disponible en el GenBank con n° de acceso NP_033499.1, donde se describe que está compuesta por 446 residuos de aminoácido, se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencia de aminoácidos de receptor beta X de hígado murino.

MSSPTSSLDTPVPGNGSPQPSTSATSPTIKEEGQETDPPPGSEG
 SSSAYIVVILEPEDEPERKRKKGPAKMLGHELRCRVCGDKASGFHYNVLSCEGCKGFF
 RRSVVHGGAGRYACRSGTCQMDAFMRRKQCRLRKCKEAGMREQCVLSEEQIRKKR
 IQKQQQQPPPPSEPAASSSGRPAASPGTSEASSQGSGEGERIQLTAAQELMIQQLVA
 AQLQCNKRSFSDQPKVTPWPLGADPQSRDARQORFAHFTELAIISVQEIVDFAKQVPG
 FLQLGREDQIALLKASTIEIMLLETARRYNHETECITFLKDFTYSKDDFHRAGLQVEF
 INPIFEFSRAMRRLGLDDAEYALLIAINI FSADRPNVQEPSRVEALQQPYVEALLSYT
 RIKRPQDQLRFFRMLMKLVSLRTLSSVHSEQVFALRLQDKKLPPLLSEIWDVHE

(SEC ID N°: 6)

- En general, un "polipéptido SIRT1" y varios "polipéptidos LXR" tal como se emplean en los métodos y composiciones de la presente invención, incluyen polipéptidos SIRT1 y LXR naturales humanos o polipéptidos SIRT1 y LXR naturales murinos tales como los mostrados en las Tablas 2-7, así como los ortólogos naturales de vertebrados de los mismos, y dominios, estructuras y fragmentos de los mismos. Adicionalmente, estos términos incluyen polipéptidos, dominios, estructuras y fragmentos mutantes recombinantes en los que al menos un residuo de aminoácido ha sido cambiado por un residuo de aminoácido diferente; o uno o más residuos pueden ser eliminados; o uno o más residuos pueden ser insertados entre residuos vecinos en una secuencia original. Un polipéptido SIRT1 mutante o variante puede tener entre 1 residuo de aminoácido y hasta el 1% de los residuos cambiados, o hasta el 2%, o hasta el 5% o hasta el 8%, o hasta el 10%, o hasta el 15%, o hasta el 20%, o hasta un porcentaje algo superior, de los residuos cambiados respecto a una secuencia natural o de referencia. Los polipéptidos, dominios, estructuras y fragmentos de SIRT1 recombinantes mutantes o variantes se usan en los presentes métodos y composiciones siempre que exhiban de forma demostrable al menos una actividad o función biológica de SIRT1 y LXR naturales. La posesión de una actividad o función biológica puede ser determinada por el especialista en los campos relacionados con la presente invención, que incluyen, a modo de ejemplo no limitante, la biología molecular, la biología celular, la patología, la medicina clínica y similares. Dichos especialistas en los campos de la invención pueden evaluar polipéptidos, dominios, estructuras y fragmentos recombinantes mutantes de SIRT1 y LXR al menos mediante los métodos descritos en los Ejemplos de la presente invención.
- Se reconocerá en la técnica que una secuencia de aminoácidos de un polipéptido SIRT1 o LXR puede variarse sin efectos significativos sobre la estructura o función de la proteína. Si se contemplan dichas diferencias de secuencia, debería recordarse que existirán determinadas áreas de la proteína que son importantes para su actividad. En general, es posible sustituir residuos que formen la estructura terciaria, siempre que se usen residuos que proporcionen una función similar. En otros ejemplos, el tipo de residuo puede ser completamente irrelevante si la alteración se produce en una región no importante de la proteína.

Ácidos nucleicos

- Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "polinucleótido de SIRT1" o "ácido nucleico de SIRT1", "polinucleótido de LXR" o "ácido nucleico de LXR" o expresiones y frases relacionadas, se refieren a cualquier polinucleótido que codifica cualquier polipéptido de SIRT1 tal como se describe en la presente memoria. En general, cualquier secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de SIRT1 es abarcada por la presente invención. En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos de una SIRT1 humana mostrada en la Tabla 2 incluye una secuencia codificadora de la secuencia de ácido nucleico de ARNm descrita en el GenBank con n° de acceso NM_012238, mostrada en la Tabla 8, o un fragmento de la misma. En la Tabla 8, la secuencia codificadora se extiende desde la posición 54 hasta la posición 2297.

Tabla 8.

1	gtcagagcggg	agcagagggag	gcgaggggagg	agggccagag	aggcagttgg	aagatggcgg
61	acgagggcggc	cctcgcctt	cagcccggcg	gctccccctc	ggcggcgggg	gccgacaggg
121	agggccggcgc	gtccccgcc	ggggagccgc	tccgcaagag	gccgcggaga	gatggtcccc
181	gcctcgagcgc	gagccccggc	gagcccggtg	gggcggcccc	agagcgtgag	gtgccggcgg
241	cggccagggg	ctgcccgggt	cgcccgggcg	cgccgctgtg	gcgggaaggc	gagggcaggg
301	cggcggcggc	agggcgggag	caagaggccc	agggcactgc	ggcggctggg	gaaggagaca
361	atgggcccggg	cctgcagggc	ccatctcggg	agccaccgct	ggccgacaac	ttgtacgacg
421	aagacgacga	cgacgagggc	gaggaggagg	aagaggcggc	ggcggcggcg	attgggtacc
481	gagataacct	tctgttcggg	gatgaaatta	tcactaatgg	ttttcattcc	tgtgaaagtg
541	atgaggagga	tagagcctca	catgcaagct	ctagtgactg	gactccaagg	ccaaggatag
601	gtccatatac	ttttgttcag	caacatctta	tgattggcac	agatccctca	acaattctta
661	aagattttatt	gcccgaaca	ataccctccac	ctgagttgga	tgatatgaca	ctgtggcaga
721	ttgttattaa	tatcctttca	gaaccaccaa	aaaggaaaaa	aagaaaagat	attaatacaa
781	ttgaagatgc	tgtgaaatta	ctgcaagagt	gcaaaaaaat	tatagttcta	actggagcgtg
841	gggtgtctgt	ttcatgtgga	ataccctgact	tcaggctcaag	ggatggttatt	atgtgtcggc
901	ttgctgtaga	cttcccagat	cttccagatc	ctcaagcgat	gtttgatatt	gaatatttca
961	gaaaagatcc	aagaccattc	ttcaagtttg	caaaggaaat	atatcctgga	caattccagc
1021	catctctctg	tcacaaattc	atagccttgt	cagataagga	aggaaaaacta	cttcgcaact
1081	ataccacaga	catagacacg	ctggaacagg	ttgcygggat	ccaaaggata	attcagtgct
1141	atggttccct	tgcaacagca	tcttgccctga	tttgtaata	caaagtggac	tgtgaagctg
1201	taaggaggaga	tatttttaac	caggtagttc	ctcgatgtcc	taggtgcccc	gctgatgaac
1261	cgcttgctat	catgaaacca	gagatttgtg	tttttggtga	aaatttacca	gaacagtttc
1321	atagagccat	gaagtatgac	aaagatgaag	ttgacctcct	cattgttatt	gggtcttccc
1381	tcaaagtaag	accagtagca	ctaattccaa	gttccatacc	ccatgaagtg	cctcagatct
1441	taattaatag	agaacccttg	cctcatctgc	attttgatgt	agagcttctt	ggagactgtg
1501	atgtcataat	taatgaattg	tgtcataggt	taggtggtga	atatgccaaa	ctttgtgta
1561	accctgtaaa	gctttcagaa	attactgaaa	aacctcccag	aacacaaaaa	gaattggcct
1621	atgtgtcaga	gttgccacc	acacctcttc	atgtttcaga	agactcaagt	tcaccagaaa
1681	gaacttcacc	accagattct	tcagtgtttg	tcacactttt	agaccaagca	gctaagagta
1741	atgatgattt	agatgtgtct	gaatcaaaag	gttgtatgga	agaaaaacca	caggaagtac
1801	aaacttctag	gaatgttgaa	agtattgtctg	aacagatgga	aaatccggat	ttgaagaatg
1861	ttggttctag	tactggggag	aaaaatgaaa	gaacttcagt	ggctggaaca	gtgaaaaat
1921	gctggcctaa	tagagtggca	aaggagcaga	ttagtaggcg	gcttgatggt	aatcagatc
1981	tgtttttgcc	accaaatcgt	tacattttcc	atggcgctga	ggtatattca	gactctgaag
2041	atgacgtctt	atcctctagt	tcttggggca	gtaacagtga	tagtgggaca	tgccagagtc
2101	caagtttaga	agaaccctatg	gaggatgaaa	gtgaaattga	agaattctac	aatggcttag
2161	aagatgagcc	tgatgttcca	gagagagctg	gaggagctgg	atgtgggact	gatggagatg
2221	atcaagagcc	aattaatgaa	gctatactctg	tgaaacagga	agtaacagac	atgaactatc
2281	catcaaacaa	atcatagtgt	aataattgtg	caggtacagg	aattgttcca	ccagcattag
2341	gaactttage	atgtcaaaat	gaatgtttac	ttgtgaactc	gatagagcaa	ggaaaccaga
2401	aaggtgtaat	atttataggt	tggtaaaaata	gattgttttt	catggataat	ttttaacttc
2461	atatttctg	tacttgcaca	aactcaacac	taactttttt	tttttataaa	aaaaaaaggt
2521	actaagtate	ttcaatcage	tgttgggtcaa	gactaacttt	cttttaaagg	ttcatttcta
2581	tgataaattc	atatgtgtat	atataatttt	ttttgttttg	tctagttagt	ttcaacattt
2641	ttaaagtttt	caaaaagcca	tcggaatggt	aaattaatgt	aaagggacag	ctaactctaga
2701	gtcaagaaatg	gtattttcac	ttttcttctg	aacattgaaat	ggtttgaagt	actcaaaatc
2761	tgtaacgcta	aacttttgat	tctttaacac	aattattttt	aaacactggc	attttccaaa
2821	actgtggcag	ctaacttttt	aaaatctcaa	atgacatgca	gtgtgagtag	aagggaagtca
2881	acaatatgtg	gggagagcac	tcggtgtctt	ttacttttaa	aagtaatact	tggtgctaag
2941	aatttcagga	ttattgtatt	tacggttcaa	tgaaagtggc	ttttgtactt	cctgtggaca
3001	tgtagtaatg	tctataattg	ctcataaaac	taacctgaaa	aacaaaataa	tgtcttggaa
3061	atgtttcagt	tgctttagaa	acattagtgc	ctgectggat	ccccttagtt	ttgaaaattt
3121	tgccattgtt	gtttaaatac	cttactctgt	ggtagagcct	gcattgatct	ttcccacaag
3181	tattaaactg	ccaaaatgtg	aatatgcaaa	gcctttctga	atctataata	atggtacttc
3241	tactggggag	agtgtaatat	tttggactgc	tgttttccat	taatgaggag	agcaacaggg
3301	ccctgattat	acagttccaa	agtaataaga	tgtaattgtt	aatcagcca	gaaagtacat
3361	gtctcccatt	gggaggattt	ggtgttaaat	accaaactgc	tagccctagt	attatggaga
3421	tgaacatgat	gatgtaactt	gtaatagcag	aatagttaat	gaatgaaact	agttcttata
3481	atttatcttt	atttaaaagc	ttagcctgcc	ttaaaactag	agatcaactt	tctcagctgc
3541	aaaagcttct	agtccttcaa	gaagttcata	ctttatgaaa	ttgcaagta	agcatttatt
3601	tttcagacca	ttttgaaaca	tcactcctaa	attaataaag	tattcctctg	ttgcttttagt
3661	atttattaca	ataaaaaggg	tttgaaatat	agctgttctt	tatgcataaa	acaccagct
3721	aggaccatta	ctgccagaga	aaaaaatcgt	attgaaatggc	catttcccta	cttaataagat
3781	gtctcaatct	gaattttatt	ggctacacta	aagaatgcag	tatatttagt	ttcccatttg
3841	catgatgttt	gtgtgctata	gatgatattt	taaatgaaa	agtttgtttt	aaattatttt
3901	tacagtgaag	actgttttca	gctcttttta	tattgtacat	agtccttttt	gtaatttact
3961	ggcatatgtt	ttgtagactg	tttaatgact	ggatatcttc	cttcaacttt	tgaatacaaa
4021	aaccagtytt	ttttacttgt	acactgtttt	aaagtctatt	aaaattgtca	tttgactttt
4081	ttctgttaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaa			

(SEC ID N°: 7)

5 En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una SIRT1 murina mostrada en la Tabla 3 incluye una secuencia codificadora de la secuencia de ácido nucleico de ARNm descrita en el GenBank con nº de acceso NM_019812, mostrada en la Tabla 9, o un fragmento de la misma. En la Tabla 9, la secuencia codificadora se extiende desde la posición 48 hasta la posición 2261.

Tabla 9.

1	gcggagcaga	ggaggcgag	gcggagggcc	agagaggcag	ttggaagat	gcggacgagg
61	tggcgctcgc	ccttcaggcc	gccggctccc	cttccgcggc	ggccgccatg	gaggcccgct
121	cgcagccggc	ggacgagccg	ctccgcaaga	ggccccgcg	agacgggccc	ggcctcgggc
181	gcagcccggg	cgagccgagc	gcagcagtgg	cgccggcggc	cgccgggtgt	gaggcggcga
241	gcgcccggc	cccggcgcg	ctgtggcggg	agggcgccag	ggcgccggcg	agcggcgagc
301	gggagcggcc	ggcgagcgcc	gtggccgggg	acggagacaa	tgggtccggc	ctgcccgggg
361	agccgagggc	ggctgacgac	ttcgacgacg	acgagggcga	ggagggggac	gaggcgcgcg
421	cggcagcggc	ggcggcagcg	atcggctacc	gagacaacct	cctgttgacc	gatggactcc
481	tcactaatgg	ctttcattcc	tgtgaaagtg	atgacgatga	cagaacgtca	cacgccagct
541	ctagtgaact	gactccgcgg	ccgcggatag	gtccatatac	ttttgttcag	caacatctca
601	tgattggcac	cgatcctcga	acaattctta	aagatttatt	accagaaaca	attcctccac
661	ctgagctgga	tgatatgacg	ctgtggcaga	ttgttatta	tatcctttca	gaaccaccaa
721	agcggaaaaa	aagaaaagat	atcaatacaa	ttgaagatgc	tgtgaagtta	ctgcaggagt
781	gtaaaaagat	aatagttctg	actggagctg	gggtttctgt	ctcctgtggg	attcctgact
841	tcagatcaag	agacggatc	tatgctcgcc	ttgcggtgga	ctcccagacc	ctcccagacc
901	ctcaagccat	gtttgatatt	gagtatttta	gaaaagacc	aagaccattc	ttcaagtttg
961	caaaggaat	atatcccggg	cagttccagc	cgtctctgtg	tcacaaattc	atagctttgt
1021	cagataagga	aggaaaaacta	cttcgaaaatt	atactcaaaa	tatagatacc	ttggagcagt
1081	ttgcaggaa	caaaggatc	cttcagtgtc	atggttccct	tgcaacagca	tcttgccctga
1141	tttgtaata	caaagttgat	tgtaagctg	ttcgtggaga	catttttaa	caggtagtct
1201	ctgagtgccc	taggtgccca	gctgatgagc	cacttgccat	catgaagcca	gagattgttc
1261	tctttggtga	aaacttacca	gaacagtttc	atagagccat	gaagtatgac	aaagatgaag
1321	ttgacctcct	cattgttatt	ggatctcttc	tgaaagtgag	accagtagca	ctaattccaa
1381	gttctatacc	ccatgaagtg	ccatcaaat	taataaatag	ggaacctttg	cctcatctac
1441	attttgatgt	agagctcctt	ggagactcgc	atgttataat	taatgagttg	tgctataggc
1501	taggtggtga	atatgccaaa	ctttgttgta	accctgtaa	gctttcagaa	attactgaaa
1561	aacctccacg	cccacaaaag	gaattggttc	atztatcaga	gttgccacca	acacctcttc
1621	atatttcgga	agactcaagt	tcactgaaa	gaactgtacc	acaagactct	tctgtgattg
1681	ctacacttgt	agaccaagca	acaaacaaca	atgttaatga	tttagaagta	tctgaatcaa
1741	gttgtgtgga	agaaaaacca	caagaagtac	agactagtag	gaatgttgag	aacatataatg
1801	tggaaaaatcc	agattttaa	gctgttggtt	ccagtagtgc	agacaaaaat	gaaagaactt
1861	ctgtgcaga	aacagtgaga	aaatgctggc	ctaatagact	tgcaaggag	cagattagta
1921	agcggcttga	gggtaatcaa	tacctgtttg	taccaccaa	tcgttacata	ttccacggtg
1981	ctgaggtata	ctcagactct	gaagatgacg	tcttgcctc	tagttcctgt	ggcagtaaca
2041	ctgacagtgg	cacatgccag	agtcgaagtt	tagaagaacc	cttggaaagt	gaaagtgaag
2101	ttgaagaatt	ctacaatggc	ttggaagatg	ataccggagag	gcccgaatgt	gctggaggat
2161	ctggatttgg	agctgatgga	ggggatcaag	aggttgttaa	tgaagctata	gctacaagac
2221	aggaattgac	agatgtaaac	tatccatcag	acaaatcata	acactatga	agctgtccgg
2281	atccaggaa	tgtccacca	gcattgggaa	ctttagcatg	tcaaaaaaat	gaatgtttac
2341	ttgtgaactt	gaacaaggaa	atctgaaaga	tgtattattt	atagactgga	aaatagattg
2401	tcttcttggg	taatttctaa	agttccatca	tttctgtttg	tacttgtaca	ttcaacactg
2461	ttgttgaact	tcacttctct	ttcaaggttc	atttgtatga	tacattcgtg	tgatgtata
2521	attttgtttt	ttgcctaata	agtttcaacc	ttttaaagtt	ttcaaaagcc	atttgaatgt
2581	taatgtaaa	ggaacagctt	atctagacca	aagaatggta	tttcacactt	ttttgtttgt
2641	aacattgaa	agttttaaagc	cctcaatttc	tgttctgctg	aacttttatt	tttaggacag
2701	ttaactttt	aaacactggc	attttccaaa	acttgtggca	gctaactttt	taaaatcaca
2761	gatgacttgt	aatgtgagga	gtcagcaccg	tgtctggagc	actcaaaact	tgggctcagt
2821	gtgtgaagcg	tacttactgc	atcgtttttg	tacttgcctg	agacgtggta	atgtccaaac
2881	aggcccctga	gactaatctg	ataaatgatt	tggaaatgtg	tttcagttgt	tctagaacaa
2941	atagtgcctg	tctatatagg	tccccttagt	ttgaaatatt	gccattgttt	aatataaatc
3001	ctatcactgt	ggtagagcct	gcatagatct	tcaccacaaa	tactgccaag	atgtgaatat
3061	gcaaagcctt	tctgaatcta	ataatggtac	ttctactggg	gagagtgtaa	tattttggac
3121	tgctgttttt	ccatataatga	ggaagcaat	aggcctctta	attaaagtcc	caaagtctca
3181	agataaatg	tagtcaacc	agaaagtaca	ctgttgccctg	ttgaggattt	ggtgtaatgt
3241	atcccagggt	gttagccttg	tattatggag	atgaatacag	atccaatagt	caaatgaaac
3301	tagttcttag	ttatttataa	gcttagcttg	ccttaaaact	agggatcaat	ttctcaact
3361	gcagaaactt	ttagcctttc	aaacagttca	cacctcagaa	agtcagtatt	tattttacag
3421	acttctttg	aacattgccc	ccaaatttaa	atattcatgt	gggtttagta	tttattacaa
3481	aaaaatgatt	tgaatatag	ctgttcttta	tgcaataaat	accagtttag	gaccattact
3541	gccagaggag	aaaagtatta	agtagctcat	ttccctacct	aaaagataac	tgaatttatt
3601	tggctacact	aaagaatgca	gtatatttag	ttttccattt	gcatgatgtg	ttgtgctat
3661	agacaatatt	ttaaattgaa	aaatttgttt	taaattattt	ttacagtga	gactgttttc
3721	agctctttt	atattgtaca	tagactttta	tgtaactctg	catatgtttt	gtagaccgtt
3781	taatgactgg	attatcttcc	tccaactttt	gaaatacaaa	aacagtgttt	tatactaaaa
3841	aaaaaaaa					

(SEC ID N°: 8)

5 En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un receptor alfa X de hígado humano mostrado en la Tabla 4 incluye una secuencia codificadora de la secuencia de ácido nucleico de ARNm descrita en el GenBank con nº de acceso NM_005693, o un fragmento de la misma. En la Tabla 10, la secuencia codificadora se extiende desde la posición 36 a la posición 1379.

Tabla 10.

```

1  cagtgccctg gtaatgacca gggctccaga aagagatgtc cttgtggctg ggggcccctg
61  tgccctgacat tcctcctgac tctgcggtgg agctgtggaa gccaggcgca caggatgcaa
121 gcagccaggc ccagggaggc agcagctgca tcctcagaga ggaagccagg atgccccact
181 ctgctggggg tactgcaggg gtggggctgg aggctgcaga gccacagcc ctgctcacca
241 gggcagagcc cccttcagaa cccacagaga tccgtccaca aaagcggaaa aaggggccag
301 cccccaaaat gctggggaac gagctatgca gcgtgtgtgg ggacaaggcc tcyggcttcc
361 actacaatgt tctgagctgc gaggctgca agggattctt ccgcccgagc gtcatacagg
421 gagcgacta catctgccac agtggcggcc actgccccat ggacacctac atgctgctga
481 agtgccagga gtgtcgctt cgcaaatgcc gtcaggctgg catgcccggg gagtgtgtcc
541 tgtcagaaga acagatccgc ctgaagaaac tgaagcggca agaggaggaa caggtctatg
601 ccacatcctt gccccccagg cgttctctac cccccaaaat cctgccccag ctcagcccgg
661 aacaactggg catgatcgag aagctcgtcg ctgcccagca acagtgtaac cggcgctcct
721 tttctgaccg gcttcgagtc acgccttggc ccatggcacc agatccccat agcccgggag
781 cccgctcagca gcgctttgcc cacttcactg agctggccat cgtctctgtg caggagatag
841 ttgactttgc taaacagcta cccggcttcc tgcagctcag cggggaggac cagattgccc
901 tgctgaagac ctctgcgctc gagggtgatc ttctggagac atctcggagg tacaaccttg
961 ggagtggagag tateacctc ctaaggatt tcagttataa cggggaagac tttgcaaaag
1021 caggctgca agtgaattc atcaaccoca tcttcgagtt ctccaaggcc atgaaatgag
1081 tgcaactcaa tgatgccgag ttgcccctgc tcatgtctat cagcatcttc tctgcagacc
1141 ggcccacagt gcaggaccag ctccagggtg agaggctgca gcacacatat gtggaagccc
1201 tgcattgcta cgtctccatc caccatcccc atgaccgact gatgttccca cggatgctaa
1261 tgaactggg gagcctccgg accctgagca gcgtccactc agagcaagtg tttgactgct
1321 gtctgcagga caaaaagctc ccaccgctgc tctctgagat ctgggatgtg cacgaatgac
1381 tgctctgtcc ccataatttc tgtttcttg ccgggatggc tgaggcctgg tggctgcctc
1441 ctagaagtgg aacagactga gaagggcaaa cattcctggg agctgggcaa ggagatcctc
1501 ccgtggcatt aaaagagagt caaagggg

```

(SEC ID N°: 9)

5 En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un receptor beta X de hígado humano mostrada en la Tabla 5 incluye una secuencia codificadora de la secuencia de ácido nucleico de ARNm descrita en el GenBank con n° de acceso NM_007121, o un fragmento de la misma. En la Tabla 11, la secuencia codificadora se extiende desde la posición 259 a la posición 1644.

Tabla 11. Secuencia de polinucleótidos que codifica receptor beta X de hígado humano.

```

1  ctcttccgga cgtgacgcaa gggcggggtt gccggaagaa gtggcgaagt tacttttgag
61  ggtatttgag tagcggcggg gtgtcagggg ctaagagga ggacgaagaa aagcagagca
121 aggaaaccca gggcaacagg agtagttcac tccgcgagag gccgtcccag agaccccgcg
181 gcgcagccat gagccccgcc ccccgtgtt gcttggagag gggcgggacc tggagagagg
241 ctgctccgtg accccaccat gtccctctct accacagagt ccctggatcc ccccctgcct
301 ggaatggcc cccctcagcc tggcgcocct tcttcttcc ccaactgtaa ggagaggggt
361 cccgagccgt ggcccggggg tccggaccct gatgtcccag gcactgatga ggccagctca
421 gcctgcagca cagactgggt catcccagat cccgaagagg aaccagagcg caagcgaaag
481 aagggccccag ccccgaaagt gctgggcccac gagctttgcc gtgtctgtgg ggacaaggcc
541 tccggcttcc actacaacgt gctcagctgc gaaggctgca agggcttctt cccggcagct
601 tgggtccgtg gtggggccag gcgctatgcc tgcgggggtg gcggaacctg ccagatggac
661 gcttctatgc ggcgcaagtg ccagcagctg cggtgcgca agtgcaagga ggcagggatg
721 agggagcagt gcgtccttcc tgaagaacag atccggaaga agaagattcg gaaacaacag
781 cagcaggagt cacagtcaca gtgcagtca cctgtgggyc cgcagggcag cagcagctca
841 gcctctgggc ctggggcttc ccttgggtga tctgaggcag gcagccagg ctccggggaa
901 ggcgaggggt tccagctaac agcggctcaa gaactaatga tccagcagt ggtggccggc
961 caactgcagt gcaacaaacg ctccctctcc gaccagccca aagtccagcc ctggcccctg
1021 ggcgcagacc cccagtcccg agatgccccc cagcaacgct ttgccactt cacggagctg
1081 gccatcatct cagtccagga gatcgtggac ttcgctaagc aagtgcctgg tttcctgcag
1141 ctggggcggg aggaccagat cgccctcctg aaggcatcca ctatcgagat ctagctgcta
1201 gagacagcca ggcgctacaa ccacgagaca gactgtatca ccttcttgaa ggaattcacc
1261 tacagcaagg acgacttcca ccgtgcaggg ctgcaggtgg agttcatcaa ccccatcttc
1321 gagttctcgc gggccatgag cggctggggc ctggacgacg ctgagtacgc cctgctcctc
1381 gccatcaaca tcttctcggc cgaccggccc aacgtgcagg agccggggcg cgtggaggcg
1441 ttgcagcagc cctacgtgga ggcgctgctg tccacacgc gcatcaagag gccgcaggac
1501 cagctgcgct tcccgcgcat gctcatgaag ctggtgagcc tgcgcacgct gagctctgtg
1561 cactcggagc aggtcttctc cttgcggctc caggacaaga agctgcccgc tctgctctg
1621 gagatctggg acgtccacga gtgaggggct ggccaccag ccccaacagc ttgctgacc
1681 accctccagc agatagacgc cggcaccctc tctcttctct aggggtggaag gggcctggg
1741 ccgagcctgt agacctatcg gctctcatcc cttgggataa gccccagtc aggtccagga
1801 gctcctctcc ctgcccagcg agtcttccag aaggggtgaa aggyttgcag gtcccagcca
1861 ctgacccttc ccggctgccc tccctcccca gcttacacct caagcccagc acgcagtgca
1921 ccttgaacag agggagggga ggaccatgg ctctccccc tagcccggga gaccagggg
1981 cttcctcttc ctctgctttt atttaataaa aactaaaaac agaaaaaaa aaaaaaa

```

(SEC ID N°: 10)

15 En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un receptor alfa X de hígado murino mostrada en la Tabla 6 incluye una secuencia codificadora de la secuencia de ácido nucleico de ARNm descrita en el GenBank con n° de acceso NM_013839, o un fragmento de la misma. En la Tabla 12, la secuencia codificadora se extiende desde la posición 190 a la posición 1527.

Tabla 12. Secuencia de polinucleótidos que codifica receptor alfa X de hígado murino.

```

1  gggaaacgctg actctggagg ctgctgggat tagggtgggg gtgactgaga agcagtcctt
61  ctgtcagagc aaagagcctc cagggtgagg agaggaagga gagagatgga actagaccgg
121 tctgcgggga aacgcgacag ttttggtaga gggacagtgat cttggtaatg tccagggctc
181 caggaagaga tgtccttggt gctggaggcc tcaatgcctg atgtttctcc tgattctgca
241 acggagtgtg ggaagacaga acctcaagat gcaggagacc agggaggcaa cacttgcctc
301 ctcagggagg aagccaggat gccccagtca actgggggtg ctttagggat aggggtggag
361 tcagcagagc ctacagccct gctcccagg gcagagacc tcccagagcc gacagagctt
421 cgtccacaaa agcggaaaaa gggcccagcc cccaaaaatgc tggggaacga gctgtgcagt
481 gtctgtgggg acaaagcctc tggcttccat tacaacgtgc tgagctgcga gggctgcaag
541 ggattcttcc gccgcagtgt catcaaggga gcacgctatg tctgcccacg cgggtggcac
601 tgccccatgg acacctacat gcggcgaaa gcccaggagt gtcgacttcg caaatggcgc
661 caggcaggca tgagggaggga gtgtgtgctg tcagaagaac agatccgctt gaagaaactg
721 aagcggcaag aagaggaaca ggtcgaagcc acttcgggtg ccccaagggt gtcctcacct
781 cctcaagtcc tgccacagct cagcccagag cagctgggca tgatcgagaa gctgtggctt
841 gccagcaac agtgtaacag gcgctccttc tcagaccgcc tgcgctcac gccctggccc
901 attgcaccgg acctcagag ccgggaagcc cgacaacagc gctttgccca ctttactgag
961 ctggccatcg tgtccgtgca ggagattggt gactttgcca aacagctccc tggcttcta
1021 cagctcagca gggaggacca gatcgccttg ctgaagacct ctgcaatcga ggtcatgctt
1081 ctggagacgt cacggaggta caacccggc agtgagagca tcaccttctt caaggacttc
1141 agttacaacc ggaagactt tgccaaagca gggctgcagg tggagtctat caacccatc
1201 tttgagttct ccagagccat gaatgagctg caactcaatg atgctgagtt tgcctgctc
1261 attgcatca gcatctctc tgacagccgg cccaacgtgc aggaccagct ccaagtagag
1321 aggctgcaac acacatatgt ggaggccctg cacgcctacg tctccatcaa ccaacccac
1381 gaccagctga tgttccacg gatgctaag aagctgggta gcctccgtac tttgagcagc
1441 gtccattcag agcaagtgtt tgcccttcgc ctgcaggaca aaaagcttcc cctctgctg
1501 tctgagatct gggatgtcca cgagtactg tttcaccgtg tcctttggtt tggccacatg
1561 gcgaagctc actgactgct tcccagggt ggagcagac gagaagggca gatctctg
1621 ggagctgggt gaaggagaga gccttgctga gcattaaggg agagtcaaca ggttgggtg
1681 tttctggctg ctgggcagtt gggatctact aacgttgat accatctgaa gaccttgtt
1741 acccaaccaa ata
    
```

(SEC ID Nº: 11)

- 5 En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de un receptor beta X de hígado murino mostrada en la Tabla 7 incluye una secuencia codificadora de la secuencia de ácido nucleico de ARNm descrita en el GenBank con nº de acceso NM_009473, o un fragmento de la misma. En la Tabla 13, la secuencia codificadora se extiende desde la posición 271 a la posición 1611.

Tabla 13. Secuencia de polinucleótidos que codifica receptor beta X de hígado murino.

```

1  ggcgaagtta cttttgcttt tgcctcagca agcgtctgtg cttcagageta ctcccaggct
61  tctgaagtta cttccaaagt gctgtggagg cacaatcacc ggtgcggaca cagaggcaac
121 tctgcctcc cacggccgtt tccagggcaa cagagtcgga gaccccctgc gaccccctc
181 ccgatcgccg gtgcagtcac gagccccgcc tccccctggg gcacggagag gggcggggcc
241 tggacaagc aggtctgttc gtgaccact atgtcttccc ccacaagttc tctggacact
301 cccgtgacct ggaatggttc tctcagccc agtacctccg ccacgtcacc cactattaag
361 gaagaggggc aggagactga tcctcctcca ggctctgaag ggtccagctc tgcctacatc
421 gtggtcatct tagagccaga ggatgagcct gagcgaagc ggaagaagg gcccggccc
481 aagatgctgg gccatgagct gtgcccgtg tgccgagaca aggcctcgg cttccactac
541 aacgtgtcca gctgtgaagg ctgcaaaagg tcttccggc gcagtgtggt ccacgggtgg
601 gccggggcgt atgctgttcg gggcagcggc acctgccaga tggatgcctt catgcccgcg
661 aagtgccagc tctgcccgtt gcgcaagtgc aaggaggctg gcatgcggga gcagtgcgtg
721 ctctctgagg agcagattcg gaagaaaagg attcagaagc agcaacagca gcagccaaca
781 cccccatctg agccagcagc cagcagctca ggccggccag cygcctcccc tggcactctg
841 gaagcaagca gccagggtc cggggaagga gagggcatcc agctgaccgc gctcaggag
901 ctgatgatcc agcagttagt tgcccgcgag ctgcagtgca acaaacgac tttctccgac
961 cagcccaag tcacgcccctg gcccttgggt gcagaccctc agtcccagga tgcctgctag
1021 caacgctttg cccacttcac cgagctagcc atcatctcgg tccaggagat tgtggacttt
1081 gccaaagcagg tgccagggtt cttgcagttg ggccgggagg accagatcgc cctcctgaag
1141 gcgtccacca ttgagatcat gttgctagaa acagccagac gctacaacca cgaagcagaa
1201 tgcattcacgt tctgaagga cttcacctac agcaaggacg acttccaccg tgcaggcttg
1261 caggtggaat tcatcaatcc catcttcgag ttctcgggg ccatgcccgg gctggccctg
1321 gacgatgcag agtatgcctt gcttatcgcc atcaacatct tctcagccga tccgctaat
1381 gtgcagagc ccagccgtgt ggaggccctg cagcagccat acgtggaggc gctcctctc
1441 tacacgagga tcaagegcc accaggaccg ctcccgttcc cagcgtgct catgaagctg
1501 gtgagcctgc gcaccctcag ctccgtgcac tcggagcagg tctttgcaat gcgactccag
1561 gacaagaagc tgcccctctt gctgtccgag atctgggatg tgcacagta gggcagcca
1621 caagtgcctc agccttgggt gtgtcttctt gaagatggag gaagatgctc tctcctggg
1681 gtgggaggac attgtcacgg cccagctcct cgggctcagc ctcaaactca gcggcagttg
1741 gcaactagaag gccccacccc acccattgag tcttcaaga gtggtaggg tcacaggtcc
1801 tagcctctga ccgttcccag ctgcctccc acccagctt acacctcag ctaccaccc
1861 atgcacctg agtggagaga ggttagggca ggtggcccc cacagtggg agaccacagg
1921 ccctctcttc tgcccctttt atttaataaa aaaaacaaaa taaa
    
```

(SEC ID Nº: 12)

Adicionalmente, la invención incluye polinucleótidos que son ácidos nucleicos mutantes o variantes de las secuencias mostradas en las Tablas 8-13, o un fragmento de las mismas, en las que cualquiera de sus bases puede

ser cambiada en la secuencia descrita siempre que siga codificando un polipéptido que mantenga sus actividades y funciones fisiológicas de tipo SIRT1. Un polinucleótido SIRT1 mutante o variante codifica un polipéptido SIRT1 o LXR mutante o variante que puede tener desde 1 residuo de aminoácido hasta el 1% de los residuos cambiados, o hasta el 2%, o hasta el 5%, o hasta el 8%, o hasta el 10%, o hasta el 15%, o hasta el 20%, o hasta un porcentaje algo superior, de los residuos cambiados respecto a una secuencia natural o de referencia. Por “ácido nucleico” o “polinucleótido” se entiende un ADN, un ARN, un ADN o ARN que incluyen uno o más nucleótidos modificados o estructuras principales de fosfato de pentosa modificadas, un ácido nucleico-polipéptido, y construcciones similares que conservan las propiedades de codificación de la secuencia de bases incluida en la construcción.

También se describen fragmentos de ácido nucleico. Un fragmento de ácido nucleico puede codificar un fragmento de un polipéptido de SIRT1 o LXR. Adicionalmente, los fragmentos nucleicos de SIRT1 o LXR pueden usarse como sondas de hibridación para identificar ácidos nucleicos que codifican proteínas SIRT1 o LXR (por ejemplo, ARNm de SIRT1 o LXR) y fragmentos para su uso como cebadores de reacciones en cadena de polimerasa (PCR) para la amplificación o mutación de moléculas de ácido nucleico de SIRT1 o LXR. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “molécula de ácido nucleico” pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), análogos de ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos y homólogos de los mismos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble.

Ácidos nucleicos

Tal como se usan en la presente memoria, un “ácido nucleico” o “polinucleótido”, y términos y expresiones similares, se refieren a polímeros compuestos por nucleótidos que existen de forma natural, así como a polímeros compuestos por nucleótidos sintéticos o modificados. Por tanto, tal como se usa en la presente memoria, un polinucleótido que es un ARN, o un polinucleótido que es un ADN, o un polinucleótido que contiene tanto desoxiribonucleótidos como ribonucleótidos, puede incluir funciones naturales tales como bases naturales y anillos de ribosa o desoxiribosa, o pueden estar compuestos por funciones sintéticas o modificadas tales como las descritas a continuación. Un polinucleótido empleado en la invención puede ser de cadena sencilla o puede ser una estructura de cadena doble de bases apareadas, o incluso puede ser una estructura de bases apareadas de cadena triple.

Los ácidos nucleicos y los polinucleótidos pueden tener 20 o más nucleótidos de longitud, o 30 o más nucleótidos de longitud, o 50 o más nucleótidos de longitud, o 100 o más, o 1000 o más, o decenas de miles o más, o cientos de miles o más, de longitud. Tal como se usa en la presente memoria, “oligonucleótidos” y términos similares basados en éste se refieren a polímeros cortos compuestos por nucleótidos naturales así como a polímeros compuestos por nucleótidos sintéticos o modificados, tal como se describe en el párrafo inmediatamente precedente. Los oligonucleótidos pueden tener 10 o más nucleótidos de longitud, o 15, o 16, o 17, o 18, o 19, o 20 o más nucleótidos de longitud, o 21, o 22, o 23, o 24 o más nucleótidos de longitud, o 25, o 26, o 27, o 28, o 29, o 30 o más nucleótidos de longitud, 35 o más, 40 o más, 45 o más, hasta aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar químicamente y pueden usarse como siARNs, cebadores de PCR o sondas.

Se entiende que, debido al solapamiento de rangos de tamaño proporcionado en el párrafo precedente, los términos “polinucleótido” y “oligonucleótido” pueden usarse como sinónimos en la presente memoria.

Tal como se usan en la presente memoria, “secuencia de nucleótidos”, “secuencia de oligonucleótidos” o “secuencia de polinucleótidos”, y términos similares, se refieren indistintamente tanto a la secuencia de bases que presenta un oligonucleótido o un polinucleótido, como a la estructura de oligonucleótido o polinucleótido que posee la secuencia. Una secuencia de nucleótidos o una secuencia de polinucleótidos además se refieren a cualquier polinucleótido u oligonucleótido natural o sintético en el cual la secuencia de bases se define mediante la descripción o enumeración de una secuencia particular de letras que designan bases, de la forma convencional empleada en el campo.

Un “nucleósido” convencionalmente para los especialistas en campos como la bioquímica, la biología molecular, la genómica y otros campos similares relacionados con el campo de la invención, es un monosacárido enlazado mediante un enlace glicosídico a una base de purina o pirimidina; y un “nucleótido” comprende un nucleósido con al menos un grupo fosfato colgante, típicamente en la posición 3' o 5' (para pentosas) del sacárido, pero puede estar en otras posiciones del sacárido. Los residuos de nucleótido ocupan posiciones secuenciales en un oligonucleótido o un polinucleótido. Se puede producir una modificación o derivación de un nucleótido en cualquier posición secuencial de un oligonucleótido o un polinucleótido. Las modificaciones o derivaciones pueden producirse en el grupo fosfato, en el monosacárido o en la base.

A modo de ejemplos no limitativos, las siguientes descripciones proporcionan determinados nucleótidos modificados o derivatizados. El monosacárido puede modificarse siendo, por ejemplo, una pentosa o una hexosa diferente a ribosa o desoxiribosa. El monosacárido también puede modificarse sustituyendo grupos hidroxilo por grupos hidro o amino, alquilando o esterificando grupos hidroxilo adicionales, etcétera. Los sustituyentes en la posición 2', tales como grupos 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-alilo, 2'-O-aminoalquilo o 2'-desoxi-2'-fluoro proporcionan mejores propiedades de hibridación con un oligonucleótido.

Las bases en oligonucleótidos y polinucleótidos pueden ser bases “no modificadas” o “naturales”, e incluyen las

bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Además pueden ser bases con modificaciones o sustituciones. Los ejemplos no limitativos de bases modificadas incluyen otras bases sintéticas y naturales tales como hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metillinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético (v), ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina, 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, y 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina.

Los enlaces entre nucleótidos son habitualmente el enlace 3'-5' fosfato, que puede ser un enlace de fosfodiéster natural, un enlace de fosfotioéster, y otros enlaces sintéticos. Los oligonucleótidos que contienen cadenas base de fosforotioato tienen una estabilidad de nucleasa mejorada. Los ejemplos no limitativos de cadenas base modificadas incluyen fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilos que incluyen 3'-alquilen fosfonatos, 5'-alquilen fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos.

El uso de cualquier nucleótido modificado es equivalente al uso de un nucleótido natural que tiene las mismas propiedades de pares base, como comprenderá el especialista en la técnica.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es aquella que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen, aunque sin limitación, moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector, moléculas de ADN recombinantes mantenidas en una célula hospedante heteróloga, moléculas de ácido nucleico parcial o sustancialmente purificadas, y moléculas de ADN o ARN sintéticas.

Una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la Tabla 8-13, o un complemento de la misma, puede aislarse usando técnicas de biología molecular estándares y la información de secuencia proporcionada en la presente memoria. Usando toda o una porción de la secuencia de ácido nucleico de la Tabla 8-13 como una sonda de hibridación, se pueden aislar las secuencias de ácido nucleico de SIRT1 o LXR usando técnicas de hibridación y clonación estándares (por ejemplo, tal como se describe en Sambrook y col., eds., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Ausubel, y col., eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1993).

Se puede amplificar un ácido nucleico descrito en la invención usando ADNc, ARNm o alternativamente ADN genómico, como plantilla y cebadores de oligonucleótido apropiados de acuerdo con las técnicas de amplificación PCR estándares. El ácido nucleico amplificado de este modo puede clonarse en un vector apropiado y puede caracterizarse mediante análisis de secuencia de ADN. Además, se pueden preparar los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias de nucleótidos de SIRT1 y LXR mediante técnicas sintéticas estándares, por ejemplo usando un sintetizador de ADN automatizado.

Síntesis de polinucleótidos

Los oligonucleótidos y los polinucleótidos pueden prepararse mediante técnicas sintéticas estándares, por ejemplo usando un sintetizador de ADN automatizado. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos incluyen procesos químicos bien conocidos, que incluyen, aunque sin limitación, la adición secuencial de fosforamiditas de nucleótido sobre partículas derivatizadas superficialmente, tal como describen T. Brown y Dorcas J. S. Brown en Oligonucleotides and Analogues A Practical Approach, F. Eckstein, editor, Oxford University Press, Oxford, páginas 1-24 (1991), e incorporada a la presente memoria a modo de referencia.

Un ejemplo de un procedimiento sintético usa fosforamiditas de ARN Expedite y fosforamidita de timidina (Proligo, Alemania). Los oligonucleótidos sintéticos son desprotegidos y purificados en gel (Elbashir y col. (2001) Genes & Dev. 15, 188-200), seguido de purificación con un cartucho C18 Sep-Pak (Waters, Milford, Mass., EE.UU.) (Tuschl y col. (1993) Biochemistry, 32: 11658-11668). Los ARNss's complementarios se incuban en un tampón de maduración (acetato potásico 100 mM, HEPES-KOH 30 mM a pH 7,4, acetato magnésico 2 mM) durante 1 minuto a 90°C seguido de 1 h a 37°C para hibridar los correspondientes ds-polinucleótidos.

Otros métodos de síntesis de oligonucleótidos incluyen, aunque sin limitación, la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida según los métodos de fosfotriéster y fosfodiéster (Narang y col., (1979) Meth. Enzymol. 68: 90), y el método de H-fosfonato (Garegg, P. J., y col., (1985) "Formation of internucleotidic bonds via phosphonate intermediate", Chem. Scripta 25, 280-282; y Froehler, B. C. Y col., (1986a) "Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates", Nucleic Acid Res., 14, 5399-5407, entre otros) y la síntesis sobre un soporte (Beaucage y col. (1981)

Tetrahedron Letters 22: 1859-1862) así como técnicas de fosforamidatos (Caruthers, M. H. y col., "Methods in Enzymology," Vol. 154, páginas 287-314 (1988), Patentes de EE.UU. 5.153.319, 5.132.418, 4.500.707, 4.458.066, 4.973.679, 4.668.777 y 4.415.732, y otras descritas en "Synthesis and Applications of DNA and RNA," S. A. Narang, editor, Academic Press, Nueva York, 1987, y las referencias contenidas en la misma, y técnicas no basadas en fosforamidite. La síntesis en fase sólida ayuda a aislar el oligonucleótido de impurezas y reactivos en exceso. Una vez separado del soporte sólido, el oligonucleótido puede aislarse aún más empleando técnicas conocidas.

Vectores

La presente descripción proporciona varios vectores que contienen uno o más polinucleótidos. De forma ventajosa, cualquier vector descrito incluye un promotor, un potenciador, o ambos, ligados operativamente a la secuencia de nucleótidos.

Los métodos para preparar los vectores descritos son ampliamente conocidos en los campos de la biología molecular, la biología celular, la oncología y campos afines de la medicina, y otros campos relacionados con la presente invención. Los métodos útiles para preparar los vectores se describen, a modo de ejemplo no limitativo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª Edición) (Sambrook, J. y col. (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), y en Short protocols in molecular biology (5ª Ed.) (Ausubel FM y col. (2002) John Wiley & Sons, Ciudad de Nueva York).

Anticuerpos

El término "anticuerpo" tal como se usa en la presente memoria se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir que contienen un sitio de unión de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) a un antígeno. Dichos anticuerpos incluyen, aunque sin limitación, policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, fragmentos F_{ab} , $F_{ab'}$ y $F_{(ab')_2}$, y una biblioteca de expresión F_{ab} . En general, las moléculas de anticuerpos obtenidas a partir de humanos se refieren a cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren unas de otras en la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Determinadas clases tiene a su vez subclases, tales como IgG₁, IgG₂ y otras. Además, en humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda. La referencia a anticuerpos en la presente memoria incluye una referencia a todas las anteriores clases, subclases y tipos de especies de anticuerpos humanos. Cualquier anticuerpo descrito en la presente memoria se une "inmunoespecíficamente" a su antígeno cognato. Por unión inmunoespecífica se entiende que un anticuerpo activado por la exposición de un hospedante a un inmunógeno particular se une a una molécula tal como un antígeno que incluye el resto inmunogénico con una alta afinidad, y se une sólo con afinidad débil o no se une en absoluto a moléculas que no contengan el inmunógeno. Tal como se usa en esta definición, alta afinidad significa una constante de disociación inferior a aproximadamente 1×10^{-6} M, y afinidad débil significa una constante de afinidad superior a aproximadamente 1×10^{-6} M.

Una proteína aislada, o un complejo que contiene dicha proteína, que se pretende que sirva como antígeno, o una porción o fragmento de la misma, puede usarse como inmunógeno para generar anticuerpos que se unan inmunoespecíficamente al antígeno, usando técnicas estandarizadas para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Se puede usar la proteína de longitud completa o, alternativamente, la invención proporciona fragmentos de péptido antigénico del antígeno para uso como inmunógenos. Un fragmento de péptido antigénico comprende al menos 6 residuos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la proteína de longitud completa, tal como una secuencia de aminoácidos mostrada en las Tablas 2-7, y abarca un epítipo de la misma de tal modo que un anticuerpo activado frente al péptido forma un complejo inmune específico con la proteína de longitud completa o con cualquier fragmento que contenga el epítipo. Preferiblemente, el péptido antigénico comprende al menos 10 residuos de aminoácido, o al menos 15 residuos de aminoácido, o al menos 20 residuos de aminoácido, o al menos 30 residuos de aminoácido. Los epítipos preferidos abarcados por el péptido antigénico son regiones de la proteína que están localizadas sobre su superficie; normalmente se trata de regiones hidrofílicas.

En determinadas realizaciones de la invención, al menos un epítipo abarcado por el péptido antigénico es una región de la proteína SIRT1 o LXR que está localizado sobre la superficie de la proteína, por ejemplo, una región hidrofílica. Un análisis de hidrofobicidad de la secuencia de proteína de SIRT1 o LXR humana indicará qué regiones de un polipéptido de promoción de crecimiento son particularmente hidrofílicas y, por tanto, susceptibles de codificar residuos superficiales útiles para activar la producción de anticuerpos. Como medio para activar la producción de anticuerpos, se pueden generar gráficos de hidropatía que muestran regiones de hidrofiliidad e hidrofobicidad empleando cualquier método bien conocido en la técnica, que incluye, por ejemplo, Hopp y Woods, 1981, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828; Kyte y Doolittle 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-142. En la presente memoria también se proporcionan anticuerpos que son específicos para uno o más dominios dentro de una proteína antigénica, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos.

Una proteína de la invención, o un derivado, fragmento, análogo, homólogo u ortólogo de la misma, puede utilizarse como inmunógeno para la generación de anticuerpos que se unan inmunoespecíficamente a dichos componentes de la proteína.

Se pueden usar varios procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales y

monoclonales dirigidos contra una proteína; o contra derivados, fragmentos, análogos homólogos u ortólogos de la misma (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, incorporada a la presente memoria a modo de referencia). Algunos de estos anticuerpos se discuten a continuación.

5 Anticuerpos policlonales

Para la producción de anticuerpos policlonales, se pueden inmunizar varios animales hospedantes adecuados (por ejemplo, conejos, cabras, ratones u otros mamíferos) mediante una o más inyecciones con la proteína nativa, una variante sintética de la misma, o un derivado de las anteriores. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, la proteína inmunogénica natural, un polipéptido sintetizado químicamente que represente a la proteína inmunogénica, o una proteína inmunogénica expresada recombinantemente. Además, la proteína puede estar conjugada a una segunda proteína que sea inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, aunque sin limitación, la hemocianina de lapa de herradura, la albúmina de suero, la tiroglobulina bovina y el inhibidor de tripsina de soja. La preparación puede incluir adicionalmente un adyuvante.

Las moléculas de anticuerpos policlonales dirigidas contra la proteína inmunogénica pueden aislarse a partir del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de afinidad usando proteína A o proteína G, o en una columna del antígeno. La purificación de inmunoglobulinas se discute, por ejemplo, en D. Wilkinson, *The Scientist*, publicado por The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, N° 8 (17 de abril, 2000), páginas 25-28.

20 Anticuerpos monoclonales

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975). En un método de hibridoma, típicamente se inmuniza un ratón, hámster u otro animal hospedante apropiado, con un agente inmunizador que activa los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizador. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse in vitro.

El agente inmunizador incluirá típicamente la proteína antígeno, un fragmento de la misma o una proteína de fusión de la misma. A continuación los linfocitos fueron fusionados con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietileno glicol, para formar una célula de hibridoma (Coding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) páginas 59-103).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede evaluarse a continuación para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden ser subclonados mediante procedimientos de dilución limitante y cultivados empleando métodos estandarizados (Goding, 1986). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado de Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar in vivo como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o fluido ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharosa, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

40 Vectores recombinantes y células hospedantes

En la presente memoria se describen métodos para promover el flujo de colesterol mediado por ABCA-1 a partir de una célula de mamífero que incluyen la introducción en la célula de un ácido nucleico que contiene una secuencia que codifica una proteína desacetilasa. La célula de mamífero puede ser una célula humana. En cambio, la proteína desacetilasa puede ser una proteína Sir2 eucariótica o una proteína SIRT1 de mamífero. Las técnicas para transactuar células de mamífero con secuencias de ácido nucleico pretendidas son ampliamente conocidas por los especialistas en el campo de la invención. Determinados ejemplos no limitativos de dichos métodos se describen con detalle a continuación.

Un aspecto descrito pertenece a vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma. Tal como se usa en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un lazo de ADN de doble cadena circular en el cual se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde se pueden ligar segmentos adicionales de ADN en el genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedante en la que han sido introducidos (por ejemplo, vectores bacterianos que tengan un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) son integrados en el genoma de una célula hospedante mediante introducción

en la célula hospedante, y por tanto se replican junto con el genoma del hospedante. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados operativamente. Dichos vectores son denominados en la presente memoria "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes se encuentran a menudo en forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus de replicación defectiva, adenovirus y virus asociados a adeno), que presentan funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes descritos comprenden un ácido nucleico en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedante, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en base a las células hospedantes que van a ser usada para la expresión, que están ligadas operativamente a la secuencia de ácido nucleico que va a expresarse. En relación a un vector de expresión recombinante, "ligado operativamente" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está ligada a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de un modo que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedante cuando el vector es introducido en la célula hospedante). La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedantes y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en determinadas células hospedantes (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los especialistas en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedante que va a transformarse, el nivel de expresión de la proteína deseado, etc. Los vectores de expresión pueden ser introducidos en las células hospedantes para producir de este modo proteínas o péptidos, que incluyen proteínas o péptidos de fusión, codificados mediante ácidos nucleicos tal como se describe en la presente memoria (por ejemplo, proteínas SIRT1 o LXR, formas mutantes de la proteína SIRT1 o LXR, proteínas de fusión, etc.).

Se pueden diseñar vectores de expresión recombinantes para la expresión de la proteína SIRT1 o LXR en células procariontes o eucariotas. Por ejemplo, la proteína SIRT1 o LXR puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insectos (usando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero. Las células hospedantes adecuadas se discuten con más detalle en Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). De forma alternativa, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo usando secuencias reguladoras de promotor T7 y polimerasa de T7.

La expresión de proteínas en procariontes muy a menudo es llevada a cabo en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o de proteínas que no son de fusión. Los vectores de fusión añaden un número de aminoácidos a una proteína codificada en los mismos, normalmente al extremo amino de la proteína recombinante. Dichos vectores de fusión habitualmente cumplen con tres propósitos: (1) aumentar la expresión de la proteína recombinante; (2) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y (3) ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como ligando en una purificación por afinidad. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen el pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith y Johnson (1988) Gene 67:31-40), el pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y el pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que fusionan glutatona S-transferasa (GST), proteína E de unión de maltosa, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana.

Los ejemplos de vectores de expresión de *E. Coli* inducibles de no fusión adecuados incluyen el pTrc (Amrann y col., (1988) Gene 69: 301-315) y el pET 11d (Studier y col., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHOD IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

En otra realización, las proteínas descritas en la invención son expresadas usando un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen el pYepSec1 (Baldari, y col., (1987) EMBO J 6: 229-234), el pMFa (Kurjan y Herskowitz, (1982) Cell 30: 933-943), el pJRY88 (Schultz y col., (1987) Gene 54: 113-123), el pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif) y el picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Alternativamente, las proteínas descritas en los complejos de la invención pueden expresarse en células de insecto usando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células SF9) incluyen la serie pAc (Smith y col. (1983) Mol Cell Biol 3: 2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) Virology 170: 31-39).

En otra realización adicional, se expresa un ácido nucleico en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen el pCDM8 (Seed (1987) Nature 329: 840) y el pMT2PC (Kaufman y col. (1987) EMBO J6: 187-195). Cuando se usan en células de mamífero, las

funciones de control del vector de expresión a menudo son proporcionadas por elementos reguladores víricos. Por ejemplo, los promotores usados habitualmente derivan de poliovirus, Adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procarióticas como eucarióticas véase, por ejemplo, los Capítulos 16 y 17 de Sambrook y col., MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

En otra realización, el vector de expresión recombinante de mamífero es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo de célula particular (por ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido son conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitativos de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de albúmina (específico de hígado; Pinkert y col. (1987) Genes Dev 1: 268-277), los promotores linfoides específicos (Calame y Eaton (1988) Adv Immunol 43: 235-275), en particular promotores de receptores de células T (Winoto y Baltimore (1989) EMBO J 8: 729-733) e inmunoglobulinas (Banerji y col. (1983) Cell 33: 729-740; Queen y Baltimore (1983) Cell 33: 741-748), promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamento; Byrne y Ruddle (1989) PNAS 86: 5473-5477), promotores específicos del páncreas (Edlund y col. (1985) Science 230: 912-916) y promotores específicos de glándulas mamarias (por ejemplo, el promotor de suero de leche, Patente de EE.UU. N° 4.873.316 y Publicación de Solicitud Europea N° 264.166). También se contemplan los promotores regulados por el desarrollo, por ejemplo, los promotores murinos *hox* (Kessel y Gruss (1990) Science 249: 374-379) y el promotor de α -fetoproteína (Campes y Tilghman (1989) Genes Dev 3: 537-546).

Otro aspecto pertenece a células hospedantes en las que se ha introducido el vector de expresión. Las expresiones "célula hospedante" y "célula hospedante recombinante" se usan indistintamente en la presente memoria. Se entiende que dichos términos se refieren no solo a la célula sujeto en cuestión sino a la progenie o a la progenie potencial de dicha célula. Debido a que se pueden producir determinadas modificaciones en sucesivas generaciones bien por una mutación o bien por influencias ambientales, dicha progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula original, pero aún así se incluyen dentro del alcance del término usado en la presente memoria.

Una célula hospedante puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, la proteína SIRT1 o LXR puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, levadura o mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) ó células COS). Los especialistas en la técnica conocen otras células hospedantes adecuadas.

El ADN vector se puede introducir en células procarióticas o eucarióticas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Tal como se usan en la presente memoria, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas para la introducción de ácido nucleico ajeno (por ejemplo, ADN) en una célula hospedante, que incluyen la co-precipitación de cloruro de calcio o de fosfato de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la lipofección o la electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedantes pueden encontrarse en Sambrook y col. (2001), Ausubel y col. (2002) y otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección usados, sólo una pequeña fracción de las células puede integrar el ADN ajeno en su genoma. A fin de identificar y seleccionar dichos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) en las células hospedantes junto con el gen de interés. Diversos marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. El ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable puede introducirse en una célula hospedante en el mismo vector que codifica el promotor de crecimiento, o puede introducirse en un vector separado. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante selección con fármaco (por ejemplo, las células que han incorporado el gen de marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que el resto morirá).

Una célula hospedante, tal como una célula hospedante procariótica o eucariótica en cultivo, puede usarse para producir (es decir, expresar) la proteína SIRT1 o LXR. Por consiguiente, la descripción proporciona además métodos para producir la proteína SIRT1 o LXR que usan las células hospedantes de la invención. En una realización, el método comprende cultivar la célula hospedante (en la que cual se ha introducido el vector de expresión recombinante que codifica la proteína SIRT1 o LXR) en un medio adecuado de tal modo que se produce la proteína SIRT1 o LXR. En otra realización, el método comprende además el aislamiento de la proteína SIRT1 o LXR a partir del medio o de la célula hospedante.

La transfección de una célula de vertebrado puede llevarse a cabo adicionalmente usando vectores recombinantes que incluyen, aunque sin limitación, vectores de adenovirus, virus asociados a adeno y retrovirus, además de otras partículas que introducen ADN en células, tales como los liposomas. Se pueden utilizar técnicas como las descritas anteriormente para la introducción de cualquier polipéptido de SIRT1 o LXR que codifica secuencias de nucleótidos en células de vertebrados. Por ejemplo, para la transfección de células de mamífero se pueden utilizar una serie de sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de nucleótidos de SIRT1 o LXR de interés puede estar ligada a un complejo de adenovirus de control de

la transcripción/traducción, por ejemplo, el promotor retardado y la secuencia líder tripartita. Dicho gen quimérico puede ser insertado a continuación en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción de una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar un producto SIRT1 o LXR en los hospedantes infectados (por ejemplo, véase Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3655-3659). En los casos en los que sólo se inserta una porción de una secuencia codificadora de SIRT1 o LXR, se deben proporcionar señales de control de traducción exógenas, que incluyen, quizás, el codón de inicio ATG. Estas señales de control de traducción exógenas y codones de inicio pueden tener una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción apropiados, etc. (véase Bitter y col., 1987, Methods in Enzymol. 153: 516-544).

Tratamiento terapéutico

Se cree que determinadas patologías y afecciones médicas responde favorablemente a la expresión de una SIRT1 o LXR heteróloga o a una LXR α o LXR β heteróloga en las células de un sujeto. Por consiguiente, la presente descripción describe un método para tratar una patología, una enfermedad o una afección médica en un sujeto, en donde la patología responde a polipéptidos de SIRT1 o LXR, LXR α o LXR β . El método incluye la administración de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de SIRT1 o LXR, LXR α o LXR β al sujeto en una cantidad efectiva para atenuar o aliviar la patología. Atenuar una patología significa que se abate una tendencia de sintomatología de empeoramiento hasta una tendencia de empeoramiento más lenta o más suave. Aliviar una patología significa una mejora real en el paciente, de tal modo que los signos e indicios de la patología disminuyen y el paciente mejora hacia un estado de mejor salud. En implementaciones importantes de este método, la patología se selecciona entre infarto de miocardio, apoplejía cerebrovascular, enfermedad renal, enfermedad neurológica que incluye enfermedad de Alzheimer, y otras similares. En las realizaciones ventajosas del método de tratamiento de una patología el sujeto es un humano.

En varias realizaciones de los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de SIRT1 o LXR, LXR α o LXR β , una variante del mismo, o un fragmento del mismo, puede administrarse a un sujeto en cualquiera de una serie de composiciones que aseguran una administración eficiente de la secuencia de ácido nucleico a las células, incluyendo la administración a las células de un sujeto.

El tratamiento de un sujeto con una secuencia de ácido nucleico de SIRT1 o LXR puede llevarse a cabo administrando un ácido nucleico, plásmido, vector, vector vírico, composición liposomal o similar que sea eficaz para introducir la secuencia de ácido nucleico de SIRT1 o LXR en una célula de vertebrado. La transfección de ácidos nucleicos puede verse asistida por el uso de anfóteros especies anfílicas catiónicas (Patente de EE.UU. 6.503.945, y las referencias descritas en la misma). En Hacey-Bey-Abina y col. (2003, Science 302: 415-419), por ejemplo, se describe la terapia génica retroviral *ex vivo*. Los métodos para la introducción terapéutica de un transgén en un sujeto se discuten en "Gene Transfer Methods: Introducing DNA Into Living Cells and Organisms" P.A. Norton y L.F. Steel, Eaton Publishing, 2000. Las estrategias para la introducción terapéutica de transgenes en células y organismos se proporcionan en "Gene Therapy Protocols" Paul D. Robbins (Ed.), Humana Press (1997).

Composiciones farmacéuticas que comprenden polinucleótidos

Las composiciones farmacéuticas para aplicaciones terapéuticas incluyen uno o más polinucleótidos y un vehículo. La composición farmacéutica que comprende el o los polinucleótidos es útil para tratar una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o a la actividad de un Gen Diana. Los vehículos incluyen, aunque sin limitación, disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. Para fármacos administrados oralmente, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitación, excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes inertes, agentes desintegrantes, agentes de unión, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y conservantes.

Una dosis máxima de 5 mg de polinucleótido por kilogramo de peso corporal de recipiente y por día es suficiente para inhibir o suprimir completamente la expresión del gen diana. En general, una dosis adecuada de polinucleótido estará en el intervalo de 0,01 a 5,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del recipiente y por día, preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 200 microgramos por kilogramo de peso corporal del recipiente (mcg/kg) y por día, más preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 100 mcg/kg por día, incluso más preferiblemente en el intervalo de 1,0 a 50 mcg/kg por día, y aún más preferiblemente en el intervalo de 1,0 a 25 mcg/kg por día. La composición farmacéutica puede administrarse una vez al día, o el polinucleótido puede administrarse en forma de dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día. En dicho caso, la cantidad de polinucleótido contenido en cada subdosis debe ser correspondientemente menor a fin de alcanzar la dosis diaria total. La unidad de dosis también puede componerse como una formulación de liberación sostenida para la administración a lo largo de varios días, por ejemplo, usando una formulación convencional que proporcione una liberación sostenida del polinucleótido a lo largo de un periodo de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida son bien conocidas en la técnica. En esta realización, la unidad de dosis contiene un múltiplo correspondiente de la dosis diaria.

El especialista en la técnica apreciará que determinados factores pueden influir en la dosis y posología requeridas

para tratar de manera efectiva a un sujeto, incluyendo, aunque sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición puede incluir un tratamiento sencillo o una serie de tratamientos. Se pueden realizar estimaciones de las dosis efectivas y la vida media *in vivo* para los polinucleótidos individuales contemplados en la invención usando metodologías convencionales o en base a ensayos *in vivo* usando un modelo animal apropiado, y pueden ajustarse durante el tratamiento de acuerdo a criterios establecidos para determinar las características de dosis-respuesta apropiadas.

Las composiciones farmacéuticas contempladas en la invención pueden administrarse empleando medios conocidos en la técnica que incluyen, aunque sin limitación, ruta oral o parenteral, que incluye administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdermal, aérea (aerosol), rectal, vaginal y tópica. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son administradas mediante infusión o inyección intravenosa o intraparenteral, y en realizaciones comunes adicionales la composición farmacéutica que comprende los polinucleótidos puede administrarse directamente *in situ* a un tumor, un cáncer o un crecimiento precanceroso usando laparoscopia y procedimientos microquirúrgicos similares.

Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, las composiciones farmacéuticas de la invención generalmente se proporcionarán en disoluciones o suspensiones acuosas esterilizadas, tamponadas a un pH y una isotonicidad adecuados. Los vehículos acuosos adecuados incluyen la disolución de Ringer y cloruro sódico isotónico. En una realización preferida, el vehículo consiste exclusivamente en un tampón acuoso. En este contexto, "exclusivamente" significa que no hay presentes agentes auxiliares o sustancias encapsulantes que puedan afectar o mediar en la captación de polinucleótido en las células que expresan el gen diana. Dichas sustancias incluyen, por ejemplo, estructuras micelares tales como liposomas o cápsidos, tal como se describe más adelante. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que las composiciones que contienen solo polinucleótido y un disolvente fisiológicamente aceptable son captadas por las células, donde el polinucleótido inhibe de forma eficaz la expresión del gen diana. Aunque para introducir polinucleótidos en cultivos celulares se requiere de microinyección, lipofección, virus, viroides, cápsidas, capsoides u otros agentes auxiliares, sorprendentemente estos métodos y agentes no son necesarios para la captación de los polinucleótidos *in vivo*. Las suspensiones acuosas de acuerdo con la invención pueden incluir agentes de suspensión tales como derivados de celulosa, alginato sódico, polivinil-pirrolidona y goma de tragacanto, y un agente humectante tal como lecitina. Los conservantes adecuados para suspensiones acuosas incluyen p-hidroxibenzoato de etilo y n-propilo.

Las composiciones farmacéuticas útiles de acuerdo con la invención también incluyen formulaciones encapsuladas para proteger el polinucleótido contra una eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulada. Se pueden usar polímeros biocompatibles y biodegradables, tales como vinilacetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos de preparación de dichas formulaciones serán evidentes para el especialista en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos contra células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos víricos). Estas pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por el especialista en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 4.522.811; la publicación PCT WO 91/06309 y la publicación de patente europea EP-A-43075.

En determinadas realizaciones, la formulación encapsulada comprende una proteína de cubierta vírica. En esta realización, el polinucleótido puede estar unido, asociado o embebido en al menos una proteína de cubierta vírica. La proteína de cubierta vírica puede derivar o estar asociada a un virus, tal como un virus de polioma, o puede ser parcial o completamente artificial. Por ejemplo, la proteína de cubierta puede ser una Proteína de Virus 1 y/o una Proteína de Virus 2 del virus de polioma, o un derivado de las mismas.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos pueden determinarse empleando procedimientos farmacéuticos estandarizados con cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/DE50. Los compuestos que presentan elevados índices terapéuticos son los preferidos.

Los datos obtenidos a partir de ensayos con cultivos celulares y estudios con animales pueden usarse para formular un intervalo de dosis para uso en humanos. La dosificación de composiciones de la invención se encuentra preferiblemente en el intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar en este intervalo dependiendo de la forma de dosis empleada y de la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares y de modelos de animales para lograr un intervalo de concentración en plasma en circulación del compuesto que incluya la IC50 (es decir, la concentración del compuesto ensayado que alcance una inhibición media máxima de los síntomas) determinada en un cultivo de células. Dicha información puede usarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos.

Además de su administración individualmente o como una pluralidad, tal como se ha discutido anteriormente, los polinucleótidos útiles según la invención pueden administrarse en combinación con otros agentes conocidos que sean eficaces en el tratamiento de enfermedades. En cualquier caso, el médico facultativo puede ajustar la cantidad y el horario de la administración del polinucleótido en base a los resultados observados usando medidas estandarizadas de eficacia reconocida en la técnica, o descritas en la presente memoria.

Composiciones farmacéuticas

Los polinucleótidos descritos en la invención se designan “compuestos activos” o “agentes terapéuticos” en la presente memoria. Dichos agentes terapéuticos pueden ser incorporados a composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto.

En la presente memoria se describen métodos para aumentar la relación de colesterol ligado a lipoproteína de alta densidad (HDL) respecto al colesterol total en el plasma de un mamífero mediante la administración de un agente que estimula la actividad de SIRT1, así como de un agente que estimula la actividad de SIRT1 en la fabricación de un medicamento para aumentar la relación de colesterol ligado a lipoproteína de alta densidad (HDL) respecto al colesterol total en plasma de un mamífero mediante la administración del agente al mamífero. Dichos agentes se designan “compuestos activos” o “agentes terapéuticos” en la presente memoria. Un ejemplo de dichos agentes es el T0901317. Dichos agentes terapéuticos pueden ser incorporados a composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto.

En la presente memoria también se describen métodos para aumentar la relación de colesterol ligado a lipoproteína de alta densidad (HDL) respecto al colesterol total en el plasma de un mamífero mediante la administración de un agente que promueva la formación de un complejo que comprende una proteína SIRT1 de mamífero y una proteína LXR de mamífero. Adicionalmente, describimos el uso de un agente que promueve la formación de un complejo que comprende una proteína SIRT1 de mamífero y una proteína LXR de mamífero en la fabricación de un medicamento para aumentar la relación de colesterol ligado a lipoproteína de alta densidad (HDL) respecto al colesterol total en el plasma de un mamífero mediante la administración del agente al mamífero. Dichos agentes son designados “compuestos activos” o “agentes terapéuticos” en la presente memoria. Los ejemplos de dichos agentes incluyen el 22(R)-hidroxicolesterol, el ácido 9-cis retinoico, o combinaciones de ambos, 22(R)-hidroxicolesterol y ácido 9-cis retinoico. Estos agentes terapéuticos pueden ser incorporados en composiciones farmacéuticas adecuadas para ser administradas a un sujeto.

Tal como se usa en la presente memoria, “vehículo farmacéuticamente aceptable” pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos de retraso de la absorción, y otros similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los vehículos adecuados se describen en libros de texto tales como Remington's Pharmaceutical Science, Gennaro AR (Ed.) 20ª edición (2000) Williams & Wilkins PA, EE.UU., y el Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, por Delgado y Remers, Lippincott-Raven. Los ejemplos preferidos de componentes que pueden usarse en dichos vehículos y diluyentes incluyen, aunque sin limitación, agua, disolución salina, sales de fosfato, sales de carboxilato, disoluciones de aminoácidos, disolución de Ringer, disolución de dextrosa (un sinónimo de glucosa), una albúmina de suero humano al 5%. A modo de ejemplo no limitativo, la dextrosa se puede usar en forma de disolución acuosa al 5% o al 10%. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con la ruta de administración pretendida. Los ejemplos de rutas de administración incluyen la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, nasal, inhalación, transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las disoluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intravenosa, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente esterilizado tal como agua para inyección, disolución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos, agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos, antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiamintetraacético, tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa.

Para administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de aerosol con un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra una eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluyen implantes y sistemas de liberación microencapsulados. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de EE.UU. N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, etilvinil acetato no

degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Aunque los polímeros como el acetato de etilen-vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas a lo largo de 100 días, determinados hidrogeles liberan agentes farmacéuticos activos en periodos de tiempo más cortos. Los polímeros ventajosos son biodegradables o biocompatibles. Las suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos contra células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos víricos) también pueden usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los especialistas en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 4.522.811. Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida que presenten forma ventajosas, tales como microesferas, a partir de materiales tales como los descritos anteriormente.

Los polinucleótidos descritos pueden ser insertados en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden administrarse a un sujeto empleando cualquiera de una serie de rutas, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.703.055. Por tanto, la administración también puede incluir, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase la Patente de EE.UU. N° 5.328.470) o inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen y col. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que el vehículo de administración génica está embebido. Alternativamente, cuando el vector de administración génica completo pueda producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que produzcan el sistema de administración génica.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser incluidas en un kit, por ejemplo, en un recipiente, paquete o dispensador, junto con instrucciones para su administración.

También se contempla en la invención el uso de un agente terapéutico para la fabricación de una composición farmacéutica o un medicamento para tratar una infección vírica respiratoria en un sujeto.

En varias realizaciones los polinucleótidos descritos en la invención se administran mediante transfección mediada por liposomas, por ejemplo usando reactivos o técnicas disponibles comercialmente, por ejemplo, Oligofectamine™, reactivo LipofectAmine™, LipofectAmine 2000™ (Invitrogen), así como mediante electroporación y técnicas similares. Adicionalmente, los polinucleótidos son administrados a modelos de animales, tales como roedores o primates no humanos, mediante inhalación e infusión en el tracto respiratorio. Otras rutas adicionales para uso con modelos de animales incluyen rutas de administración intravenosa (IV), subcutánea (SC) y rutas relacionadas. Las composiciones farmacéuticas incluyen componentes adicionales que protegen la estabilidad de los polinucleótidos, prolongan su vida media, potencian su función o los dirigen contra tejidos/células específicos. Estos incluyen una variedad de polímeros biodegradables, polímeros catiónicos (tales como polietilenimina), copolipéptidos catiónicos tales como polipéptidos de histidina-lisina (HK), véase por ejemplo las publicaciones PCT WO 01/47496 de Mixson y col., WO 02/096941 de Biomerieux y WO 99/42091 del Massachusetts Institute of Technology), polipéptidos catiónicos PEGilados, y polímeros incorporados a ligando, etc., polipéptidos cargados positivamente, polímeros PolyTran (polisacáridos naturales, también conocidos como escleroglucano, Pillsbury Co., Minneapolis, Minn), tensioactivos (Infasurf; Forest Laboratories, Inc.; ONY Inc.), y polímeros catiónicos (tales como polietilenimina). El Infasurf® (calfactant) es un tensioactivo pulmonar natural aislado a partir de pulmón de ternero para su uso en infusión intratraqueal, contiene fosfolípidos, lípidos neutros y proteínas B y C asociadas a tensioactivo hidrofóbicas. Los polímeros pueden ser uni-dimensionales o multi-dimensionales, y también podrían ser micropartículas o nanopartículas con diámetros inferiores a 20 micrómetros, entre 20 y 100 micrómetros, o por encima de 100 micrómetros. Dichos polímeros podrían portar moléculas de ligando específicas para receptores o moléculas de tejidos o células especiales, y ser usados por tanto para la administración dirigida de polinucleótidos. Los polinucleótidos también se administran mediante vehículos basados en liposomas catiónicos, tales como DOTAP, DOTAP/Colesterol (Qbiogene, Inc.) y otros tipos de disoluciones acuosas de lípidos. Adicionalmente, una disolución acuosa de glucosa en porcentaje bajo (5-10%) y el Infasurf son vehículos efectivos para la administración aérea de polinucleótidos.

Terapia génica

Actualmente, la terapia génica se encuentra en un estado elevado de desarrollo para su uso en tratamientos terapéuticos y profilácticos (por ejemplo, para inmunizar). Se dispone de nuevos métodos de administración, y hay varios ensayos clínicos de diversas modalidades de terapia con genes en curso. La Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. 20060115462 titulada "Direct DNA delivery to bone cells" describe un método que permite la administración in vivo de un polinucleótido en forma de polinucleótido solo o como vector de expresión génica a células óseas de un miembro de mamífero.

La Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. 20060115456 titulada "Replication-competent adenoviral vectors" describe vectores adenovíricos de replicación competente mejorados, que incluyen los tipos de adenovirus 2, 4, 5 y 7, para uso en la administración de ácidos nucleicos y polinucleótidos para aplicaciones terapéuticas y profilácticas.

La Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. 20060104950 titulada "Methods of Transducing genes into T cells"

describe la transducción de un gen en células T activadas usando un vector de paramixovirus.

La Publicación de Patente de EE.UU. 20060110361 titulada "Methods of making viral particles having a modified cell binding activity and uses thereof" describe un método para empaquetar partículas víricas de tal modo que uno o más péptidos de la superficie del artículo son derivados de la célula de empaquetamiento. La solicitud establece que dicho sistema es para uso, por ejemplo, en tratamientos de terapia génica.

La Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. 20060110364 titulada "Vector-mediated delivery of polynucleotides encoding soluble VEGF receptors" describe composiciones de vectores para expresión de una forma soluble de VEGFR3 y métodos para su uso en el tratamiento de cáncer.

La Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. 20050239204 titulada "Multifunctional molecular complexes for gene transfer to cells" describe un complejo molecular multifuncional no vírico para la transferencia de una composición de ácido nucleico a una célula diana.

VandenDriessche y col. demostraron que la hemofilia A podría tratarse de forma efectiva mediante una terapia génica in vivo que introduce el gen de Factor VIII humano en ratones deficientes en Factor VIII empleando vectores retrovirales⁷⁹. La transferencia génica se produjo al menos en el hígado, bazo y pulmones. Roth y col. han evaluado la seguridad de un sistema de terapia génica en células somáticas no víricas en pacientes con hemofilia A severa⁸⁰.

Debido a su estado post-mitótico estable el músculo esquelético es una importante diana para la manipulación genética mediante el uso de vectores víricos y no víricos e integrantes y no integrantes. La terapia génica dirigida a músculo para prevenir la diabetes autoinmune en ratones diabéticos no obesos (NOD) fue presentada por Goudy y col.⁸¹. Desarrollaron vectores víricos adeno-asociados recombinantes que contenían ADNc murino para citoquinas inmunomoduladoras IL4 ó IL10. La transducción de músculo esquelético de ratones NOD hembra con IL10, pero no IL4, eliminó por completo la diabetes.

De acuerdo con Wells⁸², los vectores víricos adeno-asociados y el ADN de plásmido tal cual son actualmente los vectores elegidos para la transferencia de genes a músculos. Los mayores avances en el campo de los sistemas de administración de vectores, particularmente aquellos que usan la ruta vascular, se han producido en los últimos dos años más o menos, de tal modo que la terapia génica de distrofias musculares y el uso del músculo como una plataforma para la producción de proteínas secretadas se ha convertido en una posibilidad clínica.

La terapia oncolítica es un nuevo tratamiento anticáncer basado en virus líticos atenuados tales como el adenovirus (Ad)⁸³. Estos virus inducen la destrucción de células hospedantes mediante lisis y por tanto son distintos de los virus clásicos de terapia génica. Los Ads oncolíticos son modificados genéticamente de tal modo que se repliquen únicamente en células cancerígenas. Tres Ads oncolíticos han completado ensayos clínicos de Fase I y II con pacientes de cáncer. Estos virus se siguen modificando genéticamente para conferirles genes terapéuticos adicionales⁸³.

Takahashi y col. han iniciado un estudio clínico de terapia génica de resistencia multifármaco (MDR1). Los dos pacientes tratados hasta la fecha se encuentran en remisión completa y no han sufrido efectos adversos aparentes a consecuencia de la transferencia de gen MDR1⁸⁴.

Broedl y col. describen que, en vista de los tratamientos ineficaces de la actualidad para diversas hiperlipidemias, la terapia génica somática se considera una estrategia potencial a la terapia actual. En muchos casos ya se han llevado a cabo estudios preclínicos de prueba-de-principios, y en el caso de la hipercolesterolemia familiar homocigota se ha llevado a cabo un ensayo clínico.

Se han usado oligodesoxinucleótidos antisentido dirigidos contra clusterina en un ensayo clínico de Fase I para el tratamiento de cáncer de próstata⁸⁶. El tratamiento proporcionó hasta un 90% de supresión de clusterina en cáncer de próstata. Miyake y col. hablan de que se habían programado estudios de fase II para principios de 2005⁸⁶.

Satoh y col. revisan el estado de la terapia génica del cáncer de próstata, que incluye la transducción mediada por virus del gen de timidina quinasa del virus de herpes simple seguido de un curso del profármaco ganciclovir⁸⁷. Presentan que un ensayo clínico de terapia clínica para el cáncer de próstata humano ha demostrado seguridad, eficacia clínica y efectos biológicos de actividad antitumoral. Según Satoh y col., después de numerosos estudios preclínicos favorables, se han aprobado varios estudios clínicos para terapia de cáncer del cáncer de próstata usando citoquinas inmunomoduladoras tales como la interleuquina-2, la interleuquina-12, la B7-1 (CD80), la B7-2 (CD86) y factor estimulante de colonia de granulocito-macrófago⁸⁷.

50 **Métodos de ensayo para identificar agentes activos potenciales**

En varios aspectos, la invención describe métodos de ensayo que pretenden determinar si un compuesto químico o agente candidato modula una actividad de interés en la presente invención. Dichos métodos incluyen los siguientes.

En la presente memoria se describe un método para determinar si una sustancia candidata modula un proceso dependiente de LXR, que incluye:

- a) transfectar una célula con un vector que alberga un gen indicador dirigido operativamente por un LXRE;
- b) poner en contacto la célula con el candidato; y
- c) determinar si el candidato modula la expresión del gen indicador en comparación con una célula que no se ha puesto en contacto con el candidato;

5 en donde una diferencia en la extensión de la presencia del proceso dependiente de LXR detectado entre la presencia y la ausencia del candidato indica que el candidato modula el proceso dependiente de LXR.

La invención describe adicionalmente un método para determinar si una sustancia candidata modula un efecto dependiente de SIRT1 de un LXR, que incluye:

- a) transfectar una célula con un vector que alberga un gen SIRT1;
- 10 b) transfectar además la célula con un vector que alberga un gen indicador dirigido operativamente por un promotor de LXR;
- c) poner en contacto la célula con el candidato; y
- d) determinar si el candidato modula la expresión del gen indicador en comparación con una célula que no se ha puesto en contacto con el candidato;

15 en donde una diferencia en la extensión del efecto dependiente de SIRT1 del LXR detectado entre la presencia y la ausencia del candidato indica que el candidato modula el efecto dependiente de SIRT1 de un LXR.

La invención describe además un método para determinar si una sustancia candidata modula la formación de un par de unión específico que comprende los miembros de par de unión específico SIRT1 y LXR, que incluye:

- a) transfectar una célula con un vector que alberga una secuencia que codifica un primer miembro marcado con epítipo del par de unión específico;
- 20 b) transfectar adicionalmente la célula con un vector que alberga una secuencia que codifica el segundo miembro del par de unión específico;
- c) poner en contacto la célula con la sustancia candidata;
- d) lisar las células, poner en contacto los lisatos celulares con un anticuerpo específico para el marca de epítipo, y recuperar los inmunoprecipitados que comprenden un complejo del SIRT1 y el LXR con un adsorbente específico de anticuerpo;
- 25 e) llevar a cabo un procedimiento de análisis por transferencia Western usando anticuerpos específicos para SIRT1 y LXR;

30 en donde una diferencia en la formación del complejo detectada en presencia del candidato en comparación con su ausencia del candidato indica que el candidato modula la interacción de SIRT1 con LXR.

En estos métodos de ensayo, la transfección con vectores puede llevarse a cabo mediante técnicas tales como las descritas anteriormente, incorporadas a la presente memoria a modo de referencia. Cualquier técnica equivalente conocida por los especialistas en el campo de la invención, no descrita específicamente en la presente memoria, puede también ser usada para llevar a cabo las transfecciones.

35 Varios de los métodos de ensayo incluyen además la transfección con un vector que albergue un gen indicador dirigido operativamente por un LXRE. El gen indicador será activado por un componente celular que se une específicamente al LXRE para expresar el gen indicador. El producto del gen indicador es detectable en el sistema experimental diseñado para llevar a cabo el ensayo. En general, un gen indicador codifica una proteína, factor o actividad enzimática que, tras expresión, es fácilmente detectable mediante métodos de detección químicos o físicos. Los ejemplos no limitantes de genes indicadores incluyen genes que codifican una enzima tal como la peroxidasa de rábano o la luciferasa de luciérnaga, una proteína cromofórica o una proteína fluorescente tal como la proteína fluorescente verde, y otras similares. Cualquier gen indicador equivalente conocido por los especialistas en el campo de la invención, no específicamente descrito en la presente memoria, también puede ser usado para transfectar la célula con el objetivo de llevar a cabo el ensayo para identificar agentes activos potenciales.

45 Varias realizaciones adicionales de los métodos de ensayo incluyen transfectar una célula con un vector que albergue una secuencia que codifica un primer miembro marcado con epítipo del par de unión específico constituido por SIRT1 y LXR. Los epítopos que son utilizables para este propósito incluyen cualquier epítipo ligado por un anticuerpo específico. Un ejemplo no limitante de epítipo es el epítipo FLAG; pero los especialistas en el campo de la invención conocen ampliamente otros. Se puede usar cualquier epítipo equivalente, no descrito específicamente en la presente memoria, como quimera con un miembro del par de unión específico con el objetivo de llevar a cabo

50

el ensayo para identificar agentes activos potenciales.

Los ensayos de agentes activos potenciales se llevan a cabo frecuentemente usando escrutinios de alta capacidad en aparatos de ensayo paralelos altamente replicados. Se pueden emplear placas multipocillo en estos sistemas de tal modo que se lleva a cabo un elevado número de ensayos simultáneamente. Los compuestos candidatos empleados en los ensayos para detectar un agente activo potencial se obtienen comúnmente como resultado de la síntesis química de bibliotecas combinatorias de compuestos químicos, en las que se varían sistemáticamente varios restos y/o sustituyentes en una familia de compuestos relacionados. Ya se dispone habitualmente de bibliotecas químicas de análogos en almacenes de compuestos accesibles a una persona o entidad. Otras bibliotecas químicas de análogos incluyen productos químicos obtenidos a partir de fuentes naturales, así como derivados de dichos compuestos naturales que han sido modificados adicionalmente usando métodos de química combinatoria. En general, las bibliotecas de compuestos químicos son ampliamente conocidas por los especialistas en el campo de la invención. Para llevar a cabo un ensayo de identificación de un agente activo potencial se puede usar cualquier método equivalente para preparar un compuesto candidato, o para preparar una biblioteca de compuestos candidatos, conocidos por los especialistas en el campo de la invención.

15 EJEMPLOS

Métodos

Plásmidos

Los plásmidos pBabe-SIRT1 y pCMV-FLAG-HsSIRT1 han sido descritos^{15,16}.

Animales y análisis de lipoproteína en plasma

20 Se alojaron ratones *SIRT1*^{+/+}, *SIRT1*^{+/-} y *SIRT1*^{-/-} en fondo 129/sv-CD1 mixto en una instalación de temperatura controlada (22 °C) con un ciclo de luz diurna desde las 7 a.m. hasta las 7 p.m., y se les dio acceso a comida (con un 0,02% de colesterol) y agua a discreción.

Células, infección retroviral y transfección

25 Se aislaron los fibroblastos embrionarios de los ratones *SIRT1*^{+/+}, *SIRT1*^{+/-} y *SIRT1*^{-/-} (MEFs, del inglés “mouse embryonic fibroblasts”) a partir de embriones, tal como se ha descrito previamente⁷³, y se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con un 10% de FBS y antibióticos. Se generaron MEFs inmortalizadas (MEFIs) transfectando MEFs primarias con un plásmido pRS-SV40T. Se cultivaron células HEK293T y Phoenix (ATCC, Rockville, MD) en DMEM con un 10% de FBS y antibióticos. Se cultivaron células THP-1 (ATCC, Rockville, MD) en RPMI 1640 con un 10% de FBS y β-mercaptoetanol 0,5 mM.

30 Todas las transfecciones se llevaron a cabo con reactivo lipofectamina 2000 plus, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, Ca). Para la infección retroviral, se transfectaron células Phoenix con pBabe o pBabe-SIRT1. Se recolectó el medio que contenía los retrovirus 48 h después, se filtró, se trató con polibreno (1 mg/mL), y se transfirió sobre MEFs. Las células infectadas fueron cultivadas entonces con medio normal que contenía 1 µg/mL de puomicina.

35 Ejemplo 1. Colesterol en plasma en ratones naturales y sin *SIRT1*

Se analizaron diez ratones naturales, 13 *SIRT1*^{+/-} y 13 compañeros de camada *SIRT1*^{-/-} en cada grupo. Los animales fueron mantenidos en ayunas durante cuatro horas desde el inicio del ciclo de luz diurna, a continuación se extrajo sangre y se obtuvo plasma mediante tratamiento con K₃-EDTA. Se midió el colesterol total en plasma, los niveles de HDL y LDL mediante kits de ensayo enzimáticos colorimétricos (Wako Diagnostics, Richmond, Va). Se fraccionaron 40 100 µL del conjunto de plasmas procedentes de 4 machos *SIRT1*^{-/-} y 4 compañeros de camada *SIRT1*^{+/+} usando dos columnas de cromatografía líquida de resolución rápida (FPCL, del inglés “fast-performance liquid chromatography”) (columnas Superosa 6B, Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Se muestra un perfil representativo de tres experimentos independientes. A continuación se analizaron las fracciones de FPLC para determinar los contenidos de colesterol con el kit de ensayo enzimático colorimétrico de Wako. El experimento se repitió tres veces 45 con un total de 12 machos *SIRT*^{-/-} y 12 compañeros de camada *SIRT1*^{+/+}. Los resultados fueron comparados con el ensayo de t de student.

La Figura 1a muestra que los ratones *SIRT1*^{-/-} presentaron unos niveles de colesterol total en plasma ligeramente inferiores, en comparación con los ratones naturales de igual género y edad. Según se observa en la Figura 1, los paneles b (ensayo enzimático directo) y d (cromatografía de exclusión por tamaño/ensayo enzimático), esto es debido principalmente a una reducción de aproximadamente el 40% en el colesterol transportado en HDL (*, 50 *p*<0,001), la principal lipoproteína rica en colesterol en el plasma murino (80-90% del total). Los niveles de colesterol LDL en plasma fueron similares en ratones *SIRT1*^{-/-} y de control (Figuras 1c y d). Como resultado, la relación de colesterol total/HDL en ratones *SIRT1*^{-/-} fue anormalmente alta (2,57 ± 0,98 frente a 1,36 ± 0,19 para los controles naturales, *p*<0,001), mientras que la relación HDL/LDL fue anormalmente baja (1,92 ± 0,94 frente a 3,56 ± 1,24, 55 *p*<0,001). Debido a los efectos pleiotrópicos en los ratones *SIRT1*^{-/-}, también se examinaron los heterocigotos

SIRT1^{-/-}, que son fenotípicamente similares a los naturales. También se obtuvo que los niveles de HDL eran significativamente reducidos en los heterocigotos *SIRT1*^{+/-} (Figura 1b, (*, p<0,001)).

Se midieron los contenidos de colesterol total (TC), colesterol libre (FC), éster de colesterol (CE) y fosfolípidos (PL) en fracciones HDL (fracción nº 25-38) de los 12 pares de animales, mostrados en la Figura 1, panel e. Las reducciones relativas en ratones *SIRT1*^{-/-} de los niveles de colesterol total, colesterol libre, éster de colesterol y fosfolípidos en plasma HDL fueron similares, aproximadamente del 25-30% (Figura 1e; **, p<0,01). La distribución de tamaños de HDL fue normal (Figura 1d) en ratones *SIRT1*^{-/-}, lo que sugiere que la reducción en HDL fue consecuencia de un menor número de partículas más que de partículas con composición o estructura alteradas.

Ejemplo 2. Colesterol en tejidos de ratones naturales y sin SIRT1

Para determinar los niveles de colesterol total en tejidos de ratón, se sometió a ayuno a ratones *SIRT1*^{-/-} y compañeros de camada de control durante cuatro horas desde el inicio del ciclo de luz diurna antes de ser sacrificados. A continuación se extrajeron y pesaron los tejidos. El colesterol total de hígado y testículos fue extraído y medido mediante GC tal como se ha descrito previamente^{70,71}. Los lípidos totales, que incluyen los triglicéridos, también se disolvieron en una disolución que contenía un 60% de butanol, un 13% de metano y un 27% de Triton X-100, y se midieron con los kits de ensayo enzimático colorimétrico de Wako.

En los ratones *SIRT1*^{-/-}, un HDL en plasma anormalmente bajo (Ejemplo 1) se asoció a un aumento en la acumulación de colesterol en dos tejidos para los que el HDL es importante como fuente de colesterol exógeno: los testículos, que usan el colesterol HDL como almacén de esteroides y para esteroidogénesis²⁵ y es el órgano que presenta los mayores niveles relativos de proteína SIRT1^{26,27}, y el hígado, que desempeña un papel central en la homeostasis de colesterol y HDL²⁸ (Figura 1 f, n=8; ***, p<0,01).

El descenso en el colesterol HDL en plasma y el aumento de la acumulación de colesterol en tejido en el hígado y en los testículos en ratones *SIRT1*^{-/-} podría producirse debido a un incremento de la captación de colesterol de lipoproteína o a una disminución del eflujo de colesterol celular (exportación) a lipoproteínas. El aumento en el colesterol de tejido también podría deberse a un aumento en la síntesis local de colesterol. Sin embargo, en el hígado y en los testículos observamos esencialmente niveles normales de ARNm para el gen regulado por colesterol altamente sensible que codifica la enzima de control de velocidad de la biosíntesis de colesterol, HMG-CoA reductasa (datos no mostrados). Asimismo, no hubo incrementos aparentes en estos tejidos de los niveles de proteína del principal receptor de HDL SR-BI (datos no mostrados) que media en la captación celular de colesterol HDL²⁹, ni incrementos en las velocidades de captación de lípidos de HDL en fibroblastos embrionarios de ratones *SIRT1*^{-/-} (MEFs, datos no mostrados). Además, se produjeron disminuciones sustanciales, más que aumentos, en los niveles de ARNm en testículo e hígado de otros dos receptores de lipoproteína principales, el receptor de LDL (LDLR) y el receptor LRP de VLDL/quilomícron (datos no mostrados). Debido a que ni el aumento de la síntesis de colesterol nuevo ni la importación mediada por receptor parecen ser responsables de los aumentos de colesterol en tejido y de los descensos de colesterol en plasma en ratones *SIRT1*^{-/-}, parece probable que la reducción del eflujo de colesterol celular podría justificar estas observaciones.

Ejemplo 3. Eflujo de colesterol a partir de células naturales y de *SIRT1*^{-/-}

El transporte de colesterol inverso es el proceso mediante el cual el exceso de colesterol en los tejidos periféricos es transportado hasta el hígado para su eliminación del cuerpo^{30,31}. La primera etapa de este proceso es el eflujo de colesterol desde las células a lipoproteínas, en particular HDL. Varias proteínas de transporte de colesterol de la superficie celular pueden mediar en el eflujo de colesterol, incluyendo SR-BI³²⁻³⁵, ABCG1^{36,37} y la mejor caracterizada de todas, el transportador de casete de unión de ATP (ABC) denominado ABCA1, que transfiere el colesterol no esterificado y los fosfolípidos a apolipoproteínas pobres en lípidos (principalmente apoA-I) para formar partículas de HDL^{30,38-44}. Para evaluar los efectos de la SIRT1 en este proceso, se midió el eflujo de colesterol mediado por apoA-I en dos sistemas celulares cultivados distintos, en los que las células fueron marcadas con [³H]-colesterol y se monitorizó el eflujo de colesterol marcado a apoA-I en el medio extracelular.

Para los MEFs, el ensayo de eflujo de colesterol se llevó a cabo tal como se ha descrito⁷², con modificaciones. Se llevaron a placa MEFs primarios de *SIRT1*^{-/-} y de compañeros de camada de control *SIRT1*^{+/+} o *SIRT1*^{+/-} en placas de 12 pocillos con una confluencia del 50%, y se cultivaron durante una noche. A continuación, las células fueron transferidas a RPMI 1640/0,2% de albúmina de suero bovino (BSA) durante 24 h y se cargó el colesterol mediante incubación con 50 µg/mL de LDL y 1 µCi/mL de [³H]-colesterol (NEN Life Science Products, Boston, Ma) durante otras 24 h. Las células fueron lavadas con PBS, equilibradas durante 4 h en RPMI 1640/0,2% de BSA, y a continuación incubadas en RPMI 1640/0,2% de BSA con o sin 15 µg/mL de apoA-I durante 24 h. A continuación se recolectó el medio y las células fueron lisadas con NaOH 0,2 N. Se midió la radioactividad recuperada en el medio y los lisatos celulares, y se calculó el eflujo de colesterol mediado por apoA-I como el porcentaje de radioactividad recuperado en el medio respecto a la radioactividad total y restando el eflujo no específico en medio libre de apoA-I. Los ensayos de eflujo de colesterol se llevaron a cabo por duplicado con 7 pares de MEFs *SIRT1*^{-/-} y de control *SIRT1*^{+/+} o *SIRT1*^{+/-} procedentes de 3 camadas.

Usando MEFs primarios, se incubaron células de control naturales y células *SIRT1*^{-/-} cargadas con [³H]-colesterol en

medio RPMI 1640 con o sin 15 µg/mL de apoAI. Los niveles de [³H]-colesterol en las células y el medio de cultivo se midieron 24 h después y se calculó el eflujo de colesterol mediado por apoAI. La Figura 1g (panel izquierdo) muestra que el eflujo procedente de MEFs primarios de *SIRT1*^{+/+} de control (barra rellena) fue casi tres veces superior al de los MEFs de *SIRT1*^{-/-} (barra hueca) (n=7; ****, p<0,001).

- 5 Para las células THP-1 de línea celular monocítica humana, las células fueron tratadas con nicotinamida 10 mM en RPMI 1640/FBS al 10% durante 48 h, a continuación se cargó colesterol con 50 µg/mL de LDL y 1 µCi/mL de [³H]-colesterol en medio RPMI 1640/FBS al 1%/BSA al 0,2% durante 24 h. Las células fueron lavadas con PBS e incubadas en RPMI 1640/BSA al 0,2% con o sin 15 µg/mL de apoAI durante 24 h. El medio y las células fueron separados entonces y las células fueron lisadas con NaOH 0,2 N. La radioactividad recuperada en el medio y los lisatos celulares fueron medidos y se calculó el eflujo de colesterol mediado por apoAI tal como se ha descrito anteriormente.

- 15 El tratamiento de TBP-1 con el inhibidor de SIRT1 de nicotinamida (Nico)⁴⁵ también suprimió el eflujo de [³H]-colesterol aproximadamente a una tercera parte (Figura 1g, panel derecho). El experimento se llevó a cabo por triplicado y se repitió dos veces (p<0,01). Por tanto, la pérdida de SIRT1 en MEFs y la inhibición de la actividad de SIRT1 en monocitos reducen el eflujo de colesterol mediado por apoAI. Estos resultados confirman la posibilidad de que una disminución del eflujo de colesterol podría conducir a un menor nivel de colesterol HDL en plasma y a un aumento del colesterol en tejido en ratones *SIRT1*^{-/-}.

Ejemplo 4. Niveles de ARNm de ABCA1 en tejidos naturales y sin SIRT1

- 20 Para examinar si un menor eflujo de colesterol podría producir un nivel reducido de colesterol HDL en plasma y un aumento del colesterol en tejido en ratones *SIRT1*^{-/-}, se compararon los niveles ARNm de ABCA1 en el hígado, testículos y ovarios.

- 25 Se aisló ARN total procedente de hígados, testículos, macrófagos peritoneales estimulados con tioglicolato y ovarios de ratón empleando un mini-kit Qiagen RNeasy (Qiagen Inc., Calencia, Ca.). Para el análisis PCR en tiempo real, se sintetizó ADNc mediante transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, Ca) con cebadores aleatorios. El ADNc resultante se sometió a continuación a análisis PCR con cebadores específicos de gen en presencia de Cybergreen (Qiagen Inc., Calencia, Ca.). Se obtuvo la abundancia relativa de ARNm mediante normalización a niveles de ciclofilina. Para la hibridación northern, se separó ARN (10 µg/banda) sobre geles de formaldehído-agarosa (1,0%), se transfirió a membranas GeneScreen Plus (NEN Life Science Products, Boston, Ma.), y se hibridó de acuerdo con procedimientos estandarizados. Los niveles de ARNm de ABCA1 fueron cuantificados mediante un generador de fosfoimágenes y se normalizaron respecto a los correspondientes niveles de actina.

- 30 La expresión de ARNm de ABCA1 se redujo en un 40-50% en ratones *SIRT1*^{-/-} en los tres tejidos evaluados, en comparación con el tipo natural (Figura 2a). En consistencia con la idea de que dicha reducción podría haber contribuido a los niveles reducidos de HDL en plasma, en ratones heterocigotos *ABCA1*^{+/-}, el colesterol HDL se reduce hasta ~60% de los controles de *ABCA1*^{+/+}⁴⁶, similar a la reducción en ratones *SIRT1*^{-/-}.

35 Ejemplo 5. Actividad del promotor ABCA1.

- La transcripción de ABCA1 se induce aumentando el colesterol celular, y los factores transcripcionales de receptor nuclear LXR media en dicha respuesta⁴⁷⁻⁴⁹. Los heterodímeros de LXR/receptor X retinoide (RXR) son activados por oxisteroles⁵⁰ y desempeñan papeles clave en la regulación de la homeostasis global del organismo, la biosíntesis de lípidos, la respuesta inflamatoria, el metabolismo de carbohidratos y la obesidad⁵¹. Para determinar si los efectos de SIRT1 en la expresión de ABCA1 están mediados por LXRs, se generaron construcciones indicadoras en las que la expresión del gen de luciferasa de luciérnaga estaba dirigida por el promotor ABCA1 de ratón o por un promotor mutante de control en el que una eliminación de ocho nucleótidos eliminó el elemento de respuesta de LXR (LXRE). Estudios previos han demostrado que una combinación de 22(R)-hidroxicolesterol (22(R)-HC, un agonista de LXR) y ácido 9-cis retinoico (9-cisRA, un agonista de RXR) estimula de forma drástica la actividad del LXRE en el promotor ABCA1⁴⁷.

- El plásmido indicador de luciferasa pGL3-ABCA1 fue creado insertando desde -847 a +244 de la región de promotor ABCA1 en posiciones KpnI-XhoI del vector pGL3 (Promega, Madison, Wi). El pGL3-ABCA1-LXRE, la versión mutante de LXRE del pGL3-ABCA1, fue creado eliminando el LXRE del promotor natural de ABCA1 de ratón.

- 50 Para el ensayo de luciferasa, se transfectaron células MEFs o HEK293T colocadas en placas de 24 pocillos con 100 ng de pGL3-ABCA1 o de pGL3-ABCA1-LXRE, y con 10 ng de pRL-TK (luciferasa *Renilla*, Promega). Las células transfectadas con vectores indicadores de luciferasa naturales (WT, del inglés "wildtype") o dirigidos por promotor ABCA1 de ratón mutante de LXRE (-LXRE) fueron tratadas con Trichostatina A 1 µM (TSA), un inhibidor de desacetilasas de clase I y II, o con nicotinamida (Nico) 10 mM, o con las dos, nicotinamida 10 mM + TSA 1 µM. Las células transfectadas con el vector mutante de LXRE fueron incubadas en DMEM con FBS al 10% en ausencia (barras sólidas) o en presencia (barras huecas) de 22(R)-HC 10 µM y de 9-cisRA 1 µM (Figura 2b). Entonces se midió la actividad de luciferasa usando el Sistema de Ensayo Indicador de Luciferasa-Dual (Promega) 6 ó 24 horas después. La actividad GL (luciferasa de luciérnaga) final se normalizó respecto a la actividad de RL (luciferasa

Renilla) co-expresada. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y se repitieron 3 veces.

Las construcciones indicadoras naturales y mutantes fueron expresadas en células HEK293T (Figura 2b, WT (panel izquierdo) o -LXRE (panel derecho)). La expresión de luciferasa del tipo natural fue estimulada 8 veces por encima de su valor normal mediante tratamiento con 22(R)-HC + 9-cisRA (Figura 2b, panel izquierdo). Además, esta expresión inducida fue inhibida un 50% por el inhibidor de nicotinamida, que inhibe desacetilasas de clase m tales como la SIRT1 (a), pero no fue inhibida por TSA. Las construcciones que carecen de LXRE no produjeron respuesta al agonista de LXR y mostraron una actividad basal baja (Figura 2b, panel derecho). En conjunto, estos descubrimientos sugieren que la SIRT1, y no otras clases de desacetilasas, modula la actividad de LXR en el promotor ABCA1, y lo hace, de forma interesante, como un modulador positivo.

Adicionalmente, se observa que el sistema usado en estos experimentos aporta un método para determinar la modulación de procesos dependientes de LXR por una sustancia candidata.

Ejemplo 6. Efecto de la actividad de SIRT1 sobre el promotor ABCA1.

Para determinar directamente la influencia de SIRT1 sobre el promotor ABCA1, estas construcciones indicadoras de promotor fueron introducidas en MEFs de *SIRT1*^{+/+} y *SIRT1*^{-/-} immortalizados que fueron o no infectados con el vector pBabe-mT1 para expresar proteína SIRT1 (Figura 2c). Se generaron MEFs *SIRT1*^{+/+} y *SIRT1*^{-/-} y se infectaron con pBabe-SIRT1 (+) o con un vector pBabe de control (-), tal como se describe en el Ejemplo 3.

La inserción de la Figura 2c, panel derecho, muestra los resultados de inmuno-tinción de los niveles de expresión de SIRT1 en estas cuatro líneas celulares; se usó tubulina como control de carga. La expresión de SIRT1 a partir de este vector fue ligeramente inferior a la SIRT1 endógena en MEFs *SIRT1*^{+/+}.

A continuación los MEFs fueron transfectados con vectores indicadores de luciferasa dirigidos por promotor natural (WT) o dirigidos por promotor ABCA1 de ratón mutantes de LXRE (-LXRE) en ausencia (barra rellena) o en presencia (barra hueca) de 22(R)-HC 10 μ M y 9-cisRA 1 μ M. Se midieron las actividades de luciferasa después de 24 h. Todas las células con el promotor natural exhibieron una marcada estimulación de la expresión de luciferasa cuando se trataron con los activadores de LXR/RXR (Figura 2c, panel izquierdo), mientras que la baja actividad basal en las células con el indicador mutante (-LXRE) de control no se vio estimulada por dichos activadores (Figura 2c, panel derecho). De forma más importante, la actividad dependiente de LXRE de la construcción de promotor natural fue un 40% inferior ($p < 0,02$) en las células que eran deficientes en SIRT1 (MEFs *SIRT1*^{-/-}) que en las células que eran *SIRT1*^{+/+}, o fueron reconstruidas con SIRT1 (pBabe-T1). Estos descubrimientos confirman el modelo de que la SIRT1 estimula el promotor ABCA1 vía LXR/RXR actuando en el LXRE.

El sistema experimental de este Ejemplo proporciona un método para determinar el efecto modulador de una sustancia candidata sobre el efecto dependiente de SIRT1 de los LXRs.

Ejemplo 7. Interacción de SIRT1 con el LXRE de promotor ABCA1.

Para determinar si la SIRT1 se une directamente al LXRE en el promotor ABCA1, usamos el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, del inglés "chromatin immunoprecipitation") y probamos con diferentes cebadores para el promotor ABCA1 murino.

El análisis ChIP se llevó a cabo tal como se ha descrito⁷⁶, con modificaciones. En resumen, las células fueron reticuladas en paraformaldehído al 1% en medio de cultivo durante 15 minutos a temperatura ambiente y el reticulado se detuvo con glicina 0,125 M. A continuación las células fueron cosechadas en tampón HEPES (HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,9, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10%, NP40 al 0,5%, Triton X-100 al 0,25%, y mezcla inhibidora de proteasa CompleteTM (Roche, Indianapolis, In.)), y los núcleos se purificaron. Los núcleos purificados fueron re-suspendidos en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, y mezcla inhibidora de proteasa CompleteTM), y sometidos a ultrasonidos sobre hielo hasta una longitud promedio de 1 kb. Los sobrenadantes sometidos a ultrasonidos fueron diluidos con tampón IP (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, glicerol al 10%, Triton X-100 al 1%, Na-Desoxicolato al 0,1%, y mezcla inhibidora de proteasa CompleteTM), se pre-limpiaron dos veces con partículas de proteína A. Las muestras de cromatina pre-limpiadas fueron entonces incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-SIRT1 (Upstate, Charlottesville, Va) durante una noche a 4°C, y los complejos inmunes fueron recuperados añadiendo partículas de proteína A durante 2 h. Los inmunoprecipitados recuperados fueron lavados entonces dos veces con tampón IP, dos veces con tampón IP con NaCl 500 mM, y dos veces con tampón RIPA (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 250 mM, NP40 al 0,5%, Na-desoxicolato al 0,5%, y mezcla inhibidora de proteasa CompleteTM). A continuación se eluyeron las cromatinas de los inmunoprecipitados con 10xTE/SDS al 1% a 65°C durante 15 minutos. Las cromatinas eluidas fueron incubadas a 65°C durante al menos 6 h hasta obtener el reticulado inverso, se trataron con proteinasa K y con RNasa A, y se extrajeron con fenol/cloroformo y con cloroformo. Los fragmentos de ADN finales fueron recuperados mediante precipitación de LiCl/glicógeno/etanol y las partículas fueron re-suspendidas en agua y analizadas mediante PCR.

Para el LXRE de promotor ABCA1 de ratón, la reacción PCR se llevó a cabo usando los cebadores

5'-GCTTTCTGCTGAGTGAAGTACTGAACTAC-3' (SEC ID N°: 13); y

5'-GAATTACTGCTTTTTGCCGCG-3' (SEC ID N°: 14).

Como control negativo del anterior ensayo CHIP, también se amplificó un fragmento de 6,2 kb localizado por encima del LXRE en el promotor ABCA1 con los cebadores

5 5'-GCAGCCCAACTCTTCAGAAC-3' (SEC ID N°: 15); y

5'TCCCCTTTGTCTTTGTGGAC-3' (SEC ID N°: 16).

Para el LXRE de promotor humano, la reacción PCR se llevó a cabo usando los cebadores

5'-GCTTTCTGCTGAGTGAAGTACTGAACTAC-3' (SEC ID N°: 17); y

5'-TGCCTCTCTTTCTCCTACCC-3' (SEC ID N°: 18).

10 Un fragmento de 7,5 kb situado por encima del LXRE fue amplificado con los cebadores

5'-AGGCAGGTGGATCATTGAG-3' (SEC ID N°: 19); y

5'-CCAAACATCTGGGCTTCTGT-3' (SEC ID N°: 20)

como control negativo. El experimento se llevó a cabo al menos tres veces, y se muestran los datos representativos.

15 La Figura 2d superior muestra los resultados de probar con sondas de LXRE- o de PCR específicas de la parte superior antes (Entrada) o después (α SIRT1) de inmunoprecipitación con anticuerpos de SIRT1. Se observa en el tratamiento experimental (α SIRT1) el tratamiento con anticuerpos precipitó fragmentos de cromatina que contenían el LXRE procedente de MEFs de *SIRT1*^{+/+} (banda izquierda, imagen superior que muestra una banda gris oscura), pero de controles de MEF de *SIRT1*^{-/-} (banda derecha, imagen superior en negro sólido), y no precipitó fragmentos que contenían ADN de 6,2 kb por encima del LXRE de ninguna línea celular (imagen inferior, ambas bandas, en negro sólido). Se obtuvieron resultados similares en células HEK293T humanas (Figura 2d, parte inferior) y THP-1 (datos no mostrados) transfectadas con un vector para expresar SIRT1 humana marcada con el epítipo FLAG o un vector de control negativo, y precipitadas con un anticuerpo anti-FLAG. Por tanto, la SIRT1 se une al promotor ABCA1 en proximidad al LXRE.

Ejemplo 8. Interacción de SIRT1 con LXR α y LXR β

25 La SIRT1 no se une directamente a ADN²⁶, así que su presencia en el promotor ABCA1 requiere la unión a proteínas asociadas a ADN, tales como los LXRs. Existen dos miembros de la familia de factor transcripcional LXR, el LXR α y el LXR β ^{50,52}. La expresión de LXR α es específica de tejido, mientras que la de LXR β es ubicua. Para determinar si había asociación entre SIRT1 y LXRs mediante co-inmunoprecipitación, se clonaron ADNs murinos de LXR α y LXR β en vectores de expresión marcados con HA. A continuación se transfectó el vector de expresión de SIRT1 pBabe-SIRT1 en células HEK293T con o sin los vectores para los LXRs marcados con HA.

30 En este Ejemplo, se examinó la posible interacción entre SIRT1 y LXR α y LXR β . Se crearon plásmidos que expresan LXR α y LXR β marcados con HA en el NH₂ terminal (HA-LXR α y HA-LXR β) mediante clonación del ADNc de LXR α o de LXR β de ratón de longitud completa por debajo de (en el mismo marco) un epítipo de HA en un vector pcDNA3-NHA modificado. Células HEK293T que sobre-expresan SIRT1 de ratón (MmSIRT1) y HA-LXR α , o MmSIRT1 y HA-LXR β , fueron cosechadas en tampón NP40 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, NP40 al 0,5% y mezcla inhibidora de proteasa CompleteTM) y lisadas haciéndolas pasar 10 veces a través de una aguja de jeringa del 18. Tras hacerlas girar a 4 °C durante 1 h, los lisatos fueron sometidos a centrifugación a 16.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante resultante fue diluido entonces en tampón NP40 con BSA al 1% y se inició la inmunoprecipitación añadiendo 3 μ g de anticuerpos monoclonales anti-HA (Santa Cruz Biotechnology). A continuación la mezcla se incubó con agitación a 4° C durante 2 h durante una noche. Los complejos inmunes fueron recuperados añadiendo partículas de proteína A durante otra hora adicional y los inmunoprecipitados fueron lavados cinco veces con 1 mL de tampón NP40. Los lisatos totales y las correspondientes muestras de inmuno-precipitación fueron separadas entonces mediante SDS-PAGE y fueron inmuno-teñidas con anticuerpos policlonales anti-SIRT1 y anticuerpos anti-myc o anti-HA.

45 Los anticuerpos anti-LXR α monoclonales de ratón procedían de R&D system y los anticuerpos anti-LXR α / β policlonales de cabra eran de Santa Cruz Biotechnology. Células humanas HEK293T que expresaban las proteínas indicadas fueron lisadas e inmunoprecipitadas (IP) con anticuerpos monoclonales anti-HA tal como se ha descrito antes (Figura 2e). Los lisatos totales (bandas 1-4) y las muestras anti-HA de inmuno-precipitación (bandas 5-8) fueron separadas a continuación mediante SDS-PAGE y probadas con anticuerpos policlonales anti-SIRT1 (imágenes de la parte superior) y con anticuerpos anti-HA-LXR α (panel superior) o anti-HA-LXR β (panel inferior). Tal como se muestra en la Figura 2e, la proteína SIRT1 murina transfectada (mT1) fue precipitada en cruzado por los anticuerpos anti-HA solamente cuando LXR α o LXR β era co-expresado en las células (banda 8, paneles superior e

inferior). El HA-LXR también co-precipitó la proteína SIRT1 humana endógena (hT1), que exhibió una movilidad ligeramente menor en los geles. Por tanto, la unión directa o indirecta de SIRT1 a LXR es probablemente la responsable de la asociación de SIRT1 con el LXRE del promotor ABCA1 en células intactas.

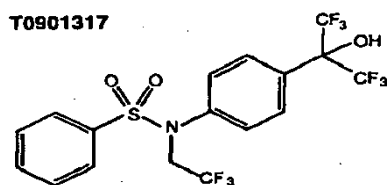
Además, el experimento de inmunoprecipitación descrito en este Ejemplo proporciona un ensayo sensible para determinar la capacidad de una sustancia de ensayo para modular la interacción de SIRT1 con LXR α o con LXR β .

Ejemplo 9. El LXR se dirige a ARNms en hígados de ratones *SIRT1*^{-/-}.

La interacción entre LXRs y SIRT1 hace surgir la posibilidad de que una pérdida de función de la SIRT1 pudiera afectar negativamente a la homeostasis de lípidos mediada por LXR en respuesta al colesterol de dieta. Para probar esta hipótesis, se analizaron los niveles de ARNms de una serie de genes diana de LXR, que incluyen el ABCA1, en los hígados de ratones *SIRT1*^{-/-} (Figura 3a), usando ARN total procedente de hígados de animales de control naturales (barras rellenas) y animales *SIRT1*^{-/-} (barras huecas). Los análisis se llevaron a cabo mediante PCR en tiempo real. Incluso aunque los niveles de ARNm de LXR fueron normales en hígados de *SIRT1*^{-/-}, muchas dianas de LXR, tales como SREBP1, ABCA1, ABCG1, ABCG5 y LDLR, disminuyeron en comparación con los controles de *SIRT1*^{+/+} (n=3, *, p<0,05). Los niveles de ARNm de genes de control conocidos por no ser dianas de LXR^{53,54} no se vieron alterados significativamente en ratones *SIRT1*^{-/-}.

Ejemplo 10. Niveles relativos de metabolitos en hígados de ratones tratados con el agonista de LXR T0901317.

Para profundizar en el conocimiento del efecto de SIRT1 sobre la función de LXR *in vivo*, se analizaron animales naturales y *SIRT1*^{-/-} para determinar su respuesta a una administración oral de 8 días del agonista de LXR T0901317 (N-(2,2,2-trifluoro-etil)-N-[4-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxi-1-trifluorometil-etil)-fenil]-bencenosulfonamida)⁵³.



Para detectar proteínas ABCA1 en tejidos de ratón, se homogeneizaron hígados de *SIRT1*^{+/+} o de *SIRT1*^{-/-} en tampón RIPA. A continuación se mezclaron extractos de hígado con tampón de muestra de SDS y se desnaturalizaron a 37 °C durante 20 minutos para prevenir la agregación de ABCA1 a alta temperatura. A continuación las muestras fueron resueltas en SDS-PAGE al 7,5% y teñidas con anticuerpos policlonales anti-ABCA1 (anticuerpos R80, obsequio de los Drs. M. Fitzgerald y M. Freeman).

Ratones macho *SIRT1*^{-/-} y de control de 2-6 meses de edad fueron alimentados con T0901317 (10 mg/kg) mediante administración oral, se recolectó plasma antes y después de la alimentación para realizar análisis de lípidos en plasma. Los tejidos fueron recolectados después de la alimentación para realizar análisis adicionales. El ARN total de hígado de animales naturales sin alimentar (barra rellena negra) o alimentados con 10 mg/kg de T0901317 (barra a rayas negras) y ratones *SIRT1*^{-/-} sin (barra hueca) o con T0901317 (barra a rayas grises) fue analizado mediante PCR a tiempo real. La alimentación con T0901317 de animales naturales indujo significativamente la expresión de varias dianas de LXR: SREBP-1 c, LPL y ABCA1 a nivel de ARN (Figura 3b) (n=4, **, p<0,05). Sin embargo, la inducción de estas dianas en ratones *SIRT1*^{-/-} fue nula. Se obtuvieron los lisatos de proteína totales procedentes de hígados de los ratones indicados y se analizaron para determinar los niveles de proteína ABCA1 mediante inmunotinción (Figura 3c). (Tal como se ha indicado previamente, las proteínas ABCA1 comprenden múltiples bandas mediante tinción western⁷⁸).

Los resultados en plasma de la Figura 3, paneles d, e y f representan los mismos ratones antes y después de una administración de 8 días de T0901317. Los resultados de hígados de la Figura 3, panel d, comparan compañeros de camada con o sin T0901317, y antes en la Figura 3, b (Ejemplo 9) y c (este Ejemplo). Se analizaron los triglicéridos en plasma (Figura 3 d, panel izquierdo) e hígado (Figura 3 d, panel derecho) de ratones naturales sin (barra rellena negra) o con T0901317 (barra a rayas izquierda) y de animales *SIRT1*^{-/-} sin (barra hueca) o con T0901317 (barra a rayas derecha). Se observó una reducción en la respuesta de animales *SIRT1*^{-/-} frente a la inducción debida a T0901317 agonista de LXR⁵³ de la acumulación de triglicéridos en plasma e hígado (Figura 3d; n=5, ***, p<0,001). También se observaron niveles inferiores de colesterol en plasma en los ratones tratados (Figura 3e; n=5, ****, p<0,02) especialmente en el tamaño de las partículas de HDL, determinado mediante ensayos de colesterol de fracciones de lipoproteína FPLC (Figura 3f; n=5)). Debido a que el T0901317 da como resultado una elevación de los triglicéridos en plasma y en hígado a través de la inducción de SREBP-1c⁵³, los bajos niveles de ARN-m de SREBP1-c en ratones *SIRT1*^{-/-} (Figura 3a) pueden explicar la reducción de triglicéridos inducida por T0901317. Por tanto, el efecto de SIRT1 sobre el promotor ABCA1 en ensayos indicadores no fue sólo dependiente sobre el LXR, sino que las funciones de LXR y su agonista *in vivo* también fueron dependientes de SIRT1.

Ejemplo 11. Efecto de SIRT1 sobre la expresión de proteína LXR.

La SIRT1 interactúa directamente y desacetila muchas proteínas diana, tales como histonas 12, p53 15-17, factores transcripcionales FOXO 18, 19 y PGC-1 α 23, 24. La desacetilación de estas dianas por SIRT1 reprime (p53 y FOXO en algunos promotores) o activa (PGC-1 α y FOXO en otros promotores) sus actividades transcripcionales. Para investigar cómo la SIRT1 regula positivamente el LXR, se determinaron primero los niveles de proteína LXR endógena en los hígados de ratones SIRT1^{+/+} y SIRT1^{-/-}. Sorprendentemente, los niveles de proteína LXR aumentaron drásticamente en animales SIRT1^{-/-} (Figura 4a), incluso aunque la capacidad de la LXR para activar dianas se redujo en comparación con el tipo natural (Ejemplo 9; Figura 3a).

Se transfectaron células HEK293T que expresan HA-LXR β dirigido por un promotor CMV exógeno con vector pSuper, o con una construcción pSuper-SIRT1 RNAi. Las células fueron cosechadas 3 días después de la transfección y los niveles de HA-LXR β y SIRT1 fueron analizados mediante análisis de transferencia western usando anticuerpos de HA y SIRT1. Se descubrió que el abatimiento de la expresión de SIRT1 mediado por RNAi (Figura 4b, bandas 3 y 4) y la inhibición de la actividad de SIRT1 por nicotinamida –pero no la inhibición de otras desacetilasas por TSA– (Figura 4c) dieron como resultado niveles elevados de proteína HA-LXR β . Puesto que no se produjo una reducción detectable de ARNm de LXR en los ratones SIRT1^{-/-} (Figura 3a), la SIRT1 regula los niveles de proteína LXR post-transcripcionalmente.

Se trataron células HEK293T que expresan HA-LXR β con medio de control (Figura 3c, banda 1) o con medio con TSA 1 μ M (banda 2), nicotinamida 10 mM (banda 3), MG132 25 μ M (carbobenciloxi-Leu-Leu-Leu-al, un inhibidor de proteasa) (banda 4), o nicotinamida 10 mM más MG132 25 μ M (banda 5) durante 6 horas. A continuación las células fueron cosechadas y se analizaron los niveles de HA-LXR β y SIRT1 mediante análisis de transferencia western usando anticuerpos de HA (imágenes de la parte superior) y SIRT1 (imágenes del medio). La inhibición de la actividad de SIRT1 por nicotinamida (banda 3) –pero no la inhibición de otras desacetilasas por TSA (banda 2)– dio como resultado niveles elevados de proteína HA-LXR β (imágenes de la parte superior). Puesto que no se produjo una reducción detectable del ARNm de LXR en ratones SIRT1^{-/-} (véase el Ejemplo 9, Figura 3a), la SIRT1 regula los niveles de proteína LXR post-transcripcionalmente. Se cree que la inhibición de la actividad de SIRT1 por nicotinamida aumenta los niveles de proteína LXR interfiriendo con la degradación de LXR mediada por proteasoma.

A continuación se examinó la base del descubrimiento de que la actividad de LXR está relacionada inversamente con los niveles de proteína. Puesto que la acetilación de residuos de lisina puede bloquear la ubiquitinación y la SIRT1 es una desacetilasa, la pérdida de actividad de SIRT1 podría estabilizar proteínas LXR aumentando el nivel de estado estacionario de la acetilación de LXR, inhibiendo de este modo el mecanismo de degradación de ubiquitina/proteasoma. Si esto fuera cierto, la inhibición de la actividad de proteasoma por MG132 debería incrementar los niveles de estado estacionario de LXR cuando la SIRT1 está activa, pero no cuando la SIRT1 está inhibida por nicotinamida. De hecho esto se observó en células HEK293T que expresan LXR β marcado con HA (Figura 4c, banda 4 frente a banda 5)).

Las células HEK293T fueron co-transfectadas con construcciones que expresan un vector pBabe vacío, HA-LXR β , pBabe-SIRT1 y pBabe-hSIRT1HY (un mutante de SIRT1 de desacetilasa inactiva (véase Vaziri y col., 2001)). 40 h después, las células fueron incubadas con MG132 25 μ M durante 1 h y se recolectaron. A continuación se inmunoprecipitó la HA-LXR β usando anticuerpos de HA seguido de un análisis de transferencia western usando anticuerpos de ubiquitina, HA y SIRT1. Los resultados muestran que la expresión de un transgén de SIRT1 activo (hSIRT1), pero no la del mutante inactivo hSIRT1HY, aumentó la cantidad de LXR conjugada a ubiquitina en células HEK293T transfectadas (Figura 4d, banda 3 frente a banda 4).

Ejemplo 12. Acetilación de LXR *in vivo*.

Para detectar la acetilación de LXR y la desacetilación de LXR por SIRT1 *in vivo*, células HEK293T co-transfectadas con HA-LXR β , y con pBabe, pBabe-HsSIRT1 o pBabe-HsSIRT1H355Y, fueron cultivadas en un medio que contenía [³H]acetato de sodio, tal como se ha descrito⁷⁷ con modificaciones. En resumen, 40 h después de la transfección, se añadieron al cultivo 2 mCi/mL de [³H]acetato de sodio, el inhibidor de proteasoma MG132 (25 μ M), 22(R)-HC (10 μ M) y 9-cis-RA (1 μ M) al cultivo durante 1 h. A continuación las células fueron lavadas dos veces con disolución salina tamponada con fosfato y lisadas en tampón NP40. El lisato se centrifugó a 16.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Entonces se inmunoprecipitó HA-LXR β con anticuerpo anti-HA y se separó mediante SDS-PAGE. Los geles que contenían HA-LXR β marcada con [³H]acetato primero fueron teñidos con Azul Brillante de Coomassie y a continuación fueron potenciados mediante impregnación con una disolución potenciadora de fluorografía comercial (Amplify, Amersham Biosciences) durante 30 minutos. Los geles secados se sometieron a autoradiografía a -70°C durante 3-7 días. Las mismas muestras también fueron inmuno-tratadas con anticuerpos anti-SIRT1.

Los resultados se muestran en la Figura 4e. La HA-LXR β fue desacetilada en condiciones normales de cultivo (banda 1). Además, la activación de LXR β mediante tratamiento con 22(R)-HC + 9-cisRA estimuló la desacetilación (y/o posiblemente inhibió la acetilación; banda 2). Parece probable que la SIRT1 sea responsable, al menos en parte, de la desacetilación de LXR, porque, tal como se muestra en la Figura 4f, los niveles de HA-LXR β marcada con [³H]acetato fueron sustancialmente menores en las células que expresan hSIRT1 (pBabe-hSIRT1; banda 2), que en las células de control transfectadas con un vector vacío (pBabe; banda 1) o con uno que codifica una SIRT1

enzimáticamente inactiva (pBabe-hSIRT1HY; banda 3). Estos descubrimientos sugieren que la desacetilación de LXR β por SIRT1 facilita su frecuencia de recambio y aumenta su actividad.

Ejemplo 13. Efecto de la inhibición de SIRT1 o de la degradación de LXR mediada por proteasoma sobre la actividad de transcripción de LXR en el promotor ABCA1.

- 5 Células HEK293T transfectadas con vectores indicadores de luciferasa dirigidos por promotor ABCA1 de ratón natural (WT; Figura 4g, panel izquierdo) o mutante LXRE (-LXRE; Figura 4g, panel derecho) fueron tratadas con nicotinamida (Nico) 10 mM, MG132 25 μ M o ambas nicotinamida 10 mM + MG132 25 μ M, en ausencia (barras sólidas) o en presencia (barras abiertas) de 22(R)-HC 10 μ M y 9-cisRA 1 μ M durante 6 h. Se midieron las actividades de luciferasa y se normalizaron como en el Ejemplo 5.
- 10 Se descubrió que la nicotinamida cortada la inducción del indicador de luciferasa dirigida por el promotor ABCA1 de forma significativa (Figura 4, panel izquierdo). Además, el inhibidor de proteasoma MG132 inhibió el indicador en la misma extensión que la nicotinamida, y la combinación de nicotinamida y MG132 no dio como resultado ninguna inhibición adicional. El indicador de control que carecía de LXRE mostró una actividad basal que no se vio alterada por la nicotinamida o el MG132 (Figura 4g, panel derecho). Estos descubrimientos sugieren que la desacetilación de LXR β por SIRT1 y su posterior ubiquitinación y degradación por la proteasoma ayudan a activar el promotor ABCA1, tal como se discute a continuación.

Estos Ejemplos demuestran que la SIRT1 regula de forma positiva factores de transcripción de LXR, y por tanto desempeña un papel importante en la regulación de la homeostasis de colesterol. La LXR y la SIRT1 activan la transcripción del gen que codifica el transportador de ABCA1, que media en el transporte inverso de colesterol y en la síntesis de HDL. Estos descubrimientos pueden ser directamente relevantes para la medicina humana, ya que estudios genéticos y epidemiológicos indican que los niveles de HDL en plasma están inversamente relacionados al riesgo de enfermedades cardiovasculares³⁰ y posiblemente a la enfermedad de Alzheimer^{5,6}. El transporte de colesterol inverso mediado por HDL puede proteger contra la aterosclerosis eliminando el exceso de colesterol de las células arteriales^{55,56} y proteger contra la enfermedad de Alzheimer disminuyendo la formación de balsa rica en colesterol en el cerebro^{57,58}. Mediante la activación de LXR, la SIRT1 puede disminuir el riesgo de envejecimiento asociado a la aterosclerosis y posiblemente a la enfermedad de Alzheimer.

Las interacciones físicas y funcionales entre SIRT1 y LXRs sugieren que la SIRT1 ejerce al menos parte de sus efectos *in vivo* mediante la modulación de los LXRs. De hecho, los ratones deficientes en **SIRT1** comparten muchos defectos metabólicos con los ratones deficientes en LXR^{53,54,63}, tales como una disminución en los niveles de colesterol HDL (Figura 1) y triglicéridos (Figura 3d). Además, la PEPCK, la enzima limitante de la velocidad de la gluconeogénesis que puede ser reprimida por un agonista de LXR hepático⁶⁴, es inducida en ratones SIRT1-/-¹⁹. Recientemente se ha demostrado que la expresión génica dependiente de LXR y la homeostasis de energía son importantes para la respuesta inmune innata frente a microbios, y los ratones que carecen de LXRs son altamente susceptibles a infecciones con bacterias⁶⁵. Por lo tanto, es posible que la susceptibilidad observada de los animales sin SIRT1 en la infección pulmonar²⁶ y en la infección ocular (observación no publicada) se deba a una reducción de la actividad de LXR en dichos animales.

Los presentes descubrimientos sugieren que la SIRT1 promueve la actividad de LXR mediante su desacetilación y causando su recambio (Figura 5). La regulación de LXR por SIRT1 coloca a la sirtuina en el centro de los mecanismos de homeostasis del colesterol.

40 Referencias

1. Grundy, S. M. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. *Circulation* 105, 2696-2698 (2002).
2. Kivipelto, M. y col. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Bmj* 322, 1447-51 (2001).
3. Kivipelto, M. y col. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Ann Intern Med* 137, 149-55 (2002).
4. Wolozin, B. Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease. *Neuron* 41, 7-10 (2004).
5. Merched, A., Xia, Y., Visvikis, S., Serot, J. M. & Siest, G. Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21, 27-30 (2000).
6. Bonarek, M. y col. Relationships between cholesterol, apolipoprotein E polymorphism and dementia: a cross-sectional analysis from the PAQUID study. *Neuroepidemiology* 19, 141-8 (2000).
7. Blander, G. y Guarente, L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73, 417-35 (2004).
8. Wood, J. G. y col. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430, 686-9

(2004).

9. Rogina, B. y Helfand, S. L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15998-6003 (2004).
- 5 10. Lin, S. J., Defossez, P. A. & Guarente, L. Requirement of NAD and SIR2 for lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-8 (2000).
11. Lin, S. J. y col. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418, 344-8 (2002).
12. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaerberlein, M. & Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800 (2000).
- 10 13. Landry, J. y col. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5807-11 (2000).
14. Smith, J. S. y col. A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6658-63 (2000).
15. Luo, J. y col. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107, 137-48 (2001).
- 15 16. Vaziri, H. y col. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107, 149-59 (2001).
17. Langley, E. y col. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *Embo J* 21, 2383-96 (2002).
18. Brunet, A. y col. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011-5 (2004).
- 20 19. Motta, M. C. y col. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 116, 551-63 (2004).
20. Araki, T., Sasaki, Y. & Milbrandt, J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 305, 1010-3 (2004).
21. Giannakou, M. E. y Partridge, L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol* 14, 408-12 (2004).
- 25 22. Picard, F. y col. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429, 771-6 (2004).
23. Rodgers, J. T. y col. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434, 113-8 (2005).
- 30 24. Nemoto, S., Fergusson, M. M. y Finkel, T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 {alpha}. *J Biol Chem* 280, 16456-60 (2005).
25. Rigotti, A., Miettinen, H. E. y Krieger, M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev* 24, 357-87 (2003).
26. McBurney, M W. y col. The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Mol Cell Biol* 23, 38-54 (2003).
- 35 27. Cheng, H. L. y col. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003).
28. Brewer, H. B., Jr. y Santamarina-Fojo, S. New insights into the role of the adenosine triphosphate-binding cassette transporters in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport. *Am J Cardiol* 91, 3E-11E (2003).
- 40 29. Krieger, M. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the HDL receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem* 68, 523-588 (1999).
30. Oram, J. F. y Lawn, R. M. ABCA1: the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Research* 42, 1173-1179 (2001).
- 45 31. Lewis, G. F. y Rader, D. J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 96, 1221-32 (2005).
32. Ji, Y. y col. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol*

- Chem 272, 20982-5 (1997).
33. Liu, T., Krieger, M., Kan, H. Y. y Zannis, V. I. The effects of mutations in helices 4 and 6 of ApoA-I on scavenger receptor class B type I (SR-BI)-mediated cholesterol efflux suggest that formation of a productive complex between reconstituted high density lipoprotein and SR-BI is required for efficient lipid transport. *J Biol Chem* 277, 21576-84 (2002).
- 5 34. Gu, X., Kozarsky, K. y Krieger, M. Scavenger receptor class B, type I-mediated [3H]cholesterol efflux to high and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor. *J Biol Chem* 275, 29993-30001 (2000).
35. Zhang, Y. y col. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* 115, 2870-4 (2005).
- 10 36. Nakamura, K. y col. Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1 mRNAs/isoforms that stimulate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein. *J Biol Chem* 279, 45980-9 (2004).
37. Kennedy, M. A. y col. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* 1, 121-31 (2005).
- 15 38. Brooks-Wilson, A. y col. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 22, 336-45 (1999).
39. Bodzioch, M. y col. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 22, 347-51 (1999).
- 20 40. Rust, S. y col. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 22, 352-5 (1999).
41. Lawn, R. M. y col. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* 104, R25-31 (1999).
42. Joyce, C., Freeman, L., Brewer, H. B., Jr. y Santamarina-Fojo, S. Study of ABCA1 function in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 965-71 (2003).
- 25 43. Oram, J. F., Wolfbauer, G., Vaughan, A. M., Tang, C. y Albers, J. J. Phospholipid transfer protein interacts with and stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and enhances cholesterol efflux from cells. *J Biol Chem* 278, 52379-85 (2003).
44. Smith, J. D. y col. ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 45, 635-44 (2004).
- 30 45. Bitterman, K. J., Anderson, R. M., Cohen, H. Y., Latorre-Esteves, M. y Sinclair, D. A. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* 277, 45099-45107 (2002).
46. McNeish, J. y col. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4245-50 (2000).
- 35 47. Costet, P., Luo, Y., Wang, N. y Tall, A. R. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 275, 28240-28245 (2000).
48. Schwartz, K., Lawn, R. M. y Wade, D. P. ABC1 gene expression and apoA1-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 794-802 (2000).
- 40 49. Venkateswaran, A. y col. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXRA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12097-12102 (2000).
50. Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M. y Mangelsdorf, D. J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866-1870 (2001).
51. Steffensen, K. R. y Gustafsson, J. A. Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes* 53, S36-S42 (2004).
- 45 52. Peet, D. J., Janowski, B. A. y Mangelsdorf, D. J. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev* 8, 571-5 (1998).
53. Schultz, J. R. y col. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14, 2831-2838 (2000).

54. Kalaany, N. Y. y col. LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. *Cell Metab* 1, 231-44 (2005).
55. von Eckardstein, A., Nofer, J. R. y Assmann, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 13-27 (2001).
56. Linsel-Nitschke, P. y Tall, A. R. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 4, 193-205 (2005).
57. Simons, M. y col. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6460-4 (1998).
58. Simons, K. y Eehalt, R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 110, 597-603 (2002).
59. Wang, C. y col. Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem* 276, 18375-83 (2001).
60. Fu, M. y col. Androgen receptor acetylation governs trans activation and MEKK1-induced apoptosis without affecting in vitro sumoylation and trans-repression function. *Mol Cell Biol* 22, 3373-88 (2002).
61. Fu, M. y col. Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. *Mol Cell Biol* 23, 8563-75 (2003).
62. Fu, M., Wang, C., Zhang, X. y G., P. R. Acetylation of nuclear receptors in cell growth and apoptosis. *Biochemical Pharmacology* 68, 1199-1208 (2004).
63. Schuster, G. U. y col. Accumulation of foam cells in liver X receptor-deficient mice. *Circulation* 106, 1147-1153 (2002).
64. Cao, G. y col. Antidiabetic action of a liver X receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem* 278, 1131-1136 (2003).
65. Joseph, S. B. y col. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* 119, 299-309 (2004).
66. Lipford, J. R. y Deshaies, R. J. Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. *Nature cell Biol.* 5, 845-850 (2003).
67. Lipford, J. R., Smith, G. T., Chi, Y. y Deshaies, R. J. A putative stimulatory role for activator turnover in gene expression. *Nature* 438, 113-116 (2005).
68. Pagans, S. y col. SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS Biol* 3, e41 (2005).
69. Kitamura, Y. I. y col. FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab* 2, 153-63 (2005).
70. Lutjohann, D. y col. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9799-9804 (1996).
71. Lutjohann, D. y col. Profile of cholesterol-related sterols in aged amyloid precursor protein transgenic mouse brain. *J Lipid Research* 43, 1078-1085 (2002).
72. Chawla, A. y col. APPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7, 161-71 (2001).
73. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. y Lacy, E. *Manipulating the Mouse Embryo, a laboratory manual.* Second Edition, 260-261 (1994).
74. Vinals, M., Xu, S., Vasile, E. y Krieger, M. Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. *J Biol Chem* 278, 5325-32 (2003).
75. Parathath, S. y col. Glycine 420 near the C-terminal transmembrane domain of SR-BI is critical for proper delivery and metabolism of high density lipoprotein cholesteryl ester. *J Biol Chem* 279, 24976-85 (2004).
76. Takahashi, Y., Rayman, J. B. y Dynlacht, B. D. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* 14, 804-16 (2000).
77. Blander, G. y col. DNA damage-induced translocation of the Werner helicase is regulated by acetylation. *J Biol Chem* 277, 50934-40 (2002).

78. Denis, M. y col. Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 279, 41529-36 (2004).
79. VandenDriessche, T.; Vanslembrouck, V.; Goovaerts, I.; Zwinnen, H.; Vanderhaeghen, M.-L.; Collen, D.; Chuah, M. K. L. : Long-term expression of human coagulation factor VIII and correction of hemophilia A after in vivo retroviral gene transfer in factor VIII-deficient mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 10379-10384 (1999).
80. Roth, D. A.; Tawa, N. E., Jr.; O'Brien, J. M.; Treco, D. A.; Selden, R F. : Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *New Eng. J. Med.* 344: 1735-1742 (2001).
81. Goudy, K.; Song, S.; Wasserfall, C.; Zhang, Y. C.; Kapturczak, M.; Muir, A.; Powers, M.; Scott-Jorgensen, M.; Campbell-Thompson, M.; Crawford, J. M.; Ellis, T. M.; Flotte, T. R.; Atkinson, M. A. : Adeno-associated virus vector-mediated IL-10 gene delivery prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98: 13913-13918 (2001).
82. Wells DJ. *Curr Opin Drug Discov Devel.* Viral and non-viral methods for gene transfer into skeletal muscle. 9(2):163-8 (2006).
83. Post DE, Shim H, Toussaint-Smith E, Van Meir EG. Cancer scene investigation: how a cold virus became a tumor killer. *Future Oncol.* 1(2):247-58 (2005).
84. Takahashi S, Ito Y, Hatake K, Sugimoto Y. Gene therapy for breast cancer. --Review of clinical gene therapy trials for breast cancer and MDR1 gene therapy trial in Cancer Institute Hospital. *Breast Cancer.* 13(1):8-15 (2006).
85. Broedl UC, Rader DJ. Gene therapy for lipoprotein disorders *Expert Opin Biol Ther.* 5(8):1029-38 (2005).
86. Miyake H, Hara I, Gleave ME. Antisense oligodeoxynucleotide therapy targeting clusterin gene for prostate cancer: Vancouver experience from discovery to clinic. *Int J Urol.* Sep. 12(9):785-94 (2005).
87. Satoh T, Irie A, Egawa S, Baba S In situ gene therapy for prostate cancer. *Curr Gene Ther.* 5(1):111-9 (2005).

Listado de secuencias

- <110> Massachusetts Institute of Technology
- GUARENTE, Leonard
- KRIEGER, Monty
- LI, Xiaoling
- <120> Complejo regulador de colesterol de SIRT1 y LXR y Métodos de uso
- <130> 407-02-PCT
- <150> EE.UU. 60/811.154
- <151> 2006-06-06
- <160> 20
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 747
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Ala Asp Glu Ala Ala Leu Ala Leu Gln Pro Gly Gly Ser Pro Ser
 1 5 10 15

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

Leu Arg Lys Arg Pro Arg Arg Asp Gly Pro Gly Leu Glu Arg Ser Pro
 35 40 45

Gly Glu Pro Gly Gly Ala Ala Pro Glu Arg Glu Val Pro Ala Ala Ala
 50 55 60

Arg Gly Cys Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Leu Trp Arg Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Glu Gln Glu Ala Gln Ala Thr Ala
 85 90 95

Ala Ala Gly Glu Gly Asp Asn Gly Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Arg
 100 105 110

Glu Pro Pro Leu Ala Asp Asn Leu Tyr Asp Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 115 120 125

Gly Glu Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ile Gly Tyr Arg Asp
 130 135 140

Asn Leu Leu Phe Gly Asp Glu Ile Ile Thr Asn Gly Phe His Ser Cys
 145 150 155 160

Glu Ser Asp Glu Glu Asp Arg Ala Ser His Ala Ser Ser Ser Asp Trp
 165 170 175

Thr Pro Arg Pro Arg Ile Gly Pro Tyr Thr Phe Val Gln Gln His Leu
 180 185 190

Met Ile Gly Thr Asp Pro Arg Thr Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu
 195 200 205

Thr Ile Pro Pro Pro Glu Leu Asp Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile Val
 210 215 220

Ile Asn Ile Leu Ser Glu Pro Pro Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ile
 225 230 235 240

Asn Thr Ile Glu Asp Ala Val Lys Leu Leu Gln Glu Cys Lys Lys Ile
 245 250 255

Ile Val Leu Thr Gly Ala Gly Val Ser Val Ser Cys Gly Ile Pro Asp
 260 265 270

Phe Arg Ser Arg Asp Gly Ile Tyr Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Pro
 275 280 285

Asp Leu Pro Asp Pro Gln Ala Met Phe Asp Ile Glu Tyr Phe Arg Lys
 290 295 300

Asp Pro Arg Pro Phe Phe Lys Phe Ala Lys Glu Ile Tyr Pro Gly Gln
 305 310 315 320

Phe Gln Pro Ser Leu Cys His Lys Phe Ile Ala Leu Ser Asp Lys Glu
 325 330 335

Gly Lys Leu Leu Arg Asn Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Gln
 340 345 350

Val Ala Gly Ile Gln Arg Ile Ile Gln Cys His Gly Ser Phe Ala Thr
 355 360 365

Ala Ser Cys Leu Ile Cys Lys Tyr Lys Val Asp Cys Glu Ala Val Arg
 370 375 380

Gly Asp Ile Phe Asn Gln Val Val Pro Arg Cys Pro Arg Cys Pro Ala

ES 2 362 941 T3

385		390		395		400									
Asp	Glu	Pro	Leu	Ala	Ile	Met	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Phe	Phe	Gly	Glu
			405						410					415	
Asn	Leu	Pro	Glu	Gln	Phe	His	Arg	Ala	Met	Lys	Tyr	Asp	Lys	Asp	Glu
			420					425					430		
Val	Asp	Leu	Leu	Ile	Val	Ile	Gly	Ser	Ser	Leu	Lys	Val	Arg	Pro	Val
		435					440					445			
Ala	Leu	Ile	Pro	Ser	Ser	Ile	Pro	His	Glu	Val	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile
	450					455					460				
Asn	Arg	Glu	Pro	Leu	Pro	His	Leu	His	Phe	Asp	Val	Glu	Leu	Leu	Gly
465					470					475					480
Asp	Cys	Asp	Val	Ile	Ile	Asn	Glu	Leu	Cys	His	Arg	Leu	Gly	Gly	Glu
				485					490				495		
Tyr	Ala	Lys	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Val	Lys	Leu	Ser	Glu	Ile	Thr	Glu
			500					505					510		
Lys	Pro	Pro	Arg	Thr	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala	Tyr	Leu	Ser	Glu	Leu	Pro
		515					520					525			
Pro	Thr	Pro	Leu	His	Val	Ser	Glu	Asp	Ser	Ser	Ser	Pro	Glu	Arg	Thr
	530					535					540				
Ser	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Val	Ile	Val	Thr	Leu	Leu	Asp	Gln	Ala	Ala
545					550					555				560	
Lys	Ser	Asn	Asp	Asp	Leu	Asp	Val	Ser	Glu	Ser	Lys	Gly	Cys	Met	Glu
				565					570					575	
Glu	Lys	Pro	Gln	Glu	Val	Gln	Thr	Ser	Arg	Asn	Val	Glu	Ser	Ile	Ala
			580					585					590		
Glu	Gln	Met	Glu	Asn	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Gly	Ser	Ser	Thr	Gly
		595					600					605			
Glu	Lys	Asn	Glu	Arg	Thr	Ser	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Arg	Lys	Cys	Trp
	610					615					620				
Pro	Asn	Arg	Val	Ala	Lys	Glu	Gln	Ile	Ser	Arg	Arg	Leu	Asp	Gly	Asn
625					630					635					640

Gln Tyr Leu Phe Leu Pro Pro Asn Arg Tyr Ile Phe His Gly Ala Glu
 645 650 655

Val Tyr Ser Asp Ser Glu Asp Asp Val Leu Ser Ser Ser Ser Cys Gly
 660 665 670

Ser Asn Ser Asp Ser Gly Thr Cys Gln Ser Pro Ser Leu Glu Glu Pro
 675 680 685

Met Glu Asp Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe Tyr Asn Gly Leu Glu Asp
 690 695 700

Glu Pro Asp Val Pro Glu Arg Ala Gly Gly Ala Gly Phe Gly Thr Asp
 705 710 715 720

Gly Asp Asp Gln Glu Ala Ile Asn Glu Ala Ile Ser Val Lys Gln Glu
 725 730 735

Val Thr Asp Met Asn Tyr Pro Ser Asn Lys Ser
 740 745

<210> 2

<211> 737

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Asp Glu Val Ala Leu Ala Leu Gln Ala Ala Gly Ser Pro Ser
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Met Glu Ala Ala Ser Gln Pro Ala Asp Glu Pro Leu
 20 25 30

Arg Lys Arg Pro Arg Arg Asp Gly Pro Gly Leu Gly Arg Ser Pro Gly
 35 40 45

Glu Pro Ser Ala Ala Val Ala Pro Ala Ala Ala Gly Cys Glu Ala Ala
 50 55 60

Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Leu Trp Arg Glu Ala Ala Gly Ala Ala
 65 70 75 80

Ala Ser Ala Glu Arg Glu Ala Pro Ala Thr Ala Val Ala Gly Asp Gly
 85 90 95

Asp Asn Gly Ser Gly Leu Arg Arg Glu Pro Arg Ala Ala Asp Asp Phe
 100 105 110
 Asp Asp Asp Glu Gly Glu Glu Glu Asp Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 115 120 125
 Ala Ala Ala Ile Gly Tyr Arg Asp Asn Leu Leu Leu Thr Asp Gly Leu
 130 135 140
 Leu Thr Asn Gly Phe His Ser Cys Glu Ser Asp Asp Asp Asp Arg Thr
 145 150 155 160
 Ser His Ala Ser Ser Ser Asp Trp Thr Pro Arg Pro Arg Ile Gly Pro
 165 170 175
 Tyr Thr Phe Val Gln Gln His Leu Met Ile Gly Thr Asp Pro Arg Thr
 180 185 190
 Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu Thr Ile Pro Pro Pro Glu Leu Asp
 195 200 205
 Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile Val Ile Asn Ile Leu Ser Glu Pro Pro
 210 215 220
 Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ile Asn Thr Ile Glu Asp Ala Val Lys
 225 230 235 240
 Leu Leu Gln Glu Cys Lys Lys Ile Ile Val Leu Thr Gly Ala Gly Val
 245 250 255
 Ser Val Ser Cys Gly Ile Pro Asp Phe Arg Ser Arg Asp Gly Ile Tyr
 260 265 270
 Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Pro Asp Leu Pro Asp Pro Gln Ala Met
 275 280 285
 Phe Asp Ile Glu Tyr Phe Arg Lys Asp Pro Arg Pro Phe Phe Lys Phe
 290 295 300
 Ala Lys Glu Ile Tyr Pro Gly Gln Phe Gln Pro Ser Leu Cys His Lys
 305 310 315 320
 Phe Ile Ala Leu Ser Asp Lys Glu Gly Lys Leu Leu Arg Asn Tyr Thr
 325 330 335
 Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Gln Val Ala Gly Ile Gln Arg Ile Leu

340	345	350
Gln Cys His Gly Ser Phe Ala Thr Ala Ser Cys Leu Ile Cys Lys Tyr 355 360 365		
Lys Val Asp Cys Glu Ala Val Arg Gly Asp Ile Phe Asn Gln Val Val 370 375 380		
Pro Arg Cys Pro Arg Cys Pro Ala Asp Glu Pro Leu Ala Ile Met Lys 385 390 395 400		
Pro Glu Ile Val Phe Phe Gly Glu Asn Leu Pro Glu Gln Phe His Arg 405 410 415		
Ala Met Lys Tyr Asp Lys Asp Glu Val Asp Leu Leu Ile Val Ile Gly 420 425 430		
Ser Ser Leu Lys Val Arg Pro Val Ala Leu Ile Pro Ser Ser Ile Pro 435 440 445		
His Glu Val Pro Gln Ile Leu Ile Asn Arg Glu Pro Leu Pro His Leu 450 455 460		
His Phe Asp Val Glu Leu Leu Gly Asp Cys Asp Val Ile Ile Asn Glu 465 470 475 480		
Leu Cys His Arg Leu Gly Gly Glu Tyr Ala Lys Leu Cys Cys Asn Pro 485 490 495		
Val Lys Leu Ser Glu Ile Thr Glu Lys Pro Pro Arg Pro Gln Lys Glu 500 505 510		
Leu Val His Leu Ser Glu Leu Pro Pro Thr Pro Leu His Ile Ser Glu 515 520 525		
Asp Ser Ser Ser Pro Glu Arg Thr Val Pro Gln Asp Ser Ser Val Ile 530 535 540		
Ala Thr Leu Val Asp Gln Ala Thr Asn Asn Asn Val Asn Asp Leu Glu 545 550 555 560		
Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Glu Lys Pro Gln Glu Val Gln Thr 565 570 575		
Ser Arg Asn Val Glu Asn Ile Asn Val Glu Asn Pro Asp Phe Lys Ala 580 585 590		

Val Gly Ser Ser Thr Ala Asp Lys Asn Glu Arg Thr Ser Val Ala Glu
595 600 605

Thr Val Arg Lys Cys Trp Pro Asn Arg Leu Ala Lys Glu Gln Ile Ser
610 615 620

Lys Arg Leu Glu Gly Asn Gln Tyr Leu Phe Val Pro Pro Asn Arg Tyr
625 630 635 640

Ile Phe His Gly Ala Glu Val Tyr Ser Asp Ser Glu Asp Asp Val Leu
645 650 655

Ser Ser Ser Ser Cys Gly Ser Asn Ser Asp Ser Gly Thr Cys Gln Ser
660 665 670

Pro Ser Leu Glu Glu Pro Leu Glu Asp Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe
675 680 685

Tyr Asn Gly Leu Glu Asp Asp Thr Glu Arg Pro Glu Cys Ala Gly Gly
690 695 700

Ser Gly Phe Gly Ala Asp Gly Gly Asp Gln Glu Val Val Asn Glu Ala
705 710 715 720

Ile Ala Thr Arg Gln Glu Leu Thr Asp Val Asn Tyr Pro Ser Asp Lys
725 730 735

Ser

<210> 3

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Leu Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Asp Ile Pro Pro Asp Ser
1 5 10 15

Ala Val Glu Leu Trp Lys Pro Gly Ala Gln Asp Ala Ser Ser Gln Ala
20 25 30

Gln Gly Gly Ser Ser Cys Ile Leu Arg Glu Glu Ala Arg Met Pro His
35 40 45

Ser Ala Gly Gly Thr Ala Gly Val Gly Leu Glu Ala Ala Glu Pro Thr
 50 55 60
 Ala Leu Leu Thr Arg Ala Glu Pro Pro Ser Glu Pro Thr Glu Ile Arg
 65 70 75 80
 Pro Gln Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys Met Leu Gly Asn Glu
 85 90 95
 Leu Cys Ser Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Asn Val
 100 105 110
 Leu Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Ile Lys
 115 120 125
 Gly Ala His Tyr Ile Cys His Ser Gly Gly His Cys Pro Met Asp Thr
 130 135 140
 Tyr Met Arg Arg Lys Cys Gln Glu Cys Arg Leu Arg Lys Cys Arg Gln
 145 150 155 160
 Ala Gly Met Arg Glu Glu Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Leu
 165 170 175
 Lys Lys Leu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Gln Ala His Ala Thr Ser Leu
 180 185 190
 Pro Pro Arg Arg Ser Ser Pro Pro Gln Ile Leu Pro Gln Leu Ser Pro
 195 200 205
 Glu Gln Leu Gly Met Ile Glu Lys Leu Val Ala Ala Gln Gln Gln Cys
 210 215 220
 Asn Arg Arg Ser Phe Ser Asp Arg Leu Arg Val Thr Pro Trp Pro Met
 225 230 235 240
 Ala Pro Asp Pro His Ser Arg Glu Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His
 245 250 255
 Phe Thr Glu Leu Ala Ile Val Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala
 260 265 270
 Lys Gln Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Arg Glu Asp Gln Ile Ala
 275 280 285
 Leu Leu Lys Thr Ser Ala Ile Glu Val Met Leu Leu Glu Thr Ser Arg

290 295 300

Arg Tyr Asn Pro Gly Ser Glu Ser Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Ser
 305 310 315 320

Tyr Asn Arg Glu Asp Phe Ala Lys Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile
 325 330 335

Asn Pro Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Asn Glu Leu Gln Leu Asn
 340 345 350

Asp Ala Glu Phe Ala Leu Leu Ile Ala Ile Ser Ile Phe Ser Ala Asp
 355 360 365

Arg Pro Asn Val Gln Asp Gln Leu Gln Val Glu Arg Leu Gln His Thr
 370 375 380

Tyr Val Glu Ala Leu His Ala Tyr Val Ser Ile His His Pro His Asp
 385 390 395 400

Arg Leu Met Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr
 405 410 415

Leu Ser Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp
 420 425 430

Lys Lys Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
 435 440 445

<210> 4

<211> 461

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ser Ser Pro Thr Thr Ser Ser Leu Asp Thr Pro Leu Pro Gly Asn
 1 5 10 15

Gly Pro Pro Gln Pro Gly Ala Pro Ser Ser Ser Pro Thr Val Lys Glu
 20 25 30

Glu Gly Pro Glu Pro Trp Pro Gly Gly Pro Asp Pro Asp Val Pro Gly
 35 40 45

Thr Asp Glu Ala Ser Ser Ala Cys Ser Thr Asp Trp Val Ile Pro Asp
 50 55 60

Pro Glu Glu Glu Pro Glu Arg Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys
 65 70 75 80
 Met Leu Gly His Glu Leu Cys Arg Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly
 85 90 95
 Phe His Tyr Asn Val Leu Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg
 100 105 110
 Arg Ser Val Val Arg Gly Gly Ala Arg Arg Tyr Ala Cys Arg Gly Gly
 115 120 125
 Gly Thr Cys Gln Met Asp Ala Phe Met Arg Arg Lys Cys Gln Gln Cys
 130 135 140
 Arg Leu Arg Lys Cys Lys Glu Ala Gly Met Arg Glu Gln Cys Val Leu
 145 150 155 160
 Ser Glu Glu Gln Ile Arg Lys Lys Lys Ile Arg Lys Gln Gln Gln
 165 170 175
 Glu Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Pro Val Gly Pro Gln Gly Ser Ser
 180 185 190
 Ser Ser Ala Ser Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Gly Ser Glu Ala Gly
 195 200 205
 Ser Gln Gly Ser Gly Glu Gly Glu Gly Val Gln Leu Thr Ala Ala Gln
 210 215 220
 Glu Leu Met Ile Gln Gln Leu Val Ala Ala Gln Leu Gln Cys Asn Lys
 225 230 235 240
 Arg Ser Phe Ser Asp Gln Pro Lys Val Thr Pro Trp Pro Leu Gly Ala
 245 250 255
 Asp Pro Gln Ser Arg Asp Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His Phe Thr
 260 265 270
 Glu Leu Ala Ile Ile Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala Lys Gln
 275 280 285
 Val Pro Gly Phe Leu Gln Leu Gly Arg Glu Asp Gln Ile Ala Leu Leu
 290 295 300

Lys Ala Ser Thr Ile Glu Ile Met Leu Leu Glu Thr Ala Arg Arg Tyr
305 310 315 320

Asn His Glu Thr Glu Cys Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Thr Tyr Ser
325 330 335

Lys Asp Asp Phe His Arg Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn Pro
340 345 350

Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Asp Asp Ala
355 360 365

Glu Tyr Ala Leu Leu Ile Ala Ile Asn Ile Phe Ser Ala Asp Arg Pro
370 375 380

Asn Val Gln Glu Pro Gly Arg Val Glu Ala Leu Gln Gln Pro Tyr Val
385 390 395 400

Glu Ala Leu Leu Ser Tyr Thr Arg Ile Lys Arg Pro Gln Asp Gln Leu
405 410 415

Arg Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu Ser
420 425 430

Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys Lys
435 440 445

Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
450 455 460

<210> 5

<211> 445

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 5

Met Ser Leu Trp Leu Glu Ala Ser Met Pro Asp Val Ser Pro Asp Ser
1 5 10 15

Ala Thr Glu Leu Trp Lys Thr Glu Pro Gln Asp Ala Gly Asp Gln Gly
20 25 30

Gly Asn Thr Cys Ile Leu Arg Glu Glu Ala Arg Met Pro Gln Ser Thr
35 40 45

Gly Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Glu Ser Ala Glu Pro Thr Ala Leu
50 55 60

Leu Pro Arg Ala Glu Thr Leu Pro Glu Pro Thr Glu Leu Arg Pro Gln
 65 70 75 80
 Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys Met Leu Gly Asn Glu Leu Cys
 85 90 95
 Ser Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Asn Val Leu Ser
 100 105 110
 Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Ile Lys Gly Ala
 115 120 125
 Arg Tyr Val Cys His Ser Gly Gly His Cys Pro Met Asp Thr Tyr Met
 130 135 140
 Arg Arg Lys Cys Gln Glu Cys Arg Leu Arg Lys Cys Arg Gln Ala Gly
 145 150 155 160
 Met Arg Glu Glu Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Leu Lys Lys
 165 170 175
 Leu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Gln Ala Gln Ala Thr Ser Val Ser Pro
 180 185 190
 Arg Val Ser Ser Pro Pro Gln Val Leu Pro Gln Leu Ser Pro Glu Gln
 195 200 205
 Leu Gly Met Ile Glu Lys Leu Val Ala Ala Gln Gln Gln Cys Asn Arg
 210 215 220
 Arg Ser Phe Ser Asp Arg Leu Arg Val Thr Pro Trp Pro Ile Ala Pro
 225 230 235 240
 Asp Pro Gln Ser Arg Glu Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His Phe Thr
 245 250 255
 Glu Leu Ala Ile Val Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala Lys Gln
 260 265 270
 Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Arg Glu Asp Gln Ile Ala Leu Leu
 275 280 285
 Lys Thr Ser Ala Ile Glu Val Met Leu Leu Glu Thr Ser Arg Arg Tyr
 290 295 300

Asn Pro Gly Ser Glu Ser Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Ser Tyr Asn
 305 310 315 320

Arg Glu Asp Phe Ala Lys Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn Pro
 325 330 335

Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Asn Glu Leu Gln Leu Asn Asp Ala
 340 345 350

Glu Phe Ala Leu Leu Ile Ala Ile Ser Ile Phe Ser Ala Asp Arg Pro
 355 360 365

Asn Val Gln Asp Gln Leu Gln Val Glu Arg Leu Gln His Thr Tyr Val
 370 375 380

Glu Ala Leu His Ala Tyr Val Ser Ile Asn His Pro His Asp Arg Leu
 385 390 395 400

Met Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu Ser
 405 410 415

Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys Lys
 420 425 430

Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
 435 440 445

<210> 6

<211> 446

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 6

Met Ser Ser Pro Thr Ser Ser Leu Asp Thr Pro Val Pro Gly Asn Gly
 1 5 10 15

Ser Pro Gln Pro Ser Thr Ser Ala Thr Ser Pro Thr Ile Lys Glu Glu
 20 25 30

Gly Gln Glu Thr Asp Pro Pro Pro Gly Ser Glu Gly Ser Ser Ser Ala
 35 40 45

Tyr Ile Val Val Ile Leu Glu Pro Glu Asp Glu Pro Glu Arg Lys Arg
 50 55 60

Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys Met Leu Gly His Glu Leu Cys Arg Val

65 70 75 80

Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Asn Val Leu Ser Cys Glu
85 90 95

Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Val His Gly Gly Ala Gly
100 105 110

Arg Tyr Ala Cys Arg Gly Ser Gly Thr Cys Gln Met Asp Ala Phe Met
115 120 125

Arg Arg Lys Cys Gln Leu Cys Arg Leu Arg Lys Cys Lys Glu Ala Gly
130 135 140

Met Arg Glu Gln Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Lys Lys Arg
145 150 155 160

Ile Gln Lys Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Pro Ser Glu Pro Ala
165 170 175

Ala Ser Ser Ser Gly Arg Pro Ala Ala Ser Pro Gly Thr Ser Glu Ala
180 185 190

Ser Ser Gln Gly Ser Gly Glu Gly Glu Gly Ile Gln Leu Thr Ala Ala
195 200 205

Gln Glu Leu Met Ile Gln Gln Leu Val Ala Ala Gln Leu Gln Cys Asn
210 215 220

Lys Arg Ser Phe Ser Asp Gln Pro Lys Val Thr Pro Trp Pro Leu Gly
225 230 235 240

Ala Asp Pro Gln Ser Arg Asp Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His Phe
245 250 255

Thr Glu Leu Ala Ile Ile Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala Lys
260 265 270

Gln Val Pro Gly Phe Leu Gln Leu Gly Arg Glu Asp Gln Ile Ala Leu
275 280 285

Leu Lys Ala Ser Thr Ile Glu Ile Met Leu Leu Glu Thr Ala Arg Arg
290 295 300

Tyr Asn His Glu Thr Glu Cys Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Thr Tyr
305 310 315 320

Ser Lys Asp Asp Phe His Arg Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn
 325 330 335

Pro Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Asp Asp
 340 345 350

Ala Glu Tyr Ala Leu Leu Ile Ala Ile Asn Ile Phe Ser Ala Asp Arg
 355 360 365

Pro Asn Val Gln Glu Pro Ser Arg Val Glu Ala Leu Gln Gln Pro Tyr
 370 375 380

Val Glu Ala Leu Leu Ser Tyr Thr Arg Ile Lys Arg Pro Gln Asp Gln
 385 390 395 400

Leu Arg Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu
 405 410 415

Ser Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys
 420 425 430

Lys Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
 435 440 445

<210> 7

<211> 4107

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

gtcgagcggg agcagaggag gcgagggagg agggccagag aggcagttgg aagatggcgg 60
 acgagggcggc cctcgccctt cagccccggc gctccccctc ggcggcgggg gccgacaggg 120
 aggccgcgtc gtcccccgcc ggggagccgc tccgcaagag gccgaggaga gatggtcccc 180
 gcctcgagcg gagccccggc gagccccggtg gggcggcccc agagcgtgag gtgccggcgg 240
 cggccagggg ctgccccggg gcggcggcgg cggcgtgtg gcgggaggcg gaggcagagg 300
 cggcggcggc aggcggggag caagaggccc aggcgactgc ggcggctggg gaaggagaca 360
 atgggccggg cctgcagggc ccatctcggg agccaccgct ggccgacaac ttgtacgacg 420
 aagacgacga cgacgagggc gaggaggagg aagagggcggc ggcggcggcg attgggtacc 480
 gagataacct tctgttcggg gatgaaatta tcactaattg ttttcattcc tgtgaaagtg 540
 atgaggagga tagagcctca catgcaagct ctagtgactg gactccaagg ccacggatag 600
 gtccatatac tttgttcag cacatctta tgattggcac agatcctcga acaattctta 660

aagatttatt	gccggaaca	atacctccac	ctgagttgga	tgatatgaca	ctgtggcaga	720
ttgttattaa	tatcctttca	gaaccaccaa	aaaggaaaaa	aagaaaagat	attaatacaa	780
ttgaagatgc	tgtgaaatta	ctgcaagagt	gcaaaaaaat	tatagttcta	actggagctg	840
gggtgtctgt	ttcatgtgga	atacctgact	tcaggccaag	ggatgggtatt	tatgctcgcc	900
ttgctgtaga	cttcccagat	cttccagatc	ctcaagcgat	gtttgatatt	gaatatttca	960
gaaaagatcc	aagaccattc	ttcaagtttg	caaaggaaat	atatacctgga	caattccagc	1020
catctctctg	tcacaaatc	atagccttgt	cagataagga	aggaaaacta	cttcgcaact	1080
ataccagaa	catagacacg	ctggaacagg	ttgcgggaat	ccaaaggata	attcagtgtc	1140
atggttctct	tgcaacagca	tcttgccctga	tttgtaaata	caaagttgac	tgtgaagctg	1200
tacgaggaga	tatttttaat	caggtagtgc	ctcagtgccc	taggtgcca	gctgatgaac	1260
cgcttgctat	catgaaacca	gagattgtgt	tttttggga	aaatttacca	gaacagtttc	1320
atagagccat	gaagtatgac	aaagatgaag	ttgacctct	cattgttatt	gggtcttccc	1380
tcaaagtaag	accagtagca	ctaattccaa	gttccatacc	ccatgaagtg	cctcagatat	1440
taattaatag	agaaccttg	cctcatctgc	atcttgatgt	agagcttctt	ggagactgtg	1500
atgtcataat	taatgaattg	tgtcataggt	taggtgggga	atatgccaaa	ctttgctgta	1560
accctgtaa	gctttcagaa	attactgaaa	aacctccacg	aacacaaaaa	gaattggctt	1620
atgtgtcaga	gttgccaccc	acacctcttc	atgtttcaga	agactcaagt	tcaccagaaa	1680
gaacttcacc	accagattct	tcagtgattg	tcacactttt	agaccaagca	gctaagagta	1740
atgatgattt	agatgtgtct	gaatcaaaag	gttgatgga	agaaaaacca	caggaagtac	1800
aaacttctag	gaatgttgaa	agtattgctg	aacagatgga	aaatccggat	ttgagaatg	1860
ttggttctag	tactggggag	aaaaatgaaa	gaacttcagt	ggctggaaca	gtgagaaaat	1920
gctggcctaa	tagagtggca	aaggagcaga	ttagtggcg	gcttgatggt	aatcagtatc	1980
tgtttttgc	accaaactgt	tacattttcc	atggcgctga	ggtatattca	gactctgaag	2040
atgacgtctt	atcctctagt	tcttggtgca	gtaacagtga	tagtgggaca	tgccagagtc	2100
caagtttaga	agaacctatg	gaggatgaaa	gtgaaattga	agaattctac	aatggcttag	2160
aagatgagcc	tgatgttcca	gagagagctg	gaggagctgg	atgtgggact	gatggagatg	2220
atcaagaggc	aattaatgaa	gctatatctg	tgaacagga	agtaacagac	atgaactatc	2280
catcaaaaa	atcatagtgt	aataattgtg	caggtacagg	aattgttcca	ccagcattag	2340
gaactttagc	atgtcaaaat	gaatgtttac	ttgtgaactc	gatagagcaa	ggaaaccaga	2400
aaggtgtaat	atctataggt	tggtaaaata	gattgttttt	catggataat	ttttaacttc	2460

```

attatttctg tacttgtaca aactcaacac taactttttt ttttttaaaa aaaaaaaggt 2520
actaagtate ttcaatcagc tgttgggtaa gactaacttt ctttttaagg ttcatttgtgta 2580
tgataaatte atatgtgtat atataatfff ttttgttttg tctagttagt ttcaacattt 2640
ttaagtttt caaaaagcca tcggaatggt aaattaatgt aaagggacag ctaatctaga 2700
ccaagaatg gtattttcac ttttctttgt aacattgaat ggtttgaagt actcaaaatc 2760
tgttacgcta aacttttgat tctttaacac aattattttt aaacactggc attttccaaa 2820
actgtggcag ctaacttttt aaaatctcaa atgacatgca gtgtgagtag aaggaagtca 2880
acaatatgtg gggagagcac tcggttgtct ttacttttaa aagtaatact tgggtgctaag 2940
aatttcagga ttattgtatt tacgttcaaa tgaagatggc ttttgtactt cctgtggaca 3000
tgtagtaatg tctatattgg ctcataaaac taacctgaaa aacaataaa tgctttggaa 3060
atgtttcagt tgctttagaa acattagtgc ctgcctggat ccccttagtt ttgaaatatt 3120
tgccattggt gtttaaacac ctatcactgt ggtagagctt gcattgatct tttccacaag 3180
tattaaactg ccaaaaatgtg aatatgcaaa gcctttctga atctataata atggtaactc 3240
tactggggag agtghtaatat tttggactgc tgttttccat taatgaggag agcaacaggc 3300
ccctgattat acagttccaa agtaataaga tgtaattgt aattcagcca gaaagtacat 3360
gtctcccatt gggaggattt ggtgttaaat accaaactgc tagccctagt attatggaga 3420
tgaacatgat gatghtaactt gtaatagcag aatagttaat gaatgaaact agttcttata 3480
atztatcttt atttaaaagc ttagcctgcc ttaaaaactag agatcaactt tctcagctgc 3540
aaaagcttct agtctttcaa gaagttcata ctttatgaaa ttgcacagta agcatttatt 3600
tttcagacca tttttgaaca tcactcctaa attaataaag tattcctctg ttgctttagt 3660
atztatcaca ataaaaaggg tttgaaatat agctgttctt tatgcataaa acaccagct 3720
aggaccatta ctgccagaga aaaaaatcgt attgaaatggc catttcccta cttataagat 3780
gtctcaatct gaatttattt ggctacacta aagaatgcag tatatttagt tttccatttg 3840
catgatgttt gtgtgctata gatgatattt taaattgaaa agtttgtttt aaattatfff 3900
tacagtgaag actgttttca gctcttttta tattgtacat agtcttttat gtaatttact 3960
ggcatatggt ttgtagactg tttaatgact ggatatcttc cttcaacttt tgaaatacaa 4020
aaccagtgtt ttttacttgt acactgtttt aaagtctatt aaaattgtca tttgactttt 4080
ttctgttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 4107

```

<210> 8

<211> 3849

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 8

gcggagcaga	ggaggcgagg	gcggagggcc	agagaggcag	ttggaagatg	gcggacgagg	60
tggcgctcgc	ccttcaggcc	gccggctccc	cttccgcggc	ggccgccatg	gaggcccgct	120
cgagccggc	ggacgagccg	ctccgcaaga	ggccccgccg	agacgggcct	ggcctcgggc	180
gcagcccggg	cgagccgagc	gcagcagtgg	cgccggcggc	cgcggggtgt	gaggcggcga	240
gcgcccgggc	cccggcgggc	ctgtggcggg	aggcggcagg	ggcgggcgcg	agcgcggagc	300
gggaggcccc	ggcgacggcc	gtggccgggg	acggagacaa	tgggtccggc	ctgcggcggg	360
agccgagggc	ggctgacgac	ttcgacgacg	acgagggcga	ggaggaggac	gaggcggcgg	420
cggcagcggc	ggcggcagcg	atcggtacc	gagacaacct	cctgttgacc	gatggactcc	480
tcactaatgg	ctttcattcc	tgtgaaagtg	atgacgatga	cagaacctca	cacgccagct	540
ctagtgactg	gactccgcg	ccgcggatag	gtccatatac	ttttgttcag	caacatctca	600
tgattggcac	cgatcctcga	acaattctta	aagatttatt	accagaaaca	attcctccac	660
ctgagctgga	tgatatgacg	ctgtggcaga	ttgttattaa	tatcctttca	gaaccaccaa	720
agcgaaaaaa	aagaaaagat	atcaatacaa	ttgaagatgc	tgtgaagtta	ctgcaggagt	780
gtaaaaagat	aatagttctg	actggagctg	gggtttctgt	ctcctgtggg	attcctgact	840
tcagatcaag	agacggtatc	tatgctcgcc	ttgcggtgga	cttcccagac	ctcccagacc	900
ctcaagccat	gtttgatatt	gagtatttta	gaaaagacc	aagaccattc	ttcaagtttg	960
caaaggaaat	atatcccgga	cagttccagc	cgtctctgtg	tcacaaatc	atagctttgt	1020
cagataagga	aggaaaacta	cttcgaaatt	atactcaaaa	tatagatacc	ttggagcagg	1080
ttgcaggaat	caaaggatc	cttcagtgtc	atggttcctt	tgcaacagca	tcttgccctga	1140
tttgtaaata	caaagttgat	tgtgaagctg	ttcggtgaga	catttttaat	caggtagttc	1200
ctcggtgccc	taggtgccc	gctgatgagc	cacttgccat	catgaagcca	gagattgtct	1260
tctttggtga	aaacttacca	gaacagtttc	atagagccat	gaagtatgac	aaagatgaag	1320
ttgacctcct	cattgttatt	ggatcttctc	tgaaagtgag	accagtagca	ctaattccaa	1380
gttctatacc	ccatgaagtg	cctcaaatat	taataaatag	ggaacctttg	cctcatctac	1440
atthtgatgt	agagctcctt	ggagactgcg	atgttataat	taatgagttg	tgtcataggc	1500
taggtggtga	atatgccaaa	ctttgttgta	accctgtaaa	gctttcagaa	attactgaaa	1560
aacctccacg	cccacaaaag	gaattgggtc	atthtaccaga	gttgccacca	acacctcttc	1620
atatttcgga	agactcaagt	tcacctgaaa	gaactgtacc	acaagactct	tctgtgattg	1680
ctacacttgt	agaccaagca	acaaacaaca	atgttaatga	tttagaagta	tctgaatcaa	1740
gttgtgtgga	agaaaaacca	caagaagtac	agactagtag	gaatgttgag	aacattaatg	1800

tggaaaatcc	agattttaag	gctgttggtt	ccagtactgc	agacaaaaat	gaaagaactt	1860
cagttgcaga	aacagtgaga	aaatgctggc	ctaatagact	tgcaaaggag	cagattagta	1920
agcggcttga	gggtaatcaa	tacctgtttg	taccaccaa	tcgttacata	ttccacggtg	1980
ctgaggtata	ctcagactct	gaagatgacg	tcttgcctc	tagttcctgt	ggcagtaaca	2040
gtgacagtgg	cacatgccag	agtccaagtt	tagaagaacc	cttggaagat	gaaagtgaaa	2100
ttgagaatt	ctacaatggc	ttggaagatg	atacggagag	gccccaatgt	gctggaggat	2160
ctggatttgg	agctgatgga	gggatcaag	aggttgtaa	tgaagctata	gctacaagac	2220
aggaattgac	agatgtaaac	tatccatcag	acaaatcata	acactattga	agctgtccgg	2280
attcaggaat	tgctccacca	gcattgggaa	ctttagcatg	tcaaaaaat	gaatgtttac	2340
ttgtgaactt	gaacaaggaa	atctgaaaga	tgtattattt	atagactgga	aaatagattg	2400
tcttcttga	taatttctaa	agttccatca	tttctgtttg	tacttgtaca	ttcaacactg	2460
ttggttgact	tcactcttct	ttcaaggttc	atltgtatga	tacattcgta	tgtatgtata	2520
atlttgtttt	ttgectaatg	agtttcaacc	ttttaaagtt	ttcaaaagcc	attggaatgt	2580
taatgtaaag	ggaacagctt	atctagacca	aagaatggta	tttcacactt	ttttgtttgt	2640
aacattgaat	agtttaaagc	cctcaatttc	tgttctgctg	aacttttatt	tttaggacag	2700
ttaactttt	aaacactggc	atlttccaaa	acttgtggca	gctaaacttt	taaaatcaca	2760
gatgacttgt	aatgtgagga	gtcagcaccg	tgtctggagc	actcaaaact	tgggctcagt	2820
gtgtgaagcg	tacttactgc	atcgtttttg	tacttgcctc	agacgtggta	atgtccaaac	2880
aggcccctga	gactaatctg	ataaatgatt	tggaaatgtg	tttcagttgt	tctagaaaca	2940
atagtgcctg	tctatatagg	tccccttagt	ttgaatattt	gccattgttt	aattaaatac	3000
ctatcactgt	ggtagagcct	gcatagatct	tcaccacaaa	tactgccaaag	atgtgaatat	3060
gcaaagcctt	tctgaatcta	ataatggtac	ttctactggg	gagagtgtaa	tatltttggac	3120
tgctgttttt	ccattaatga	ggaaagcaat	aggectctta	attaaagtcc	caaagtcata	3180
agataaattg	tagctcaacc	agaaagtaca	ctgttgcctg	ttgaggattt	ggtgtaatgt	3240
atcccaaggt	gtagccttg	tattatggag	atgaatacag	atccaatagt	caaatgaaac	3300
tagttcttag	ttatlttaaaa	gcttagcttg	ccttaaaaact	agggatcaat	tttctcaact	3360
gcagaaactt	ttagcctttc	aaacagttca	cacctcagaa	agtcagtatt	tatltttacag	3420
acttcttttg	aacattgccc	ccaaatltta	atattcatgt	gggttttagta	ttattataca	3480
aaaaatgatt	tgaaatatag	ctgttcttta	tgcataaaat	accagtttag	gaccattact	3540
gccagaggag	aaaagtatta	agtagctcat	ttcccctacct	aaaagataac	tgaatlttatt	3600

tggctacact aaagaatgca gtatatattag ttttccattt gcatgatgtg tttgtgctat 3660
 agacaatatt ttaaattgaa aaatttgttt taaattattt ttacagtga gactgttttc 3720
 agctcttttt atattgtaca tagactttta tgtaatctgg catatgtttt gtagaccgtt 3780
 taatgactgg attatcttcc tccaactttt gaaatacaaa aacagtgttt tatactaaaa 3840
 aaaaaaaaaa 3849

<210> 9

<211> 1528

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

cagtgccttg gtaatgacca gggctccaga aagagatgtc cttgtggctg gggggcccctg 60
 tgccctgacat tcctcctgac tctgcgggtg agctgtggaa gccaggcgca caggatgcaa 120
 gcagccaggc ccagggaggc agcagctgca tcctcagaga ggaagccagg atgccccact 180
 ctgctggggg tactgcaggg gtggggctgg aggetgcaga gcccacagcc ctgctcacca 240
 gggcagagcc cccttcagaa cccacagaga tccgtccaca aaagcggaaa aaggggccag 300
 cccccaaaat gctggggaac gagctatgca gcgtgtgtgg ggacaaggcc tcgggcttcc 360
 actacaatgt tctgagctgc gagggctgca agggattctt ccgcccagc gtcatcaagg 420
 gagcgcacta catctgccac agtggcggcc actgccccat ggacacctac atgcgtcgca 480
 agtgccagga gtgtcggtt cgcaaatgcc gtcaggctgg catgcgggag gagtgtgtcc 540
 tgtcagaaga acagatccgc ctgaagaaac tgaagcggca agaggaggaa caggctcatg 600
 ccacatcctt gccccccagg cgttcctcac cccccaaaat cctgccccag ctcagccccg 660
 aacaactggg catgategag aagctcgtcg ctgcccagca acagtgtaac cggcgtcct 720
 tttctgaccg gcttcgagtc acgccttggc ccatggcacc agatccccat agccgggagg 780
 cccgtcagca gcgctttgcc cacttcactg agctggccat cgtctctgtg caggagatag 840
 ttgactttgc taaacagcta cccggcttcc tgcagctcag ccgggaggac cagattgccc 900
 tgctgaagac ctctcgatc gaggtgatgc ttctggagac atctcggagg tacaaccctg 960
 ggagtgagag tatcaccttc ctcaaggatt tcagttataa ccgggaagac tttgccaaag 1020
 cagggctgca agtggaaatc atcaacccca tcttcgagtt ctccagggcc atgaatgagc 1080
 tgcaactcaa tgatgccgag tttgccttgc tcattgctat cagcatcttc tctgcagacc 1140
 ggcccaacgt gcaggaccag ctccagggtg agaggctgca gcacacatat gtggaagccc 1200
 tgcattgccta cgtctccatc caccatcccc atgaccgact gatgttccca cggatgctaa 1260
 tgaaactggg gagcctccgg accctgagca gcgtccaetc agagcaagtg tttgcaactgc 1320

gtctgcagga caaaaagctc ccaccgctgc tctctgagat ctgggatgtg cacgaatgac 1380
 tgttctgtcc ccataatttc tgttttcttg gccggatggc tgaggcctgg tggctgectc 1440
 ctagaagtgg aacagactga gaagggcaaa cattcctggg agctgggcaa ggagatcctc 1500
 ccgtggcatt aaaagagagt caaagggt 1528

<210> 10

<211> 2037

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

ctcttccgga cgtgacgcaa gggcgggggt gccggaagaa gtggcgaagt tacttttgag 60
 ggtatttgag tagcggcggg gtgtcagggg ctaaagagga ggacgaagaa aagcagagca 120
 agggaaccga gggaacagg agtagttcac tccgcgagag gccgtccacg agacccccgc 180
 gcgcagccat gagccccgcc ccccgtgtt gcttgagagag gggcgggacc tggagagagg 240
 ctgctcctg accccaccat gtcctctct accacgagtt ccctggatac ccccctgect 300
 ggaaatggcc cccctcagcc tggcggccct tcttcttcac ccactgtaa ggaggagggt 360
 ccggagccgt ggccggggg tccggaccct gatgtcccag gactgatga ggccagctca 420
 gcctgcagca cagactgggt catcccagat cccgaagagg aaccagagcg caagcgaag 480
 aagggccag cccgaagat gctgggccac gagctttgcc gtgtctgtgg ggacaaggcc 540
 tccggttcc actacaacgt gctcagctgc gaaggctgca agggcttctt ccggcgcagt 600
 gtggtccgtg gtggggccag gcgctatgcc tggcgggtg gcggaacctg ccagatggac 660
 gctttcatgc ggcgcaagt ccagcagtgc cggctgcgca agtgcaagga ggcagggatg 720
 agggagcagt gcgtccttcc tgaagaacag atccggaaga agaagattcg gaaacaacag 780
 cagcaggagt cacagtcaca gtcgcagtca cctgtggggc cgcagggcag cagcagctca 840
 gcctctgggc ctggggcttc ccctggtgga tctgaggeag gcagccaggg ctccggggaa 900
 ggcgaggggt tccagctaac agcggctcaa gaactaatga tccagcagtt ggtggcggcc 960
 caactgcagt gcaacaaacg ctcttcttcc gaccagccca aagtacgccc ctggcccctg 1020
 ggcgcagacc cccagtcccg agatgcccgc cagcaacgct ttgcccactt cacggagctg 1080
 gccatcatct cagtccagga gatcgtggac ttcgctaagc aagtgcctgg tttcctgcag 1140
 ctgggccggg aggaccagat cgcctcctg aaggcatcca ctatcgagat catgctgcta 1200
 gagacagcca ggcgctacaa ccacgagaca gagtgtatca ctttcttgaa ggaactcacc 1260
 tacagcaagg acgacttcca ccgtgcaggc ctgcaggtgg agttcatcaa ccccatcttc 1320
 gagttctcgc gggccatgcg gcggctgggc ctggacgacg ctgagtaacg cctgctcacc 1380

gccatcaaca tcttctcggc cgaccggccc aacgtgcagg agccgggccc cgtggaggcg 1440
 ttgcagcagc cctacgtgga ggcgctgctg tectacacgc gcatcaagag gccgcaggac 1500
 cagctgcgct tcccgcgcat gctcatgaag ctggtgagcc tgcgcacgct gagctctgtg 1560
 cactcggagc aggtcttcgc cttgcggtc caggacaaga agctgcccgc tetgctgtcg 1620
 gagatctggg acgtccacga gtgaggggct ggccaccag cccacagcc ttgcctgacc 1680
 accctccagc agatagacgc cggcaccctc tcctcttcct aggttggaaag gggccctggg 1740
 ccgagcctgt agacctatcg gctctcatcc cttgggataa gcccagtc aggtccagga 1800
 ggctccctcc ctgcccagcg agtcttcag aaggggtgaa aggttgcag gtcccacca 1860
 ctgacccttc ccggctgccc tccctcccca gcttacacct caagcccagc acgcagtgca 1920
 ccttgaacag agggagggga ggaccatgg ctctccccc tagcccggga gaccaggggc 1980
 ctctctcttc ctctgctttt atttaataaa aactaaaaac agaaaaaaaa aaaaaaa 2037

<210> 11

<211> 1753

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 11

gggaacgctg actctggagg ctgctgggat taggggggg gtgactgaga agcagtcctt 60
 ctgtcagagc aaagagcctc cagggtgagg agaggaagga gagagatgga actagaccgg 120
 tctgcgggga aacgcgacag ttttggtaga gggacagtgt cttggtaatg tccagggctc 180
 caggaagaga tgtccttgtg gctggaggcc tcaatgcctg atgtttctcc tgattctgca 240
 acggagtgtg ggaagacaga acctcaagat gcaggagacc agggaggcaa cacttgcac 300
 ctgagggagg aagccaggat gccccagtca actgggggtg cttagggat agggttggag 360
 tcagcagagc ctacagccct gctccccagg gcagagacc tcccagagcc gacagagctt 420
 cgtccacaaa agcggaaaaa gggcccagcc cccaaaatgc tggggaacga gctgtgcagt 480
 gtctgtgggg acaaagcctc tggcttccat tacaacgtgc tgagctgcga gggctgcaag 540
 ggattcttcc gccgcagtgt catcaagga gacgctatg tctgccacag cggtgggccac 600
 tgcccatgg acacctacat gcggcggaaa tgccaggagt gtcgacttcg caaatgccgc 660
 caggcaggca tgagggagga gtgtgtgctg tcagaagaac agatccgctt gaagaaactg 720
 aagcggcaag aagaggaaca ggctcaagcc acttcggtgt cccaagggt gtcctcacct 780
 cctcaagtcc tgccacagct cagcccagag cagctgggca tgatcgagaa gctggtggt 840
 gccagcaac agtgtaacag gcgctccttc tcagaccgcc tgccgctcac gccttggcc 900
 attgcacccg accctcagag ccgggaagcc cgacaacagc gctttgccc ctttactgag 960

ctggccatcg tgtccgtgca ggagattggt gactttgcca aacagctccc tggcttccta 1020
 cagctcagca gggaggacca gatcgccttg ctgaagacct ctgcaatcga ggtcatgctt 1080
 ctggagacgt cacggaggta caaccccggc agtgagagca tcaccttctt caaggacttc 1140
 agttacaacc ggaagactt tgccaaagca gggtgcagg tggagtcat caaccccatc 1200
 tttgagttct ccagagccat gaatgagctg caactcaatg atgctgagtt tgetctgctc 1260
 attgccatca gcatcttctc tgcagaccgg cccaacgtgc aggaccagct ccaagtagag 1320
 aggctgcaac acacatatgt ggaggccttg cacgcctacg tctccatcaa ccacccccac 1380
 gaccgactga tgttcccacg gatgctaata aagctgggtga gcctccgtac tttgagcagc 1440
 gtccattcag agcaagtgtt tgcccttcgc ctgcaggaca aaaagcttcc ccctctgctg 1500
 tctgagatct gggatgtcca cgagtgactg tttcaccgtg tcctttgtgt tggccacatg 1560
 gcgaaggctc actgactgct tcccacgggt ggagcagact gagaagggca gacattcctg 1620
 ggagctgggt gaaggagaga gccttgcgta gcattaaggg agagtcaaca ggttgggtgt 1680
 tttctggctg ctgggcagtt gggatctact aacgttgtat accatctgaa gaccttgttg 1740
 acccaaccaa ata 1753

<210> 12

<211> 1964

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 12

ggcgaagtta cttttgcttt tcgctcagca agcgtgttg ettcgagcta ctcccaggt 60
 tctgaagtta cttccaaagt gctgtggagg cacaatcacc ggtgcggaca cagaggcaac 120
 tctcgcctcc cacggcgtt tccagggcaa cagagtcgga gacccccctgc gacccccctc 180
 ccgategccg gtgcagtcac gagccccgcc tccccctggt gcacggagag gggcggggcc 240
 tggaaacaagc aggctgcttc gtgaccact atgtcttccc ccacaagttc tctggacact 300
 cccgtgcctg ggaatggctc tctcagccc agtacctccg ccacgtcacc cactattaag 360
 gaagaggggc aggagactga tctcctcca ggctctgaag ggtccagctc tgcctacatc 420
 gtggtcatct tagagccaga ggatgagcct gagcgcaagc ggaagaagg gccggccccg 480
 aagatgctgg gccatgagct gtgccgcgtg tgcggagaca aggcctcggg ctccactac 540
 aacgtgctca gctgtgaagg ctgcaaagc ttcttccggc gcagtgtggt ccacgggtgg 600
 gccgggcgct atgcctgtcg gggcagcggc acctgccaga tggatgcctt catgcggcgc 660
 aagtgccagc tctgccggtc gcgcaagtgc aaggagctg gcattgcggga gcagtgcgtg 720
 ctctctgagg agcagattcg gaagaaaagg attcagaagc agcaacagca gcagccacca 780

ccccatctg agccagcagc cagcagctca ggccggccag cggcctcccc tggcacttcg 840
 gaagcaagca gccagggctc cggggaagga gaggggatcc agctgaccgc ggctcaggag 900
 ctgatgatcc agcagttagt tgccgcgcag ctgcagtgc acaaacgac tttctccgac 960
 cagcccaaag tcacgccttg gcccttgggt gcagaccctc agtcccgaga tgcccgtcag 1020
 caacgctttg cccacttcac cgagctagcc atcatctcgg tccaggagat tgtggaettt 1080
 gccaaagcag tgccaggggt cttgcagttg ggccgggagg accagatcgc cctcctgaag 1140
 gcgtccacca ttgagatcat gttgctagaa acagccagac gctacaacca cgagacagaa 1200
 tgcacacagt tcctgaagga cttcacctac agcaaggacg acttccaccg tgcaagcttg 1260
 caggtggaat tcatcaatcc catcttcgag ttctcgcggg ccatgcggcg gctgggcttg 1320
 gacgatgcag agtatgcctt gcttatcgcc atcaacatct tctcagccga tcggcctaata 1380
 gtgcaggagc ccagccgtgt ggaggccctg cagcagccat acgtggaggc gctcctctcc 1440
 tacacgagga tcaagcgcac acaggaccag ctccgcttcc cagcatgct catgaagctg 1500
 gtgagcctgc gcaccctcag ctccgtgcac tcggagcagg tctttgcatt gcgactccag 1560
 gacaagaagc tgccgcccctt gctgtccgag atctgggatg tgcaagagta ggggcagcca 1620
 caagtgcacc agccttgggt gtgtcttctt gaagatggac tcttcaacctc tcctcctggg 1680
 gtgggaggac attgtcaccg cccagtccct cgggctcagc ctcaaaactca gcggcagttg 1740
 gcaactagaag gcccaccccc acccattgag tcttccaaga gtggtgaggg tcacaggctc 1800
 tagcctctga ccgttcccag ctgccctccc acccagcctt acacctcagc ctaccacacc 1860
 atgcaccttg agtggagaga ggttagggca ggtggccccc cacagttggg agaccacag 1920
 ccctctcttc tgcccctttt atttaataaaa aaaacaaaaa taaa 1964

<210> 13

<211> 25

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 13

gctttctgct gagtgactga actac 25

10 <210> 14

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador de PCR

<400> 14

gaattactgc ttttgccgc 21

<210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 15
 gcagcccaac tcttcagaac 20
 <210> 16
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 15 <400> 16
 tccccttgt ctttggac 20
 <210> 17
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 17
 gcttctgct gagtgactga actac 25
 25 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador de PCR
 <400> 18
 tgcgtctctt tctcctaccc 20
 <210> 19
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 19

aggcaggtgg atcatttgag 20

5 <210> 20

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cebador de PCR

<400> 20

ccaacatct gggcttctgt 20

15

REIVINDICACIONES

- 1.- Un complejo aislado que comprende una proteína SIRT1 de mamífero y una proteína LXR de mamífero.
- 2.- El complejo descrito en la reivindicación 1 que además comprende un elemento de respuesta de LXR.
- 5 3.- Un método para formar un complejo que comprende una proteína SIRT1 de mamífero y una proteína LXR de mamífero, método que comprende combinar una primera composición que comprende una proteína SIRT1 de mamífero, una segunda composición que comprende una proteína LXR de mamífero y una tercera composición que comprende un fragmento de un ácido nucleico celular que incluye un elemento de respuesta de LXR.
- 10 4. Un método para identificar un agente que modula la formación de un complejo que comprende una proteína SIRT1 de mamífero y una proteína LXR de mamífero, método que comprende a) combinar una primera composición que comprende una proteína SIRT1 de mamífero, una segunda composición que comprende una proteína LXR de mamífero y una tercera composición que comprende un fragmento de un ácido nucleico celular que incluye un elemento de respuesta de LXR para proporcionar una composición de complejo; b) adicionalmente i) poner en contacto la primera composición, la segunda composición o la tercera composición con una cuarta composición que comprende el agente antes de la etapa de combinación, o ii) poner en contacto la composición de complejo con la
- 15 cuarta composición que comprende el agente después de la etapa de combinación; proporcionando de este modo una composición de ensayo, y c) determinar si la formación del complejo es modulada por el agente.
- 5.- El método descrito en la reivindicación 4, en el que el agente incrementa la formación del complejo.
- 20 6.- El método descrito en la reivindicación 4, en el que la determinación además comprende d) combinar la primera composición que incluye una proteína SIRT1 de mamífero, la segunda composición que incluye una proteína LXR de mamífero, y la tercera composición que comprende un fragmento de un ácido nucleico celular que incluye un elemento de respuesta a LXR (LXRE) para proporcionar una composición de control que no incluye al agente, y e) determinar si la formación del complejo en la composición de ensayo está modulada en comparación con la formación del complejo en la composición de control.
- 25 7.- Un método para determinar si una sustancia candidata modula un efecto dependiente de SIRT1 de una LXR, que comprende
- a) transfectar una célula con un vector que alberga un gen SIRT1;
- b) transfectar adicionalmente la célula con un vector que alberga un gen informador dirigido operativamente por un promotor de LXRE;
- c) poner en contacto la célula con el candidato; y
- 30 d) determinar si el candidato modula la expresión del gen informador en comparación con una célula que no se haya puesto en contacto con el candidato; de tal modo que una diferencia en la extensión del efecto dependiente de SIRT1 de la LXR detectada entre la presencia y la ausencia del candidato indica que el candidato modula el efecto dependiente de SIRT1 de una LXR.
- 35 8.- Un método para determinar si una sustancia candidata modula la formación de un par de unión específica que comprende los miembros de par de unión específica SIRT1 y LXR, que comprende
- a) transfectar una célula con un vector que albergue una secuencia que codifique un primer miembro del par de unión específica marcado con una etiqueta;
- b) transfectar adicionalmente la célula con un vector que albergue una secuencia que codifica el segundo miembro del par de unión específica;
- 40 c) poner en contacto la célula con la sustancia candidata;
- d) lisar las células, poner en contacto los lisatos celulares con un anticuerpo específico para la etiqueta de epítipo, y recuperar los inmunoprecipitados que comprenden un complejo de la SIRT1 y la LXR con un adsorbente específico de anticuerpo;
- 45 e) llevar a cabo un procedimiento de análisis de transferencia Western usando anticuerpos específicos para SIRT1 y LXR; con lo que la detección de una diferencia en la formación del complejo entre la presencia del compuesto candidato y la ausencia del candidato indica que el candidato modula la interacción de la SIRT1 con la LXR.

Figura 1

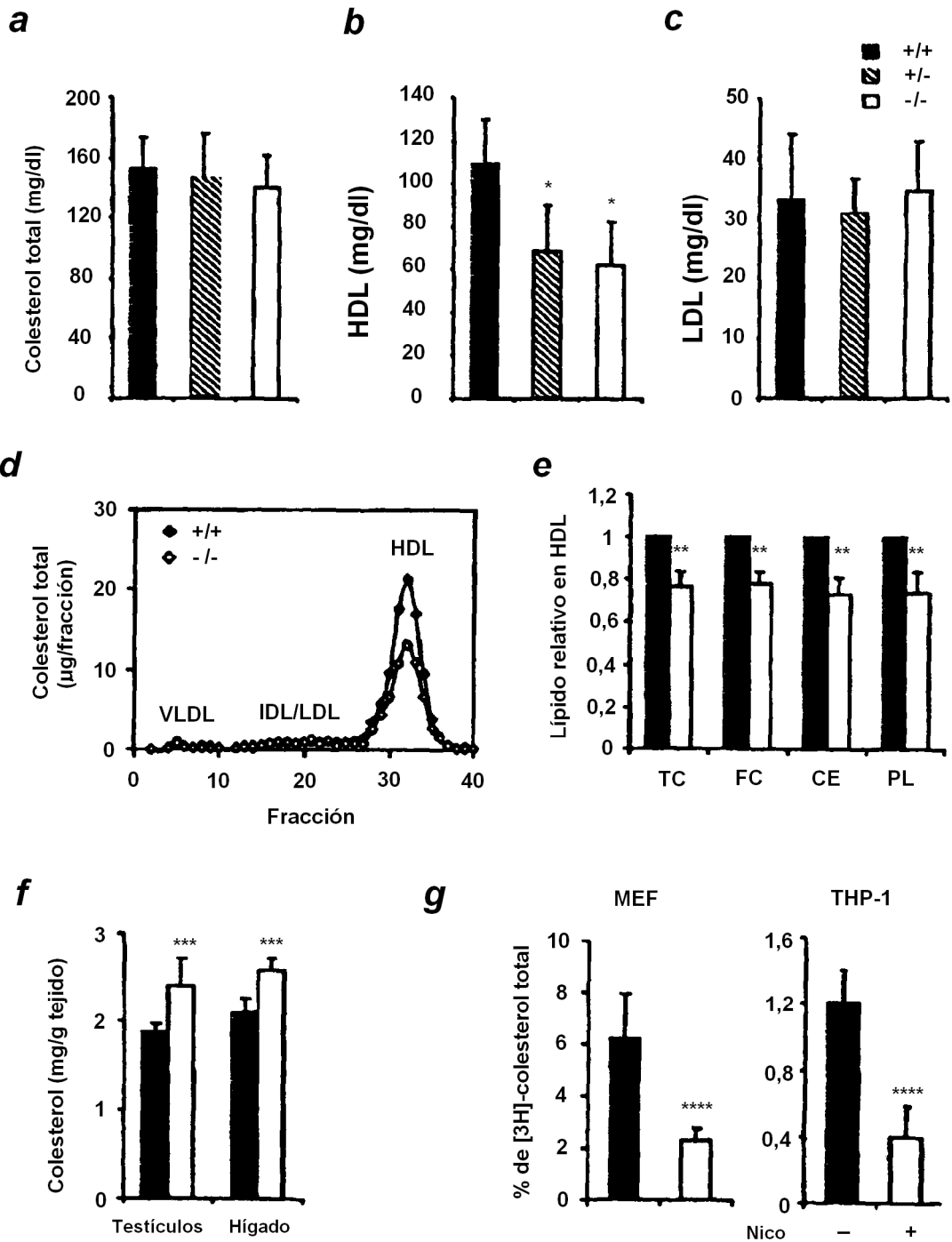


Figura 2

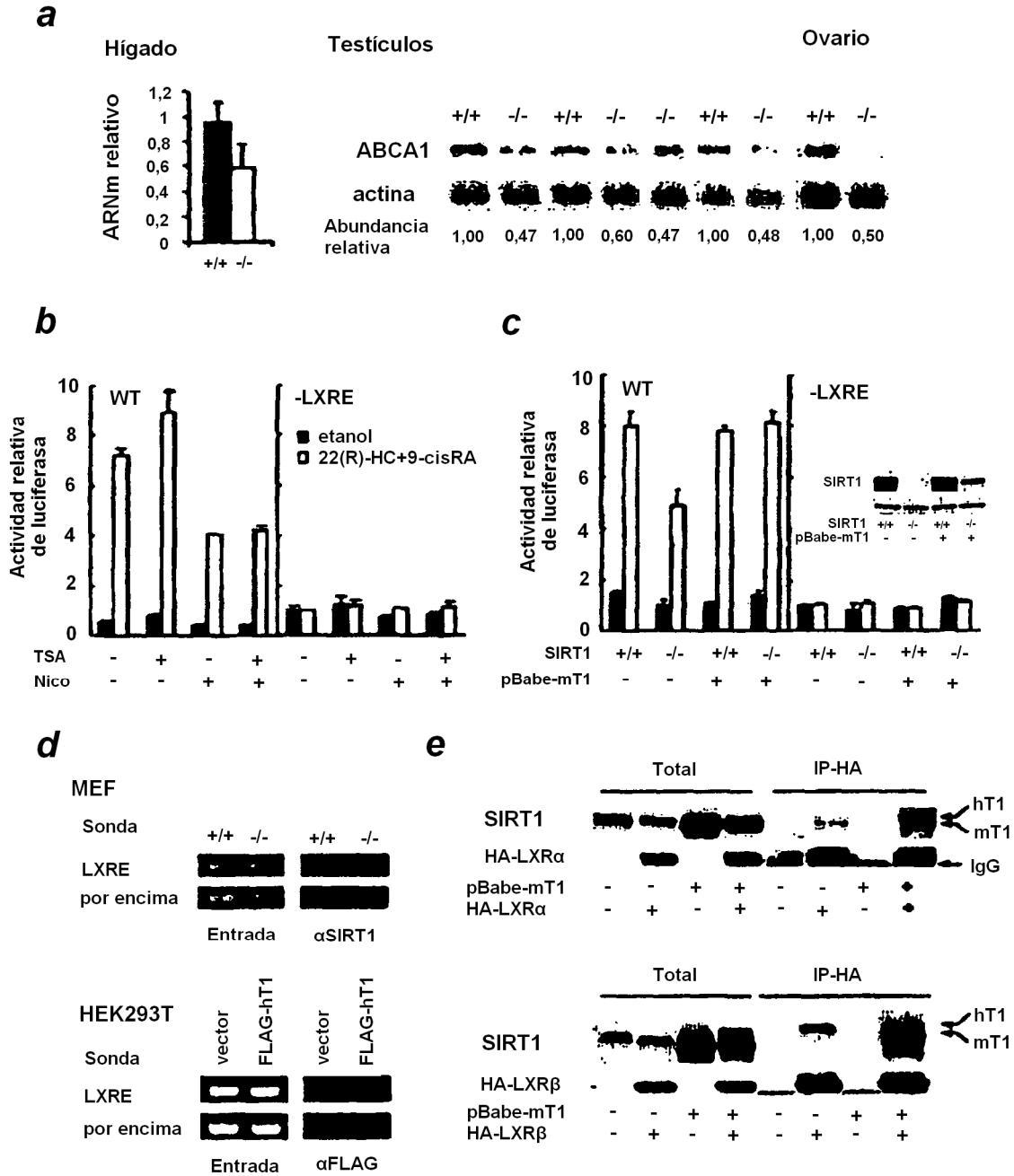


Figura 3

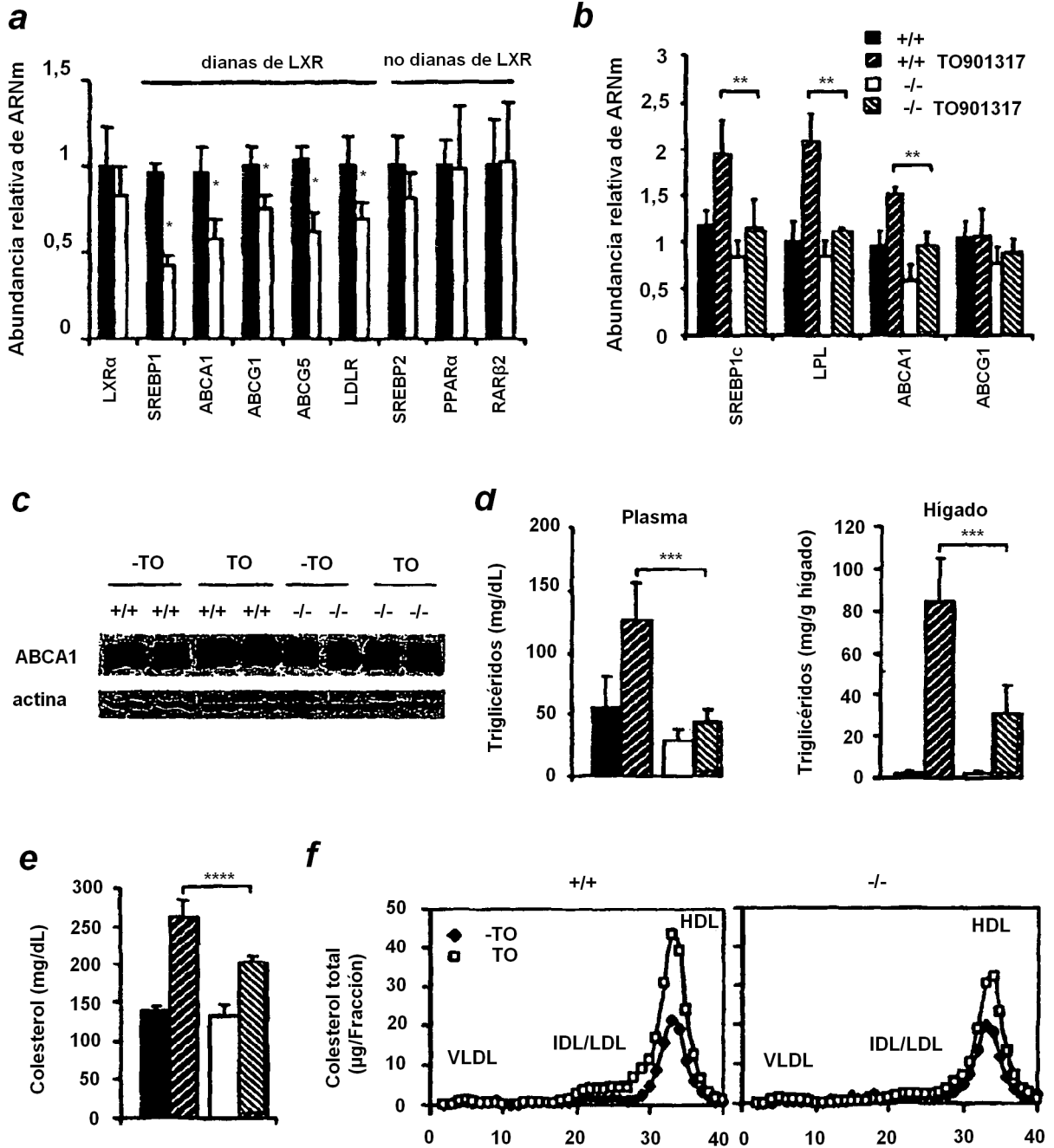


Figura 4

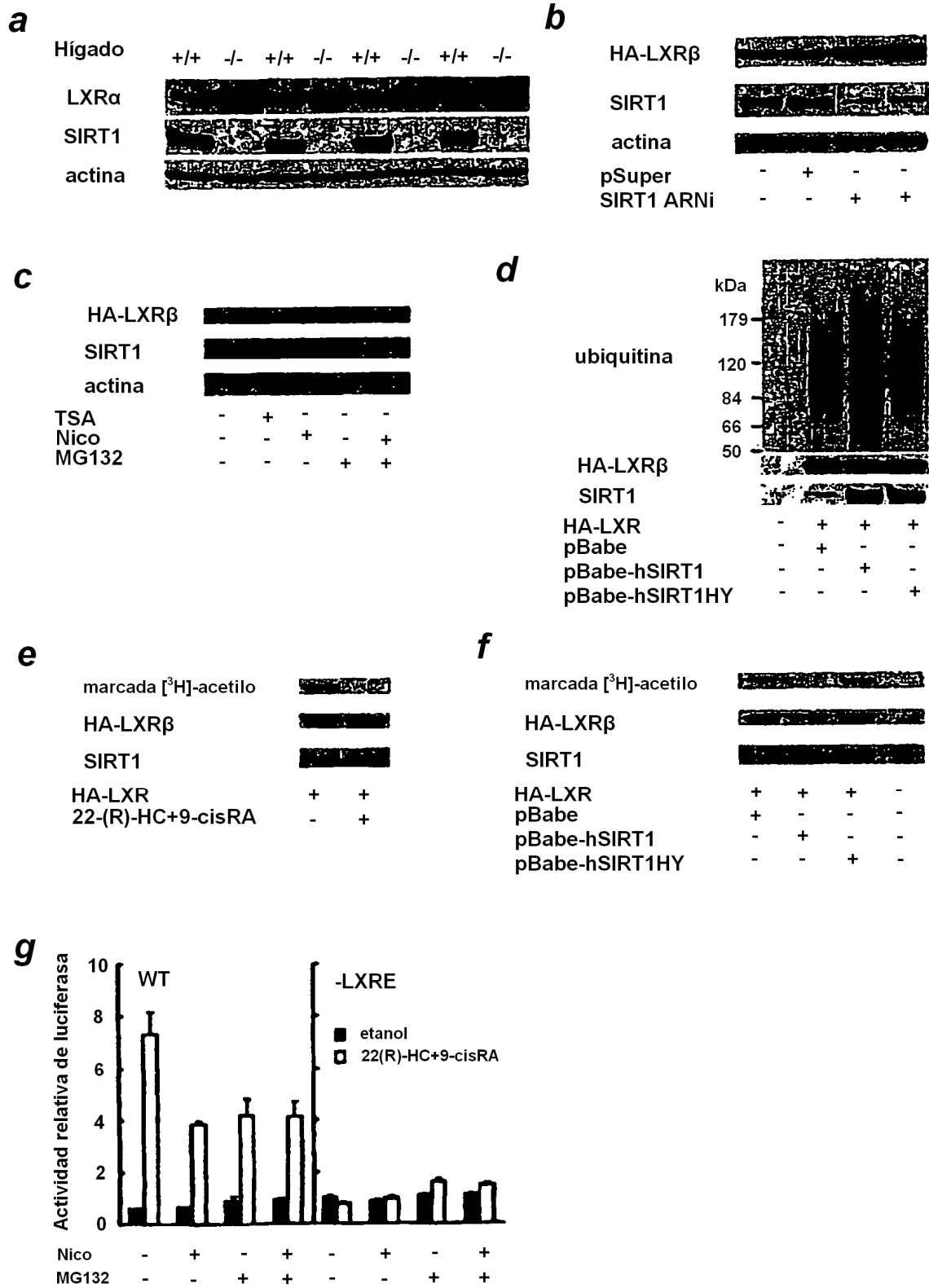


Figura 5

