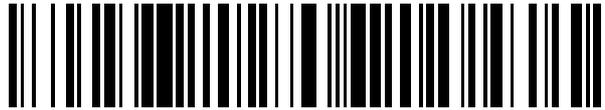


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 622**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2010 PCT/US2010/029376**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010 WO10120508**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2010 E 10764855 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2414521**

54 Título: **Regulación de microARN miR-33 en el tratamiento de trastornos relacionados con colesterol**

30 Prioridad:

31.03.2009 US 165041 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.04.2017

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)
55 Fruit Street
Boston, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

NAAR, ANDERS M.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 610 622 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

Regulación de microARN miR-33 en el tratamiento de trastornos relacionados con colesterol

5 **Antecedentes de la invención**

La homeostasis de colesterol y lípidos anómala está ligada a enfermedades frecuentes tales como síndrome metabólico, aterosclerosis/enfermedad cardiovascular y diabetes de tipo 2. El colesterol y los lípidos se transportan en la sangre como partículas lipoproteicas, tales como lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL) que trasladan su carga grasa a diferentes células y tejidos. La LDL en circulación en exceso puede oxidarse y captarse por macrófagos arteriales, convirtiéndolos en "células espumosas" llenas de colesterol/lípidos que están implicadas en la formación de placas ateroscleróticas. Por el contrario, el colesterol HDL se exporta de células periféricas, incluyendo macrófagos, y se transporta al hígado para desecharse por la ruta de transporte de colesterol inversa. Sin embargo, los pacientes que padecen enfermedad cardíaca tienen con frecuencia bajo HDL en circulación y eliminación de colesterol reducida. Por lo tanto, los intentos terapéuticos de aliviar la enfermedad cardiovascular se han centrado en reducir la biosíntesis de colesterol y producción de LDL (por ejemplo, mediante el tratamiento con estatina), así como aumentar el transporte de colesterol inverso mediado por HDL (por ejemplo, mediante complementación con niacina). Aunque estos tratamientos han mostrado una eficacia considerable, la enfermedad cardiovascular sigue siendo la causa principal de muerte en los Estados Unidos. Un entendimiento detallado de los mecanismos moleculares de regulación de colesterol y lípidos podría facilitar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para tratar la enfermedad cardiovascular.

El documento WO2008/061537 desvela (consúltase SEQ ID No. 298, reivindicaciones 3, 91) oligonucleótidos complementarios de la posición 1-20 de cualquiera de las SEQ ID No: 1-723, de las que SEQ ID No. 298 corresponde a SEQ ID No. 2 de la presente solicitud, para uso en el tratamiento de cáncer, infección viral, enfermedad inmunológica o enfermedad cardiovascular.

El transportador de casete de unión a ATP ABCA1 es importante para la síntesis de HDL y transporte de colesterol inverso desde tejidos periféricos, incluyendo macrófagos/células espumosas. Se han implicado mutaciones/SNP en el gen de ABCA1 en la aterosclerosis. Un nuevo producto terapéutico capaz de, por ejemplo, aumentar los niveles de ABCA1, producción de HDL y/o transporte de colesterol inverso podría mejorar la regulación y, potencialmente, aliviar la enfermedad cardiovascular.

35 **Sumario de la invención**

Los factores de transcripción de proteína de unión a elemento regulador de esterol (SREBP) son reguladores conocidos de genes implicados en la biosíntesis tanto de colesterol como de lípidos y su captación. La presencia de secuencias que codifican microARN conservados que están incluidas dentro de secuencias intrónicas en los genes de SREBP-2 y -1 humanos se ha descubierto ahora. Estudios preliminares descritos en el presente documento a continuación produjeron el sorprendente descubrimiento de que miR-33 ay b, denominados en el presente documento SEQ ID NO. 1 y 2, respectivamente, se dirigen al transportador de casete de unión a ATP ABCA1 para represión de la traducción. El papel coordinado de miR-33 con los productos génicos hospedadores SREBP en la regulación de la homeostasis de colesterol en mamíferos se desconocía previamente. Además, se ha descubierto ahora que la inhibición de miR-33 representa un nuevo medio terapéutico para aumentar los niveles de ABCA1, producción de HDL y transporte de colesterol inverso.

En un aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que es complementaria de SEQ ID NO. 1 o 2, para su uso como se expone en la reivindicación 1. El ácido nucleico puede ser eficaz para aumentar la expresión de la proteína de casete de unión a ATP, subfamilia A, miembro 1 (ABCA1) en una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la composición comprende el ácido nucleico en una cantidad eficaz para aumentar la expresión de la proteína del casete de unión a ATP, subfamilia A, miembro 1 (ABCA1) en un sujeto humano que necesite homeostasis del colesterol.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico que es complementaria de SEQ ID NO. 1 o 2 puede ser un oligonucleótido antisentido, incluyendo, pero sin limitación, los oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento, por ejemplo, SEQ ID NO: 3, 4, 6, u 8. En algunas realizaciones el ácido nucleico se modifica, por ejemplo, contiene uno o más nucleósidos no naturales. En algunas realizaciones el ácido nucleico está bloqueado.

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que es complementaria de SEQ ID NO. 1 o 2 puede ser un ARN de interferencia, incluyendo, pero sin limitación, un ARNhp o un ARNip.

En otra realización más, la secuencia de ácido nucleico que es complementaria de SEQ ID NO. 1 o 2 es un antagonir.

En otra realización más, la secuencia de ácido nucleico que es complementaria de SEQ ID NO. 1 inhibe el procesamiento postranscripcional de SEQ ID NO. 1.

En otra realización más, la secuencia de ácido nucleico que es complementaria de SEQ ID NO. 2 inhibe el procesamiento postranscripcional de SEQ ID NO.

Se describe en el presente documento una composición que comprende un vector capaz de expresar una secuencia de ácido nucleico complementaria de SEQ ID NO. 1 o 2, en una cantidad eficaz para aumentar la expresión de la proteína de casete de unión a ATP, subfamilia A, miembro 1 (ABCA1) en un sujeto humano que necesite homeostasis de colesterol.

El vector puede ser un vector plasmídico o un vector viral.

Se describe en el presente documento un método para aumentar la expresión de la proteína de casete de unión a ATP, subfamilia A, miembro 1 (ABCA1) en una célula, por ejemplo, una célula en un sujeto que necesite homeostasis de colesterol, comprendiendo el método administrar a la célula o el sujeto una secuencia de ácido nucleico que es complementaria de SEQ ID NO. 1 o 2, aumentando de este modo la expresión de la proteína ABCA1 en la célula o el sujeto.

Se describe en el presente documento un método para aumentar la salida de colesterol intracelular y/o la producción de HDL en el hígado de un sujeto que comprende administrar al sujeto una secuencia de ácido nucleico que es complementaria de SEQ ID NO. 1 o 2, aumentando de este modo la salida de colesterol intracelular y/o producción de HDL en el hígado del sujeto.

Se describe en el presente documento un método para reducir la cantidad de colesterol que circula en la sangre de un sujeto que comprende administrar al sujeto una secuencia de ácido nucleico que es complementaria de SEQ ID NO. 1 o 2, reduciendo de este modo la cantidad de colesterol que circula en la sangre del sujeto.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada, y de las reivindicaciones. Por lo tanto, otros aspectos de la invención se describen en la siguiente divulgación y están dentro del ámbito de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada, proporcionada como ejemplo, pero que no se pretende que limite la invención a realizaciones específicas descritas, puede entenderse junto con las figuras adjuntas, incorporadas en el presente documento por referencia.

La Figura 1 representa genes regulados por SREBP. El diagrama muestra los intermedios metabólicos principales en las rutas para la síntesis del colesterol, ácidos grasos y triglicéridos. *In vivo*, SREBP-2 activa preferentemente genes de metabolismo del colesterol, mientras que SREBP-1c activa preferentemente genes de metabolismo de ácidos grasos y triglicéridos. DHCR, 7-deshidrocolesterol reductasa; FPP, farnesil difosfato; GPP, geranylgeranyl pirofosfato sintasa; CYP51, lanosterol 14 α -desmetilasa; G6PD, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; GPAT, glicerol-3-fosfato aciltransferasa. Adaptado de Horton *et al.* J Clin Invest. 2002. 109:1125-31.

La Figura 2 representa la activación por SREBP de la transcripción de genes diana interaccionando con dominios KIX estructuralmente conservados (óvalos azules) presentes en las histona acetiltransferasas CBP/p300 y en la subunidad ARC105/MED15 del complejo coactivador de ARC/Mediador. El reclutamiento de CBP/p300 da como resultado acetilación aumentada de histonas/cromatina, mientras que la interacción de ARC/Mediador da como resultado el reclutamiento de ARN polimerasa II (Pol II) a través del dominio C-terminal (CTD) en su subunidad grande. TFIID y otros factores de transcripción generales (GTF) también se reclutan al promotor, facilitando el inicio de la transcripción.

La Figura 3 representa los genes de SREBP-1 y SREBP-2, que albergan secuencias que codifican miARN (miR-33b y miR-33a, respectivamente) localizados en intrones. Notablemente, los ratones solamente albergan el miARN miR-33a en el gen de SREBP-2 de ratón, mientras que el intrón de SREBP-1 de ratón correspondiente carece de homología con el gen SREBP-1 humano y está desprovisto de secuencias codificantes de miARN.

La Figura 4 representa la transcripción por Pol II mediante secuencias codificantes de miARN, que da como resultado la síntesis de transcritos de miARN primarios (pri-miARN) que forman estructuras en horquilla reconocidas por la enzima de procesamiento de miARN Drosha. El pri-miARN se procesa en pre-miARN por Drosha y después se exporta al citoplasma, donde experimenta procesamiento adicional por Dicer hasta dobles cadenas de miARN maduro. Estas se desenrollan por los complejos de RISC y la cadena que se dirige a ARNm se incorpora en RISC, que después se dirige a ARNm por supresión de la traducción o degradación de ARNm, dependiendo de la complementariedad de secuencia de miARN-ARNm. Adaptado de van den Berg *et al.* Biochim. et Biophys. Acta 2008.

La Figura 5 representa el transportador de ABC ABCA1 (y el ABCG1 relacionado), que exporta colesterol libre fuera de células periféricas, tales como macrófagos y células espumosas aterógenas, a ApoA-I y lipoproteína de alta densidad (HDL). Las HDL se unen con receptor eliminador-B1 (SR-B1) en hepatocitos, y transfieren su colesterol asociado y ésteres de colesterol (EC) al hígado. El colesterol se secreta a la bilis bien como un colesterol libre o bien después de conversión a sales biliares. Adaptado de Maxfield y Tabas. Nature 2005. 438:612-21.

La Figura 6 representa un modelo para la regulación coordinada de homeostasis de colesterol por miR-33 y su producto génico hospedador SREBP. miR-33 reprime la traducción de ABCA1 dirigiéndose a su 3' UTR. Se ha propuesto que esta etapa está coordinada con la expresión de SREBP, que activa la biosíntesis y captación de colesterol mediante transactivación de genes colesterogénicos. La acumulación de colesterol inhibe la ruta de SREBP, y activa la expresión de ABCA1, que se trasloca a la membrana celular y media en la salida de colesterol a ApoA-I y HDL.

La Figura 7 representa la regulación de la expresión de ABCA1 por miARN. En la Figura 7A, la desactivación dirigida por ARNi de las enzimas de procesamiento de miARN Drosha y Dicer usando ARNi en tres líneas celulares (macrófagos de ratón J774, células de carcinoma hepatocelular HepG2 humano y fibroblastos IMR-90 humanos normales) dio como resultado un aumento en los niveles de proteína ABCA1. Los niveles de proteína se normalizaron por análisis de Bradford. Se usó β -Tubulina como control de carga. En la Figura 7B, se muestra que el antagonismo de la función de miR-33 por oligonucleótidos antisentido anti-miR-33 da como resultado mayor expresión de ABCA1. La Figura 7C representa el efecto de miR-33, que se imita por células de transfección con precursor de miARN pre-miR-33. Como se esperaba, la expresión de ABCA1 se inhibe mediante represión de la traducción por niveles aumentados de miR-33.

Las Figuras 8A-C representan una evaluación de los sitios diana predichos para miR-33 en 3'-UTR de ABCA1 por construcciones indicadoras de luciferasa en células HEK293. (A) Se predicen dos sitios diana potenciales para miR-33 que residen dentro de las primeras 160 bases de la 3' UTR de ABCA1 (SEQ ID NO: 5). La inserción de la secuencia correspondiente (bases 18-205) de la 3' UTR DE ABCA1 cadena debajo de la ORF de luciferasa da como resultado la regulación negativa de la actividad luciferasa (gráfica derecha). (B) La regulación negativa observada en (A) está bloqueada por el agotamiento específico de secuencia de las isoformas de la miR-33a/b (SEQ ID NO: 7 y 9) usando oligonucleótidos anti-microARN (Ambion) A33a y A33b (SEQ ID NO: 6 y 8) a una concentración de 30 nM (AC:anti-miR no relacionado como control negativo). (C) La adición de precursor de miR-33 de tipo silvestre exógeno en exceso (33a y 33b a 30 nM), pero no precursor de miR-33 mutado (m33a (SEQ ID NO:10) y m33b (SEQ ID NO:11) a 30 nM), inhibió adicionalmente la actividad luciferasa como se esperaba.

Las Figuras 9A-F representan regulación recíproca por colesterol y SREBP/miR-33. El agotamiento mediado por Lovastatina y β -ciclodextrina de colesterol en macrófagos de ratón J774 da como resultado la expresión aumentada de (A) SREBP-2 y (B) miR-33a, y (C) niveles de proteína ABCA1 reducidos. Las barras de error representan d.t. ** indica $p < 0,01$. (D) Macrófagos de ratón J774 con colesterol agotado muestran regulación positiva de la proteína ABCA1 en respuesta a transfección con oligonucleótidos antisentido de miR-33b en comparación con transfección de simulación (UT) u oligonucleótidos de control antisentido (AC). β -tubulina actuó como control de carga en esta inmunotransferencia. (E) La transfección de macrófagos J774 cultivados en presencia de suero/colesterol con precursor de miR-33a da como resultado niveles reducidos de ABCA1 en comparación con control de precursor (PC). (F) La introducción de oligonucleótidos antisentido de miR-33a (A) en macrófagos J774 cargados con colesterol radiomarcado da como resultado salida de colesterol aumentada, mientras que los precursores de miR-33a (P) inhiben la salida de colesterol, en comparación con controles de la transfección (UT) u oligonucleótidos de control antisentido mezclados (AC) o control de precursor (PC). Las barras de error representan d.t. ** indica $p < 0,01$.

Las Figuras 10A-G representan la regulación de HDL por miR-33a *in vivo*. (A) La inyección en la vena de la cola de ratones alimentados con una dieta de tipo occidental con oligonucleótidos antisentido-ácido nucleico bloqueado (LNA) dirigidos contra miR-33a de ratón da como resultado colesterol en suero total elevado en comparación con vehículo (PBS) y oligonucleótidos de control de LNA mezclados (LC). (B) El análisis por FPLC de suero agrupado de 5 ratones con una dieta de tipo occidental tratados con LNA-antisentido de miR-33a (LNA) y control de LNA (LC) reveló un aumento de la magnitud del pico de colesterol HDL en los animales tratados con antisentido de miR-33a. La elución de patrones lipoproteicos está indicada por los marcadores. Los triglicéridos (C), glucosa (D), AST (E), y ALT (F) en plasma no se vieron afectados por los tratamientos. (G) representa un modelo para regulación coordinada de homeostasis de colesterol por miR-33 y su producto génico hospedador SREBP.

Las Figuras 11A-E representan la coexpresión de SREBP en tejidos humanos y de ratón. Los genes de SREBP-1 (A; SEQ ID NO: 12) y SREBP-2 (B; SEQ ID NO: 13) humanos albergan miARN intrónicos relacionados (miR-33b y miR-33a, respectivamente). Se muestran las secuencias que codifican los pri-miARN, con las secuencias miARN maduras subrayadas. (C-E) correlación de la expresión de miR-33a/b y genes hospedadores de SREBP en tejidos humanos y de ratón seleccionados; (C) hSREBP-1/hsa-miR-33b, (D) hSREBP-2/hsa-miR-33a, (E) mSREBP-1/mmu-miR-33b. Las barras de error representan e.t.m.

La Figura 12 representa la secuencia y el contexto genómico de las isoformas miR-33a (A) y miR-33b (B) en especies seleccionadas (miR-33a en ser humano, SEQ ID NO: 14; ratón, SEQ ID NO: 15; pollo, SEQ ID NO: 16; rana potencial, SEQ ID NO: 17, y Drosophila, SEQ ID NO: 18; miR-33b en ser humano, SEQ ID NO: 19, en ratón, SEQ ID NO: 20). Los tallo-bucles de miARN se muestran y se agrupan según los genes de SREBP en los que residen. Los asteriscos representan las posiciones de restos perfectamente conservados.

La Figura 13A representa la expresión relativa de SREBP-1 en tejidos humanos. Se usó β -Actina para normalizar la expresión entre tejidos. (B) Expresión relativa de hsa-miR-33b en tejidos humanos. Se usó U6 para normalizar la expresión entre tejidos. Se agrupó ARN total usado de cada tejido a partir de al menos tres donantes incluyendo pacientes machos y hembras.

La Figura 14A representa la expresión relativa de SREBP-2 en tejidos humanos. Se usó β -Actina para normalizar la expresión entre tejidos. (B) Expresión relativa de hsa-miR-33a en tejidos humanos. Se usó U6 para normalizar la expresión entre tejidos. Se comparan tejidos con expresión relativa baja en la gráfica de la izquierda y se comparan tejidos con expresión relativa alta en la gráfica de la derecha. Se agrupó ARN total de cada tejido de al menos tres

donantes incluyendo pacientes machos y hembras.

La Figura 15A representa la expresión relativa de SREBP-2 en tejidos de ratón. Se usó β -Actina para normalizar la expresión entre tejidos. (B) Expresión relativa de mmu-miR-33a en tejidos humanos. Se usó U6 para normalizar la expresión entre tejidos.

5 La Figura 16 representa los sitios diana de miARN predichos en la 3' UTR de NPC1 humano (TargetScan 4.2). El sitio diana de miR-33 se indica por una flecha.

La Figura 17 representa miR-33 a y b, como SEQ ID NO. 1 y 2, respectivamente. También se muestran oligonucleótidos anti-miR-33a y b, como SEQ ID NO. 3 y 4, respectivamente.

10 Descripción detallada de la invención

Definiciones

15 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se tiene habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, la presente solicitud, incluyendo las definiciones, tendrá preferencia.

20 Como se indica en el presente documento, una "secuencia de ácido nucleico complementaria" es una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridar con otra secuencia de ácido nucleico comprendida por pares de bases de nucleótidos complementarios. Por "hibridar" se entiende emparejar para formar una molécula bicatenaria entre bases de nucleótidos complementarias (por ejemplo, adenina (A) forma un par de bases con timina (T), como lo hace guanina (G), con citosina (C) en ADN) en condiciones adecuadas de rigurosidad. (Véase, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507).

25 Como se usa en el presente documento un "oligonucleótido antisentido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico sintetizada que es complementaria de una secuencia de ADN o ARNm, tal como la de un microARN.

30 "ARN" es una molécula que comprende al menos uno o más restos de ribonucleótidos. Un "ribonucleótido" es un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un resto de beta-D-ribofuranosa. El término ARN, como se usa en el presente documento, incluye ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado, tal como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de forma recombinante, así como ARN alterado que difiere de ARN de origen natural por la adición, supresión, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Los nucleótidos de las moléculas de ARN también pueden comprender nucleótidos no convencionales, tales como nucleótidos de origen no natural o nucleótidos sintetizados químicamente o desoxinucleótidos.

35 Un "microARN" (miARN) normalmente se refiere a moléculas de ARN monocatenarias de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud, que regulan la expresión génica. Los miARN se codifican por genes de cuyo ADN se transcriben, pero los miARN no se traducen en proteína; en su lugar cada transcrito primario se procesa en una estructura de tallo-bucle corta antes de experimentar procesamiento adicional a un miARN funcional. Las moléculas de miARN maduras son parcialmente complementarias de una o más moléculas de ARN mensajero (ARNm) y su función principal es regular negativamente la expresión génica.

45 Como se usa en el presente documento "un ARN de interferencia" se refiere a cualquier secuencia de ARN bicatenaria o monocatenaria, capaz, directa o indirectamente (es decir, tras la conversión), de inhibir o regular negativamente la expresión génica mediando en interferencia de ARN. El ARN de interferencia incluye, pero sin limitación, ARN de interferencia pequeño ("ARNip") y ARN en horquilla pequeño ("ARNhp"). La "interferencia de ARN" se refiere a la degradación selectiva de un transcrito de ARN mensajero compatible con secuencia.

50 Como se usa en el presente documento, un "ARNhp" (ARN en horquilla pequeño) se refiere a una molécula de ARN que comprende una región antisentido, una parte de bucle y una región con sentido, en la que la región con sentido tiene nucleótidos complementarios que forman pares de bases con la región antisentido para formar un tallo bicatenario. Después del procesamiento postranscripcional, el ARN en horquilla pequeño se convierte en un ARN de interferencia pequeño mediante un acontecimiento de escisión mediado por la enzima Dicer, que es un miembro de la familia RNasa III.

55 Un "ARN de interferencia pequeño" o "ARNip" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula de ARN pequeña capaz de inhibir o regular negativamente la expresión génica mediando en interferencia de ARN de una manera específica de secuencia. El ARN pequeño puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 18 a 21 nucleótidos de longitud.

60 Como se usa en el presente documento, un "antagomir" se refiere a un ARN sintético pequeño que tiene complementariedad con una diana de microARN específica, con despareamiento en el sitio de escisión o una o más modificaciones de bases para inhibir la escisión.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "procesamiento postranscripcional" se refiere a procesamiento de ARNm que sucede después de la transcripción y está mediado, por ejemplo, por las enzimas Dicer y/o Drosha.

Como se usa en el presente documento, el término "ABCA1" se refiere al transportador de proteínas de casete de unión a ATP, subfamilia A, miembro 1, descrito, por ejemplo, en Remaley, A. T., Proc. Nat. Acad. Sci. 96: 12685-12690, 1999.

5 Como se usa en el presente documento "un aumento en la expresión de proteína ABCA1" se refiere a una cantidad de proteína ABCA1 que es al menos una vez mayor (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 1000, 10.000 veces o más) que la cantidad de proteína ABCA1 en un sujeto antes de tratamiento de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. "Aumentado" como se refiere a la cantidad de expresión de proteína ABCA1 en un sujeto también significa al menos aproximadamente 5 % más (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100 %) que la cantidad de proteína ABCA1 en el sujeto antes del tratamiento de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Las cantidades de proteína pueden medirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

15 Por "una cantidad eficaz" se entiende la cantidad de un agente o composición requerido que comprende el agente para aliviar los síntomas de una enfermedad en relación con un paciente no tratado. La cantidad eficaz de composición o composiciones usadas para tratamiento terapéutico de una enfermedad varía dependiendo del modo de administración, la edad, el peso corporal y la salud general del sujeto. En última instancia, el médico o veterinario a cargo decidirá la cantidad apropiada y el régimen de dosificación. Dicha cantidad se denomina "cantidad eficaz".

20 Como se usa en el presente documento, "homeostasis de colesterol" se refiere a la regulación de captación de colesterol, biosíntesis de colesterol, conversión de colesterol a ácidos biliares y excreción de ácidos biliares como dichos procesos suceden en un sujeto que tiene niveles sanos de LDL, HDL y colesterol en sangre (por ejemplo, dichos niveles sanos también se denominan en el presente documento "patrón de referencia"). En consecuencia, un sujeto que necesite homeostasis de colesterol necesita regulación mejorada que dé como resultado un retorno a niveles sanos de LDL, HDL y/o colesterol en sangre.

30 Un "sujeto" es un vertebrado, incluyendo cualquier miembro de la clase de mamíferos, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales zoológicos, deportivos o mascotas, tales como, ratón, conejo, cerdo, oveja, cabra, vaca y primates superiores.

Como se usa en el presente documento, un "vector" o "vector de expresión" es un vehículo de suministro basado en ácido nucleico que comprende secuencias reguladoras y un gen de interés, que puede usarse para transferir sus contenidos a una célula.

35 En esta divulgación, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado atribuido a ellos en la ley de patentes de Estados Unidos y pueden significar "incluye", "que incluye" y similares; "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente" de forma similar tienen el significado atribuido en la ley de patentes de Estados Unidos y el término es abierto, permitiendo la presencia de más de lo que se enumera siempre que las características básicas o nuevas de lo que se enumera no cambien por la presencia de más de lo que se enumera, pero excluye realizaciones de la técnica anterior.

Otras definiciones aparecen en el contexto a lo largo de la presente divulgación.

45 Composiciones y métodos

Los microARN (miARN) son una clase de ARN no codificantes pequeños (por ejemplo, de 18-24 nucleótidos) que existen en diversos organismos, incluyendo mamíferos, y están conservados en la evolución. Los miARN se procesan a partir de precursores en horquilla de aproximadamente 70 nucleótidos que derivan de transcritos primarios mediante escisión secuencial por las enzimas RNAsa III drosha y dicer. Muchos microARN pueden codificarse en regiones intergénicas, hospedarse dentro de intrones de pre-ARNm o dentro de genes de ARNnc. Muchos miARN también tienden a agruparse y transcribirse como policistrones y con frecuencia tienen patrones de expresión de espacio temporal similares. Se ha descubierto que los miARN tienen papeles en diversos procesos biológicos incluyendo la temporización del desarrollo, diferenciación, apoptosis, proliferación celular, desarrollo de órganos y metabolismo.

55 Los microARN-33 a y b (miR-33 a y b), denominados en el presente documento SEQ ID NO. 1 y 2, respectivamente, se dirigen al transportador de casete de unión a ATP ABCA1 para represión de la traducción. En consecuencia, la inhibición de miR-33 representa un nuevo medio terapéutico para aumentar los niveles de ABCA1, producción de HDL y transporte de colesterol inverso.

60 Los ácidos nucleicos para uso de acuerdo con la invención se diseñan para inhibir miR-33 a y/o b en un sujeto que necesite homeostasis de colesterol. En un aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que es complementaria de SEQ ID NO. 1 o 2, para uso de acuerdo con las invenciones en una cantidad eficaz para aumentar la expresión de la proteína de casete de unión a ATP, subfamilia A, miembro 1, (ABCA1) en un sujeto humano que necesite homeostasis de colesterol. Esto puede conseguirse, por ejemplo, administrando un oligonucleótido antisentido que es complementario de miR-33 a o b, incluyendo pero sin limitación el oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4. Otras secuencias de ácido nucleico para uso de acuerdo con la invención y que son

complementarias de miR-33 a o b pueden ser las que inhiben el procesamiento postraduccional de miR-33 a o b, tales como ARN de interferencia, incluyendo pero sin limitación un ARNhp o ARNip, o un antagomir.

Los oligonucleótidos antisentido se diseñan normalmente para bloquear la expresión de una diana de ADN o ARN uniéndose con la diana y deteniendo la expresión al nivel de transcripción, traducción o corte y empalme. Los oligonucleótidos antisentido para uso de acuerdo con la presente invención son secuencias de ácido nucleico complementarias diseñadas para hibridar en condiciones rigurosas con miR-33 a y/o b. Por lo tanto, se eligen oligonucleótidos que sean suficientemente complementarios de la diana, es decir, que hibriden suficientemente bien y con suficiente especificidad, para proporcionar el efecto deseado.

En el contexto de la presente invención, hibridación significa enlace de hidrógeno, que puede ser enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso, entre bases de nucleósidos o nucleótidos complementarias. Por ejemplo, adenina y timina son nucleobases complementarias que se emparejan mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Complementario, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una cierta posición de un oligonucleótido es capaz de formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de ADN o ARN, entonces se considera que el oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí en esa posición. El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Por lo tanto, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad o formación de pares de bases precisos de modo que se produzca unión estable y específica entre el oligonucleótido y la diana de ADN o ARN.

Se entiende en la técnica que no es necesario que una secuencia de ácido nucleico complementaria sea 100 % complementaria de la de su ácido nucleico diana para que sea hibridable específicamente. Una secuencia de ácido nucleico complementaria para uso de acuerdo con la invención es hibridable específicamente cuando la unión de la secuencia con la molécula de ADN o ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para provocar una pérdida de actividad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica de la secuencia con secuencias no diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que los ensayos se realizan en condiciones adecuadas de rigurosidad. Por ejemplo, la concentración salina rigurosa será habitualmente menos de aproximadamente NaCl 750 mM y citrato trisódico 75 mM, preferentemente menor de aproximadamente NaCl 500 mM y citrato trisódico 50 mM, y más preferentemente menor de aproximadamente NaCl 250 mM y citrato trisódico 25 mM. Puede obtenerse hibridación de baja rigurosidad en ausencia de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que puede obtenerse hibridación de alta rigurosidad en presencia de formamida al menos aproximadamente al 35 %, y más preferentemente formamida al menos aproximadamente al 50%. Las condiciones de temperatura rigurosas incluirán habitualmente temperaturas de al menos aproximadamente 30 °C, más preferentemente de al menos aproximadamente 37 °C y más preferentemente de al menos aproximadamente 42 °C. Diversos parámetros adicionales, tales como tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecilsulfato sódico (SDS), y la inclusión o exclusión de ADN vehiculo, se conocen bien por los expertos en la materia. Se consiguen diversos niveles de rigurosidad combinando estas diversas condiciones según sea necesario. En una realización preferida, se produce la hibridación a 30 °C en NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM y SDS 1 %. En una realización más preferida, se produce la hibridación a 37 °C en NaCl 500 mM, citrato trisódico 50 mM, SDS 1 %, formamida 35 %, y ADN de esperma de salmón desnaturalizado (ADNmc) 100 µg/ml. En una realización más preferida, se producirá hibridación a 42 °C en NaCl 250 mM, citrato trisódico 25 mM, SDS 1 %, formamida 50 %, y ADNmc 200 µg/ml. Resultarán evidentes para los expertos en la materia variaciones útiles en estas condiciones.

Para la mayoría de aplicaciones, las etapas de lavado después de la hibridación también variarán en su rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad del lavado pueden definirse por concentración salina y por temperatura. Como anteriormente, la rigurosidad del lavado puede aumentarse reduciendo la concentración salina o aumentando la temperatura. Por ejemplo, las condiciones salinas de rigurosidad para las etapas de lavado serán preferentemente menores de aproximadamente NaCl 30 mM y citrato trisódico 3 mM, y más preferentemente menores de aproximadamente NaCl 15 mM y citrato trisódico 1,5 mM. Las condiciones de temperatura rigurosas para las etapas de lavado habitualmente incluirán una temperatura de al menos aproximadamente 25 °C, más preferentemente de al menos aproximadamente 42 °C y aún más preferentemente de al menos aproximadamente 68 °C. En una realización preferida, se producirán etapas de lavado a 25 °C en NaCl 30 mM, citrato trisódico 3 mM y SDS 0,1 %. En una realización más preferida, se producirán etapas de lavado a 42 °C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1,5 mM y SDS 0,1 %. En una realización preferida, se producirán etapas de lavado a 68 °C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1,5 mM y SDS 0,1 %. Variaciones adicionales sobre estas condiciones resultarán evidentes para los expertos en la materia. Los expertos en la materia conocen bien técnicas de hibridación y estas se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (Science 196: 180, 1977); Grunstein y Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72: 3961, 1975); Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York, 2001); Berger y Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Nueva York); y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

Se prefiere que los oligonucleótidos antisentido para uso de acuerdo con la presente invención comprendan al menos

80 % de complementariedad de secuencia con una región diana dentro del ácido nucleico diana, más que comprendan 90 % de complementariedad de secuencia y aún más preferiblemente que comprendan 95 % de complementariedad de secuencia con la región diana dentro de la secuencia de ácido nucleico diana a la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 nucleobases del oligonucleótido antisentido son complementarias, y por lo tanto hibridarían específicamente, con una región diana representaría 90 por ciento de complementariedad. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando herramientas de búsqueda de alineamiento local básica (programas BLAST) (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). Se identifican compuestos antisentido y otros para uso de acuerdo con la invención, que hibridan con miR-33 a o b, mediante experimentación, y se identifican en lo sucesivo en el presente documento secuencias representativas de estos compuestos como realizaciones preferidas de la invención (por ejemplo, incluyendo pero sin limitación el oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4).

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que es complementaria de SEQ ID NO. 1 o 2 puede ser un ARN de interferencia, incluyendo pero sin limitación, un ARNhp o ARNip. El ARN de interferencia incluye, pero sin limitación, ARN de interferencia pequeño ("ARNip") y ARN en horquilla pequeño ("ARNhp"). Se conocen bien en la técnica métodos para construir ARN de interferencia. Por ejemplo, el ARN de interferencia puede ensamblarse a partir de dos oligonucleótidos separados, donde una cadena es la cadena con sentido y la otra es la cadena antisentido, en los que las cadenas antisentido y con sentido son autocomplementarias (es decir, cada cadena comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de nucleótidos en la otra cadena; tal como cuando la cadena antisentido y la cadena con sentido forman una estructura de doble cadena o bicatenaria); la cadena antisentido comprende secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una parte de la misma (es decir, un gen no deseado) y la cadena con sentido comprende secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una parte de la misma. Como alternativa, se ensambla ARN de interferencia a partir de un único oligonucleótido, donde las regiones con sentido y antisentido autocomplementarias se unen por medio de enlazador o enlazadores basados en ácido nucleico o no basados en ácido nucleico. El ARN de interferencia puede ser un polinucleótido con una estructura secundaria de doble cadena, doble cadena asimétrica, en horquilla o en horquilla asimétrica, que tiene regiones con sentido y antisentido autocomplementarias, en las que la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana separada o una parte de la misma y la región con sentido que tiene secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una parte de la misma. El interferente puede ser un polinucleótido monocatenario circular que tiene dos o más estructuras en bucle y un tallo que comprende regiones con sentido y antisentido autocomplementarias, en las que la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una parte de la misma y la región con sentido que tiene secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una parte de la misma, y en la que el polinucleótido circular puede procesarse bien *in vivo* o bien *in vitro* para generar una molécula de ARNip activa capaz de mediar en la interferencia de ARN.

En realizaciones específicas de la invención, la región codificante de ARN de interferencia codifica una molécula de ARN autocomplementaria que tiene una región con sentido, una región antisentido y una región de bucle. Dicha molécula de ARN cuando se expresa forma convenientemente una estructura "en horquilla", y se denomina en el presente documento "ARNhp." La región en bucle es generalmente de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 nucleótidos de longitud. En una realización preferida, la región en bucle es de aproximadamente 6 a aproximadamente 9 nucleótidos de longitud. En dicha realización de la invención, la región con sentido y la región antisentido son de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. Después del procesamiento postranscripcional, el ARN en horquilla pequeño se convierte en un ARNip por un acontecimiento de escisión mediado por la enzima Dicer, que es un miembro de la familia de RNasa III. El ARNip es capaz después de inhibir la expresión de un gen con el que comparte homología. Para más detalles, véase Brummelkamp *et al.*, Science 296: 550-553, (2002); Lee *et al.*, Nature Biotechnol., 20, 500-505, (2002); Miyagishi y Taira, Nature Bio-technol 20: 497-500, (2002); Paddison *et al.* Genes & Dev. 16: 948-958, (2002); Paul, Nature Biotechnol, 20, 505-508, (2002); Sui, Proc. Natl. Acad. Sc. USA, 99(6), 5515-5520, (2002); Yu *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 99: 6047-6052, (2002).

La reacción de escisión de ARN diana guiada por ARNip es altamente específica de secuencia. En general, se prefiere ARNip que contiene una secuencia de nucleótidos idéntica a una parte del gen diana (es decir, miR-33 a y/o b) para inhibición. Sin embargo, no se requiere 100 % de identidad de secuencia entre el ARNip y el gen diana para practicar la presente invención. Por lo tanto, la invención tiene la ventaja de poder tolerar variaciones de secuencia que podrían esperarse debido a mutación genética, polimorfismo de cadena o divergencia evolutiva. Por ejemplo, también se ha descubierto que secuencias de ARNip con inserciones, supresiones y mutaciones puntuales en relación con la secuencia diana son eficaces para inhibición. Como alternativa, secuencias de ARNip con sustituciones o inserciones de análogos de nucleótidos pueden ser eficaces para inhibición.

En otra realización más, la secuencia de ácido nucleico que es complementaria de SEQ ID NO. 1 o 2 es un antagonir. Los antagonir son oligonucleótidos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente bicatenarios y con estructura en horquilla químicamente modificados que se dirigen a un microARN. Preferentemente, un antagonir representado en la invención incluye una secuencia de nucleótidos suficientemente complementaria para hibridar con una secuencia

diana de miARN de aproximadamente 12 a 25 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 15 a 23 nucleótidos.

En realizaciones específicas, los antagomir son oligonucleótidos de tipo ARN que albergan diversas modificaciones para protección de RNasa y propiedades farmacológicas tales como captación tisular y celular potenciada. Un antagomir puede diferir de ARN normal por tener 2'-O-metilación completa de azúcar, cadena principal de fosforotioato y un resto de colesterol en el extremo 3'. Las modificaciones de fosforotioato proporcionan protección contra actividad de RNasa y su lipofilia contribuye a captación tisular potenciada. En una realización preferida, el antagomir incluye seis modificaciones de cadena principal de fosforotioato; dos fosforotioatos se localizan en el extremo 5' y cuatro en el extremo 3'. Los antagomir de la presente invención también pueden modificarse con respecto a su longitud, o de otro modo el número de nucleótidos que componen el antagomir. Se prefiere que los antagomir de la presente invención sean de aproximadamente 20-21 nucleótidos de longitud para función óptima, ya que este tamaño coincide con el tamaño de los microARN maduros para miR-33 a y b.

Las secuencias de ácido nucleico para uso de acuerdo con la invención, ARN, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o híbridos de los mismos, pueden aislarse de diversas fuentes, modificarse genéticamente, amplificarse y/o expresarse/generarse de forma recombinante. Las secuencias de ácido nucleico recombinantes pueden aislarse individualmente o clonarse y ensayarse con respecto a una actividad deseada. Puede usarse cualquier sistema de expresión recombinante incluyendo, por ejemplo, sistemas de expresión *in vitro*, bacterianos, fúngicos, de mamífero, levadura, de insectos o de células vegetales.

Pueden insertarse secuencias de ácido nucleico de la invención en vectores de suministro y expresarse a partir de unidades de transcripción dentro de los vectores. Los vectores recombinantes pueden ser plásmidos de ADN o vectores virales. Puede conseguirse generación de la construcción del vector usando cualquier técnica de modificación por ingeniería genética adecuada bien conocida en este campo, incluyendo, sin limitación, las técnicas convencionales de PCR, síntesis de oligonucleótidos, digestión con endonucleasa de restricción, ligamiento, transformación, purificación de plásmidos y secuenciación de ADN, por ejemplo como se describe en Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (1989), Coffin *et al.* (Retroviruses. (1997)) y "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)). Como resultará evidente para un experto en la materia, está disponible diversos vectores adecuados para transferir ácidos nucleicos de la invención a células. La selección de un vector apropiado para suministrar ácidos nucleicos y optimización de las condiciones para inserción del vector de expresión seleccionado a la célula, están dentro del alcance de un experto habitual en la materia sin necesidad de experimentación indebida. Los vectores virales comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene secuencias para la producción de virus recombinante en una célula de empaquetamiento. Pueden construirse vectores virales que expresan ácidos nucleicos de la invención basándose en cadenas principales virales incluyendo, pero sin limitación, un retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociado, virus de la viruela o alfavirus. Los vectores recombinantes capaces de expresar los ácidos nucleicos de la invención pueden suministrarse como se describen en el presente documento, y persisten en células diana (por ejemplo, transformantes estables).

Las secuencias de ácido nucleico para uso de acuerdo con la invención pueden sintetizarse *in vitro* por técnicas de síntesis química bien conocidas, como se describe, por ejemplo, en Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105: 661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19: 373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33: 7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68: 109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22: 1859; patente de Estados Unidos n.º 4.458.066.

Las secuencias de ácido nucleico para uso de acuerdo con la invención pueden estabilizarse contra degradación nucleolítica tal como mediante la incorporación de una modificación, por ejemplo, una modificación de nucleótido. Por ejemplo, secuencias de ácido nucleico de la invención incluyen un fosforotioato en al menos el primer, segundo o tercer enlace internucleotídico en el extremo 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos. Como otro ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede incluir un nucleótido 2' modificado, por ejemplo, un 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetil-aminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE), o 2'-O--N-metilacetamido (2'-O--NMA). Como otro ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede incluir al menos un nucleótido 2'-O-metilo modificado, y en algunas realizaciones, todos los nucleótidos incluyen una modificación 2'-O-metilo. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos están "bloqueados", es decir, comprender análogos de ácido nucleico en los que el anillo de ribosa está "bloqueado" por un enlace de metileno que conecta el átomo 2'-O y el átomo 4'-C (véase, por ejemplo, Kaupinnen *et al.*, Drug Disc. Today 2(3): 287-290 (2005); Koshkin *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 120(50): 13252-13253 (1998)).

Están bien descritas técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos para usos de acuerdo con la invención, tales como, por ejemplo, subclonación, marcaje de sondas (por ejemplo, marcaje de cebador-sonda usando polimerasa de Klenow, translación de muesca, amplificación), secuenciación, hibridación y similares en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, Sambrook, ed., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ª ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Parte I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas y formulaciones que comprenden secuencias de ácido nucleico diseñadas para dirigirse al transportador de casete de unión a ATP ABCA1 para represión de la traducción, aumentando de este modo los niveles de ABCA1, producción de HDL y transporte de colesterol inverso.

Pueden formularse composiciones farmacéuticas con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Pueden administrarse composiciones y formulaciones farmacéuticas por vía parenteral, por vía tópica, por vía oral o por administración local, tal como mediante aerosol o por vía transdérmica. Pueden formularse composiciones farmacéuticas de cualquier manera y pueden administrarse en diversas formas de dosificación unitarias dependiendo de la afección o enfermedad (por ejemplo, tipo de trastorno cardiovascular) y el grado de enfermedad, la condición médica general de cada paciente, el método preferido resultante de administración y similares. Se describen bien en la bibliografía científica y de patentes detalles sobre técnicas para formulación y administración de productos farmacéuticos, véase, por ejemplo, la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co, Easton PA ("Remington's").

Pueden administrarse secuencias de ácido nucleico de la invención solas o como un componente de una formulación farmacéutica (composición). Los compuestos pueden formularse para administración, de cualquier manera conveniente para uso en medicina humana o veterinaria. También pueden estar presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, agentes saporíferos y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para administración intradérmica, por inhalación, oral/nasal, tópica, parenteral, rectal y/o intravaginal. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico de la presente invención) que pueden combinarse con un material vehículo para producir una única forma de dosificación variarán dependiendo del hospedador que se trate, el modo particular de administración, por ejemplo, intradérmica o inhalación. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma de dosificación individual generalmente será la cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico, por ejemplo, una respuesta de linfocitos T o humoral específica de antígeno.

Pueden prepararse formulaciones farmacéuticas de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de productos farmacéuticos. Dichos fármacos pueden contener agentes edulcorantes, agentes saporíferos, agentes colorantes y agentes conservantes. Una formulación puede mezclarse con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para fabricación. Las formulaciones pueden comprender uno o más diluyentes, emulsionantes, conservantes, tampones, excipientes, etc. y pueden proporcionarse en formas tales como líquidos, polvos, emulsiones, polvos liofilizados, pulverizaciones, cremas, lociones, formulaciones de liberación controlada, comprimidos, píldoras, geles, en parches, en implantes, etc.

Las formulaciones farmacéuticas para administración oral pueden formularse usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones apropiadas y adecuadas. Dichos vehículos permiten que los productos farmacéuticos se formulen en formas de dosificación unitaria como comprimidos, píldoras, polvo, grageas, cápsulas, líquidos, pastillas para chupar, geles, jarabes, pastas, suspensiones, etc., adecuadas para la ingesta por el paciente. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden formularse como un excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después añadir compuestos adicionales adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Son excipientes sólidos adecuados cargas de carbohidratos o proteínas incluyendo, por ejemplo, azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa sódica; y gomas incluyendo goma arábica y tragacanto; y proteínas, por ejemplo gelatina y colágeno. Pueden añadirse agentes disgregantes o solubilizantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico, o una sal del mismo, tal como alginato sódico. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener agentes activos mezclados con una carga o aglutinantes tales como lactosa o almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los agentes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido con o sin estabilizadores.

Las suspensiones acuosas pueden contener un agente activo (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico de la invención) en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas, por ejemplo, para inyecciones intradérmicas acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábica, y agentes de dispersión o humectantes tales como un fosfátido de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoacetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol (por ejemplo, polioxietilensorbitol monooleato) o un producto de condensación de óxido de etileno

con un éster parcial derivado de ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, polioxietilensorbitan monooleato). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como etilo o n-propil p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saporíferos y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa, aspartamo o sacarina. Las formulaciones pueden ajustarse para osmolaridad.

5 Pueden usarse productos farmacéuticos basados en aceite para administración de secuencias de ácido nucleico de la invención. Las suspensiones basadas en aceite pueden formularse suspendiendo un agente activo en un aceite vegetal, tal como aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de coco o en un aceite mineral tal como parafina líquida; o una mezcla de estos. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 5.716.928 que describe el uso de aceites esenciales o componentes de aceites esenciales para aumentar la biodisponibilidad y reducir la variabilidad inter o intraindividual de compuestos farmacéuticos hidrófobos administrados por vía oral (véase también patente de Estados Unidos n.º 5.858.401). Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, tal como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes para proporcionar una preparación oral apetitosa, tal como glicerol, sorbitol o sacarosa. Estas formulaciones pueden conservarse por la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico. Como ejemplo de un vehículo oleoso inyectable, véase Minto (1997) J. Pharmacol. Exp. Ther. 281: 93-102.

20 Las formulaciones farmacéuticas también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral, descrito anteriormente, o una mezcla de estos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas de origen natural, tales como goma arábiga y goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural, tales como lecitina de soja, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como sorbitán monooleato, y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como polioxietilén sorbitán monooleato. La emulsión también puede contener agentes edulcorantes y agentes saporíferos, como en la formulación de jarabes y elixires. Dichas formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante o un agente colorante. Como alternativa, estas emulsiones de aceite en agua inyectables pueden comprender un aceite de parafina, un sorbitán monooleato, un sorbitán monooleato etoxilado y/o un sorbitán trioleato etoxilado.

30 Pueden administrarse compuestos farmacéuticos por vías intranasal, intraocular e intravaginal incluyendo supositorios, insuflación, polvos y formulaciones de aerosol (por ejemplo de inhalantes de esteroides, véase por ejemplo, Rohatagi (1995) J. Clin. Pharmacol. 35: 1187-1193; Tjwa (1995) Ann. Allergy Asthma Immunol. 75: 107-111). Pueden prepararse formulaciones en supositorios mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas ordinarias pero líquido a temperaturas corporales y por lo tanto se fundirá en el cuerpo para liberar el fármaco. Dichos materiales son manteca de cacao y polietilenglicoles.

35 Pueden suministrarse compuestos farmacéuticos por vía transdérmica, por una vía tópica, formulados como barras aplicadoras, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, cremas, pomadas, pastas, gelatinas, pinturas, polvos y aerosoles.

40 También pueden suministrarse compuestos farmacéuticos como microesferas para liberación lenta en el cuerpo. Por ejemplo, pueden administrarse microesferas mediante inyección intradérmica de fármaco que se libera lentamente por vía subcutánea; véase Rao (1995) J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 7: 623-645; como formulaciones en gel biodegradables e inyectables, véase, por ejemplo, Gao (1995) Pharm. Res. 12: 857-863 (1995); o como microesferas para administración oral, véase, por ejemplo, Eyles (1997) J. Pharm. Pharmacol. 49: 669-674.

45 Los compuestos farmacéuticos pueden administrarse por vía parenteral, tal como mediante administración intravenosa (IV) o administración en una cavidad corporal o luz de un órgano. Estas formulaciones pueden comprender una solución de agente activo disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Son vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse agua y solución de Ringer, y cloruro sódico isotónico. Además, pueden emplearse aceites fijos estériles como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite fijo insípido incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, pueden usarse de manera similar ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. Estas soluciones son estériles y generalmente están libres de materia indeseable. Estas formulaciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las formulaciones pueden contener sustancias adyuvantes farmacéuticamente aceptables según se requiera para acercarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la toxicidad, por ejemplo, citrato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico y similares. La concentración de agente activo en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará basándose principalmente en volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares, de acuerdo con el medio particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente. Para administración IV, la formulación puede ser una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse usando los agentes de dispersión o humectantes y agentes en suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una suspensión en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como una solución de 1,3-butanodiol. La administración puede ser por embolada o infusión continua (por ejemplo, introducción sustancialmente ininterrumpida en un vaso sanguíneo durante un periodo de tiempo específico).

65 Pueden liofilizarse compuestos farmacéuticos y formulaciones. Puede prepararse una formulación liofilizada estable

que comprende una composición liofilizando una solución que comprende un producto farmacéutico y un agente formador de volumen, por ejemplo, manitol, trehalosa, rafinosa y sacarosa o mezclas de los mismos. Un proceso para preparar una formulación liofilizada estable puede incluir liofilizar una solución de proteína de aproximadamente 2,5 mg/ml, sacarosa aproximadamente 15 mg/ml, NaCl aproximadamente 19 mg/ml y un tampón de citrato sódico que tiene un pH mayor de 5,5 pero menor de 6,5. Véase, por ejemplo, solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20040028670.

Las composiciones y formulaciones pueden suministrarse mediante el uso de liposomas. Usando liposomas, particularmente cuando la superficie del liposoma porta ligandos específicos para células diana, o se dirigen preferentemente de otro modo a un órgano específico, se puede centrar el suministro del agente activo en células diana *in vivo*. Véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos n.º 6.063.400; 6.007.839; Al-Muhammed (1996) J. Microencapsul. 13: 293-306; Chonn (1995) Curr. Opin. Biotechnol. 6: 698-708; Ostro (1989) Am. J. Hosp. Pharm. 46: 1576-1587.

Las formulaciones pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. Para aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones a un sujeto que necesite homeostasis de colesterol en una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones químicas del trastorno o sus complicaciones, por ejemplo, defectos cardiovasculares; esto puede denominarse una cantidad terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, pueden administrarse composiciones farmacéuticas en una cantidad suficiente para aumentar la expresión del casete de unión a ATP, subfamilia A, miembro 1, proteína (ABCA1), aumento de la salida del colesterol intracelular y/o producción de HDL en el hígado y/o reducción de la cantidad de colesterol en circulación en la sangre de un sujeto que necesite homeostasis de colesterol.

La cantidad de composición farmacéutica adecuada para conseguir esto es una dosis terapéuticamente eficaz. El programa de dosificación y cantidades eficaces para este uso, es decir, el régimen de dosificación, dependerán de diversos factores, incluyendo el estadio de la enfermedad o afección, la gravedad de la enfermedad o afección, el estado general de la salud del paciente, el estado físico del paciente, la edad y similares. En el cálculo del régimen de dosificación para un paciente, también se tiene en consideración el modo de administración.

El régimen de dosificación también tiene en consideración parámetros farmacocinéticos bien conocidos en la técnica, es decir, la velocidad de absorción de los agentes activos, biodisponibilidad, metabolismo, eliminación y similares (véase, por ejemplo, Hidalgo-Aragones (1996) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58: 611-617; Groning (1996) Pharmazie 51: 337-341; Fotherby (1996) Contraception 54: 59-69; Johnson (1995) J. Pharm. Sci. 84: 1144-1146; Rohatagi (1995) Pharmazie 50: 610-613; Brophy (1983) Eur. J. Clin. Pharmacol. 24: 103-108; el último Remington, mencionado anteriormente). El estado de la técnica permite que el especialista clínico determine el régimen de dosificación para cada paciente individual, agente activo y enfermedad o afección tratada. Pueden usarse directrices proporcionadas para composiciones similares usadas como productos farmacéuticos como una guía para determinar que el régimen de dosificación, es decir, el programa de dosis y los niveles de dosificación, administrado practicando los métodos de la invención es correcto y apropiado.

Pueden proporcionarse administraciones individuales o múltiples de formulaciones dependiendo de, por ejemplo: la dosificación y frecuencia según se requiera y tolere por el paciente, el grado y cantidad de homeostasis de colesterol generado después de cada administración y similares. Las formulaciones deberían proporcionar una cantidad suficiente de agente activo para tratar, prevenir o aliviar eficazmente afecciones, enfermedades o síntomas, por ejemplo, aumentar la expresión de ABCA1, aumentar la salida de colesterol intracelular y/o producción de HDL en el hígado y/o reducir la cantidad de colesterol en circulación en la sangre de un sujeto que necesite homeostasis de colesterol.

Las formulaciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en una cantidad diaria de entre aproximadamente 1 y 100 o más mg por kilogramo de peso corporal al día. Pueden usarse dosificaciones menores, a diferencia de administración por vía oral, en el torrente sanguíneo, en una cavidad corporal o en una luz de un órgano. Pueden usarse dosificaciones sustancialmente mayores en administración tópica u oral o administrando mediante polvos, pulverización o inhalación. Los métodos reales para preparar formulaciones administrables por vía parenteral o por vía no parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen en más detalle en publicaciones tales como Remington, mencionado anteriormente.

Diversos estudios han presentado dosificación de mamíferos exitosa usando secuencias de ácido nucleico complementarias. Por ejemplo, Esau C., *et al.*, (2006) Cell Metabolism, 3(2): 87-98 presentó dosificación de ratones normales con dosis intraperitoneales de oligonucleótido antisentido miR-122 que variaban de 12,5 a 75 mg/kg dos veces a la semana durante 4 semanas. Los ratones parecían sanos y normales al final del tratamiento, sin pérdida de peso corporal o consumo de alimentos reducido. Los niveles de transaminasa en plasma estuvieron en el intervalo normal (AST $\frac{3}{4}$ 45, ALT $\frac{3}{4}$ 35) para todas las dosis con la excepción de la dosis de 75 mg/kg de miR-122 ASO, que mostró un aumento muy leve en los niveles de ALT y AST. Concluyeron que 50 mg/kg era una dosis eficaz, no tóxica. Otro estudio de Krützfeldt J., *et al.*, (2005) Nature 438, 685-689, inyectó antagonistas para silenciar miR-122 en ratones usando una dosis total de 80, 160 o 240 mg por kg de peso corporal. La dosis mayor dio como resultado una pérdida completa de señal de miR-122. En otro estudio más, se aplicaron con éxito ácidos nucleicos bloqueados ("LNA") en

primates para silenciar miR-122. Elmen J., *et al.*, (2008) Nature 452, 896-899, indican que se consiguió silenciamiento eficaz de miR-122 en primates por tres dosis de 10 mg kg⁻¹ de LNA-anti-miR, lo que condujo a una reducción de larga duración y reversible en el colesterol en plasma total sin ninguna prueba de toxicidades asociadas con LNA o cambios histopatológicos en los animales de estudio.

Los métodos descritos en el presente documento comprenden además coadministración con otros fármacos o productos farmacéuticos, por ejemplo, composiciones para proporcionar homeostasis de colesterol. Por ejemplo, se coadministran composiciones y formulaciones descritas en el presente documento con fármacos para tratar colesterol LDL elevado tales como inhibidores de HMG CoA reductasa, por ejemplo, atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina; secuestrantes de ácido biliar, por ejemplo, colestevlam, colestiramina y colestipol; y ácido nicotínico (niacina).

La presente invención se describe adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos ilustrativos, no limitantes, que proporcionan un mejor entendimiento de la presente invención y de sus muchas ventajas.

Ejemplos

En el presente documento, se describe una serie de estudios *in vitro* e *in vivo* para delinear adicionalmente el papel de miR-33 en el control de la homeostasis de colesterol en cooperación con SREBP. Los siguientes ejemplos se exponen para fines ilustrativos solamente y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención.

Ejemplo 1: dianas predichas de miR-33 en seres humanos y ratones

Entre los enfoques disponibles para la identificación de dianas de ARNm por miARN, se ha mostrado que los estudios de predicción computacionales representan métodos útiles para establecer las primeras etapas hacia la validación experimental de dianas de miARN. El parámetro más crítico que se considera al predecir dianas de miARN es la capacidad de la secuencia de miARN para experimentar formación de pares de bases específicas con su diana afín, conocida como "formación de pares de bases de semilla" (Bartel DP (2004) Cell 116: 281-297; van den Berg A, Mols J, Han J (2008) Biochim Biophys Acta.). Esto implica 7-8 bases del extremo 5' de miARN. En este contexto, entre una lista de más de 100 dianas predichas derivadas de bases de datos de predicción de diana tanto Miranda como TargetScan 4.2 (microna.sanger.ac.uk; www.targetscan.org/vert_42/), la diana conservada más relevante para miR-33 tanto en seres humanos como en ratones es ABCA1 (Tabla 1 y Fig. 7). Resulta interesante que estos estudios revelaron que proteínas originales que se sabe que desempeñan un papel en la red de tráfico de colesterol u homeostasis de lípidos y que se asocian funcionalmente con ABCA1 también pueden actuar como dianas tanto en seres humanos como en ratones. Estas incluyen enfermedad de Niemann-Pick, tipo CI (NPC1) (Tabla 1).

Tabla 1. Dianas de miR-33 humanas predichas por programas de software Miranda y TargetScan 4.2. ABCA1 y NPC1 están destacadas en negrita/subrayadas.

<i>33a humano-Miranda</i>	<i>33b humano-Miranda</i>	<i>33b humano-TargetScan</i>
HADHB	HADHB	<u>ABCA1</u>
CROT	CROT	B3GALT2
<u>ABCA1</u>	<u>ABCA1</u>	CDK6
PXMP2	PXMP2	HMGA2
TAF12	TAF 12	GLCC11
PGM1	PGM1	NUFIP2
LOC727902	LOC727902	ATP8B1
HMX3	RDH8	SLC17A6
PCM1	HMX3	SCN8A
DNAJC12	PCM1	MRPS25
DGKH	DGKH	CUL5
HAGH	HAGH	ZRANB2
ZNF281	ZNF281	NSF
C20orf103	C20orf103	AFF2
MYOCD	MYOCD	ABHD2
CHN2	SLC10A7	VCPIP1
CSMD1	CHN2	MMP16
ICT1	ICT1	ANKRD57
HIPK2	DEPDC6	SLC25A25
CHAC2	HIPK2	KCNA4
SAT1	CHAC2	SATB2
C11orf58	SAT1	DYNC1LI2
<u>NPC1</u>	<u>NPC1</u>	RAP2A
C16orf80	SCN10VA	SLC12A5
FGFBP1	C16orf80	KCNMA1
BTBD2	FGFBP1	SETD7

LAMA3	BMP3	EN2
C6orf213	BTBD2	ERBB2IP
FGF3	LAMA3	ZNF281
MPP1	FGF3	GRIA3
IRX2	MPP1	<u>NPC1</u>

Ejemplo 2: Regulación negativa de ABCA1 por miR-33 en líneas celulares humanas y de ratón

5 Para validar los resultados de los estudios de predicción bioinformáticos, se llevó a cabo un conjunto de experimentos usando líneas celulares humanas y de ratón, incluyendo células de carcinoma hepatocelular HepG2 humanas, fibroblastos humanos primarios IMR-90 y la línea celular de macrófagos de ratón J774, como sistemas modelo. Estas líneas celulares muestran baja expresión de proteína ABCA1 a bajas densidades celulares. Se esperaba que la inhibición de la traducción de ABCA1 por miR-33 contribuyera a este nivel de expresión bajo. Por lo tanto, la desactivación por ARNip de componentes de la ruta de biogénesis de miARN se realizó para determinar si la expresión de proteínas ABCA1 está regulada por miARN. De hecho, la transfección con ARNip dirigida contra las enzimas de procesamiento de miARN Drosha y Dicer dio como resultado un aumento sustancial en la expresión de proteína ABCA1 (especialmente con ARNip de Drosha) en las tres líneas celulares examinadas (Fig. 7A). Estos resultados son coherentes con la regulación de ABCA1 por miARN.

15 Para demostrar que esta regulación positiva resulta específicamente de una falta de procesamiento de miR-33, las tres líneas celulares diferentes se transfectaron con oligonucleótidos anti miR-33a/b (Ambion). Los anti miR son oligonucleótidos antisentido de miARN que bloquean la función de miARN endógena de una manera específica de secuencia por formación de pares de bases. Las transfecciones con anti miR-33a y b dieron como resultado expresión considerablemente mayor de proteína ABCA1 en líneas celulares humanas, así como tras el tratamiento con anti miR-33a de macrófagos de ratón J774 (Fig. 7B).

25 Estos datos indican regulación de la traducción de ARNm de ABCA1 o estabilidad por miR-33 endógeno. Para evaluar adicionalmente el efecto de miR-33 en la expresión de ABCA1, las células se transfectaron con pre-miR-33s sintéticos (Ambion) para aumentar los niveles intracelulares de miR-33a y b, respectivamente. Ya que los niveles de proteína ABCA1 son difíciles de detectar 24 horas después de la siembra de células en placas, los efectos de pre miR-33s se evaluaron 48 horas después de la transfección y después de la siembra en placas. Los experimentos claramente muestran que la expresión de ABCA1 puede reprimirse específicamente por miR-33, especialmente en macrófagos J774 de ratón y los fibroblastos IMR-90 humanos (Fig. 7C).

30 Estudios recientes han mostrado que ABCA1 actúa junto con otro transportador de colesterol, ABCG1, en macrófagos para promover la salida de colesterol eficaz y la biogénesis de HDL (Fig. 5) (Tall AR, *et al.* (2008) Cell Metab 7: 365-375; Wang X, *et al.* (2007) J Clin Invest 117: 2216-2224). De hecho, los datos han indicado que cuando un transportador es deficiente, el otro se induce, lo que sugiere regulación compensatoria (Yvan-Charvet L, *et al.* (2007) J Clin Invest 117: 3900-3908; Ranalletta M, *et al.* (2006) Arterioscler Thromb Vasc Biol 26: 2308-2315). Se investigó por lo tanto si la expresión de ABCG1 está alterada tras cambios en los niveles de ABCA1 después de manipulación de la ruta de miARN y miR-33a. Resulta interesante que no se observó ningún efecto significativo en la expresión de ABCG1 por ARNi de Dicer y Drosha, transfección de anti miR-33a o expresión de pre-miR-33a en la línea celular de macrófagos de ratón J774. Estos hallazgos sugieren que al menos en estas condiciones experimentales preliminares, la expresión de ABCA1 y ABCG1 no están ligadas de forma recíproca en respuesta a manipulaciones de miR-33.

40 Ejemplo 3: Dirección de la 3' UTR de ABCA1 por miR-33

45 Para determinar si miR-33 afecta al ARNm de ABCA1 y/o los niveles de proteína, se expresará pre-miR-33a/b en varias líneas celulares (es decir IMR-90, HepG2 y J774) para aumentar los niveles de miR-33, y se transfectarán oligonucleótidos anti miR-33 para antagonizar miR-33, seguido de análisis de niveles de ARNm de ABCA1 y proteínas por RT-PCR cuantitativa e inmunotransferencia, respectivamente. Se usaron ARNm de actina (qRT-PCR) y proteína tubulina (inmunotransferencia) como controles.

50 Para establecer si miR-33 afecta a los niveles de ABCA1 mediante la dirección de la 3' UTR, se aislaron fragmentos de la 3' UTR de ABCA1 humana y de ratón que albergaba las secuencias diana de miR-33 predichas y se clonaron en el sitio de clonación de 3' UTR de un plásmido indicador de luciferasa (pMIR-REPORT, Ambion). Los indicadores de luciferasa de 3' UTR de ABCA1 resultantes se transfectaron en células HEK293 humanas, en presencia de anti-miR miR-33a/b, precursores u oligonucleótidos de control. Como se muestra en la Fig. 8A, la inserción de un fragmento de la 3' UTR de ABCA1 que alberga los sitios diana de miR-33 predichos en el vector de indicador de luciferasa dio como resultado una reducción significativa en la actividad indicadora en comparación con vector sin inserto, coherente con la presencia de secuencias inhibitoras dentro del fragmento insertado (por ejemplo sitios de reconocimiento de miR-33). Resulta importante que la cotransfección con oligonucleótidos anti-miR complementarios de miR-33a/b humano provocó expresión aumentada del indicador, lo que sugiere que miR-33a/b endógeno se dirige de hecho al fragmento de 3' UTR de ABCA1 en células HEK293 humanas (Fig. 8B). Por el contrario, la cotransfección con oligonucleótidos precursores de miR-33a/b humanos de tipo silvestre (Ambion) provocó represión adicional de la actividad indicadora, mientras que los oligonucleótidos precursores mutados en la región de formación de pares de bases de semilla no

tuvieron ningún efecto, en comparación con oligonucleótidos de control precursores (Fig. 8C). La actividad luciferasa relativa se midió a partir de actividades luciferasa absolutas normalizadas por actividad luciferasa de Renilla. (PC: precursor de microARN no relacionado como un control negativo).

- 5 Juntos, estos datos ofrecen un apoyo importante para la visión de que miR-33a/b inhibe la expresión de ABCA1 humana dirigiéndose a la 3' UTR de ABCA1 para represión de la traducción o degradación de ARNm.

Ejemplo 4: Papel de miR-33 en el tráfico de colesterol de macrófagos en ratones

10 Los SREBP están regulados en un modo de retroalimentación negativo clásico por colesterol (Brown MS, Goldstein JL (1997) Cell 89: 331-340). Se investigó la relevancia biomédica y fisiológica del circuito regulador de colesterol de miR-33/SREBP/ABCA1 usando el modelo de macrófagos J774 de ratón (de la Llera-Moya M, *et al.* (2010, Epub antes de impresión) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.). Se sometieron macrófagos de ratón J774 a tratamiento de colesterol para modulación de la expresión de SREBP de la siguiente manera: se sembraron 150.000 células por pocillo en un formato de placa de 24 pocillos y se trataron con colesterol 10 µg/ml y 25-hidroxicolesterol (Sigma) 1 µg/ml durante 48 horas. Para activar la expresión de SREBP, las células se lavaron después dos veces con PBS y el medio se reemplazó por DMEM que contenía FBS con lípidos agotados 10 %, (2-hidroxipropil)-β-ciclodextrina (Sigma) 5 mM y lovastatina (Mevinolin, Sigma) 50 µM y se recogió en los puntos temporales indicados. Se recogieron células tanto tratadas con colesterol como con colesterol agotado en los mismos puntos temporales. El agotamiento de colesterol por tratamiento con lovastatina/β-ciclodextrina dio como resultado expresión aumentada tanto de miR-33a como del gen hospedador mSREBP-2 en macrófagos J774, con una reducción conjunta de la expresión de proteína ABCA1 (Fig. 9A-C). La supresión fuerte de niveles de proteína ABCA1 en respuesta a agotamiento de colesterol se invirtió al menos parcialmente por oligonucleótidos antisentido de miR-33a (Fig. 9D), de forma coherente con la noción de que miR-33 media en el control postranscripcional regulado por colesterol de los niveles de ABCA1 en macrófagos de ratón. Los altos niveles de proteína de ABCA1 observados en macrófagos J774 cultivados en presencia de suero/colesterol se suprimieron sustancialmente por precursor de miR-33a adicional (Fig. 9E), de conformidad con la regulación de miR-33 de ABCA1. Este mecanismo mediado por miARN de regulación de ABCA1 por colesterol es además del control de la transcripción descrito previamente de la expresión de ABCA1 por oxisteroles mediante el receptor X de hígado (LXR) (Tontonoz P, Mangelsdorf D, (2003) Mol. Endocrinol. 17: 985), lo que indica múltiples niveles de regulación celular de ABCA1 por colesterol. En consecuencia, miR-33a de ratón y el gen de hospedador de SREBP-2 están corregulados por colesterol, y sugieren la existencia de una red reguladora recíproca de SREBP, miR-33, ABCA1 y colesterol en macrófagos.

35 A continuación, se examinaron los efectos de manipulaciones de miR-33 en la salida de colesterol de macrófagos J774. Las células se enmarcaron en primer lugar con [3H]-colesterol y después se transfectaron con precursor de miR-33a, antisentido de miR-33a u oligonucleótidos de control, seguido de mediciones del nivel de salida de [3H]-colesterol a suero/apoA-1. Brevemente, se transfectaron células J774 de pase bajo por anti-miR o doble cadena de pre-microARN y se sembraron en placas de 24 pocillos a 300.000 células/pocillo y se añadió [3H]-colesterol. Después de 20 horas de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS a temperatura ambiente y el medio se reemplazó por medio nuevo que contenía 15 µg/ml de apoA-I libre. Después de 2 o 4 horas, se retiraron alícuotas del medio, y se midió el [3H]-colesterol mediante recuento de centelleo líquido. El [3H]-colesterol presente en las células se determinó extrayendo las células en hidróxido sódico y se midió seguido de recuento de centelleo líquido. Como se muestra en la Fig. 9F, la introducción de oligonucleótidos antisentido de miR-33a (A) en macrófagos de ratón provocó un aumento notable (doble) de la salida de [3H]-colesterol, mientras que el tratamiento con precursor de miR-33a (P) condujo a una reducción significativa en la salida de [3H]-colesterol, en comparación con oligonucleótidos de control (AC/PC) o células transfectadas con simulación (UT). Estos hallazgos demuestran que la represión postranscripcional de miR-33 de ABCA1 da como resultado conservación de colesterol intracelular en macrófagos, y es coherente con la regulación por miR-33 del tráfico de colesterol mediante control de los niveles de ABCA1.

- 50 Ejemplo 5: Manipulación de los niveles de ABCA1 mediante antisentido miR-33 en un modelo *in vivo* de mamífero

La manipulación de los niveles de ABCA1 por enfoques de antisentido de miR-33 también conduce a niveles de colesterol HDL aumentados en un modelo *in vivo* de mamífero. Se realizaron inyecciones en la vena de la cola en ratones alimentados con una dieta de tipo occidental (es decir, complementados con 42 % de kcal de grasa láctea) durante 6 semanas antes de y durante el tratamiento usando PBS (vehículo), antisentido de LNA-miR-33a u oligonucleótidos de control-LNA. Se obtuvo sangre mediante sangrado submandibular de los ratones experimentales para el perfil de colesterol/triglicéridos antes del comienzo del tratamiento. Para realizar las inyecciones, se disolvieron 20 mg/kg/día de miR-33-LNA o control-LNA en PBS (un volumen total de 200 µl) y se administraron durante tres días consecutivos a través de inyecciones en la vena de la cola diarias en el mismo momento cada día. Los ratones se sacrificaron 48 horas después de la última inyección en la vena de la cola. Después de inyecciones durante 5 días, los ratones se sacrificaron y se recogió el suero de la siguiente manera. Tras el sacrificio, se obtuvo un total de 1 ml de sangre de ratones por punción ventricular derecha. Se centrifugó la sangre a 8.000 rpm durante 5 minutos para obtener suero y se congelaron a -80 °C. Se determinó el colesterol, los triglicéridos, la glucosa, la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) en suero total antes y después del tratamiento con miR-33-LNA o control-LNA mediante un analizador químico Heska Dri-Chem 4000 (Heska, Loveland, CO) en el Hospital General de Massachusetts, centro para medicina comparativa, laboratorio de diagnóstico. Se llevó a cabo

análisis por FPLC de suero agrupado como se ha descrito (Hyogo H, *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277: 34117). Las concentraciones de colesterol HDL en plasma aumentaron significativamente en animales tratados con LNA-antisentido de miR-33a en comparación con ratones tratados con control-LNA (Fig. 10A, B y Tabla 2). Por el contrario, no hubo ningún efecto significativo en las concentraciones en plasma de colesterol LDL, triglicéridos o niveles de glucosa (Fig. 10B-D y Tabla 2). En estos experimentos, tampoco hubo ninguna hepatotoxicidad aparente (AST/ALT en plasma) (Fig. 10E, F y Tabla 2). La elevación observada en HDL en plasma -colesterol en respuesta a tratamiento con antisentido de LNA-miR-33a es coherente con la regulación de la salida de colesterol dependiente de ABCA1 por miR-33a *in vivo*.

Estos resultados confirman adicionalmente que la familia de SREBP de mamífero de factores de transcripción, reguladores clave de genes colesterogénicos y lipogénicos, son hospedadores para miARN conservados (miR-33a/b) que actúan en concierto con los productos génicos de hospedador de SREBP para gobernar los niveles de colesterol intracelular y homeostasis de colesterol en vertebrados. La Fig. 10G representa un modelo para regulación coordinada de homeostasis de colesterol por miR-33 y su producto génico hospedador SREBP. miR-33 reprime la traducción de ABCA1 dirigiéndose a su 3' UTR. Esta etapa está coordinada con la expresión de SREBP, que activa la biosíntesis de colesterol y captación mediante transactivación de genes colesterogénicos. La acumulación de colesterol inhibe la ruta de SREBP, y activa la expresión de ABCA1, que se trasloca a la membrana celular y media en la salida de colesterol a apoA-I y HDL.

Tabla 2

n	Tratamiento	Colesterol [mg/dl]		triglicéridos [mg/dl]		Glucosa [mg/dl]		ALT [UI/l]		AST [UI/l]	
		antes	después	antes	después	antes	después	antes	después	antes	después
1	PBS	163,5	167	211	211	159	318	17	68	58	101
2	PBS	239,5	209	372	195	193	333	16	33	39	27
3	PBS	190,5	220	141	256	226	329	37	10	35	135
4	PBS	230	222	257	171	186	378	14	25	44	289
5	PBS	189,5	205	263	161	201	282	52	14	39	135
1	LNA	243	325	-	249	236	214	26	17	60	67
2	LNA	188	204	329	193	216	421	46	61	37	209
3	LNA	234,5	264	278	283	264	264	44	23	68	44
4	LNA	239	247	486	204	218	391	35	35	63	33
5	LNA	215,5	280	289	133	158	230	28	33	153	229
1	LC	206	157	-	308	224	275	72	26	128	142
2	LC	214,5	224	243	241	390	365	21	22	30	71
3	LC	180	223	384	134	160	233	18	22	54	150
4	LC	201	206	197	167	233	416	26	15	67	46
5	LC	210	186	238	373	286	299	47	17	68	52

Tabla 2. Tratamiento de ratones con una dieta de tipo occidental con ácido nucleico bloqueado (LNA)-antisentido de miR-33a. Se midieron colesterol en suero total (A), triglicéridos en plasma (B), glucosa (C), AST (D) y ALT (E) en ratones alimentados con una dieta de tipo occidental antes y después de la inyección con PBS (vehículo), oligonucleótidos antisentido-LNA dirigidos contra miR-33a de ratón y oligonucleótidos de control de LNA mezclados (LC).

Como se representa en estos ejemplos, miembros de la familia de SREBP de mamífero de factores de transcripción, reguladores clave de genes colesterogénicos y lipogénicos, son hospedadores de miARN conservados (miR-33a/b) que actúan en concierto con los productos génicos hospedadores de SREBP para gobernar los niveles de colesterol intracelular y homeostasis de colesterol en vertebrados. miR-33 ejerce control postranscripcional del transportador de colesterol ABCA1, con importantes consecuencias para el tráfico de colesterol *in vitro* y síntesis de HDL *in vivo*.

Ejemplo predictivo 6: Dirección de NPC1 por miR-33

La proteína de Niemann-Pick de tipo CI (NPC 1) desempeña un papel importante en la movilización de colesterol/lípidos de endosomas/lisosomas tardíos, a través de la red de trans-Golgi (TGN) a la membrana plasmática. Se cree que este proceso está coordinado con la movilización de fosfolípidos y colesterol a apoA-I y otras apolipoproteínas en la superficie celular mediada por ABCA1 para generar HDL naciente. La 3' UTR de NPC1 alberga un sitio diana de miR-33 predicho (7 unidades; TargetScan 4.2). Debido a su papel conocido en el tráfico de colesterol intracelular y la reciente relación funcional con ABCA1 y la salida del colesterol, es una diana candidata para el miR-33.

En primer lugar, se determinará si miARN controlan los niveles de NPC1 en las tres líneas celulares descritas anteriormente mediante el uso de ARNip que se dirige a las enzimas de procesamiento de miARN Droscha y Dicer. En segundo lugar, se introducirán oligonucleótidos Pre-miR-33 y Anti-miR-33 en estas líneas celulares para abordar el papel específico de miR-33 en la regulación de NPC1. Los niveles de proteína NPC1 se determinarán por inmunotransferencia, con β -tubulina como control. Se evaluará cualquier efecto de manipulaciones de miR-33 en los niveles de ARN de NPC1 mediante qRT-PCR. Si se observan efectos en los niveles de proteína NPC1 y/o ARNm después de manipulaciones de miR-33, la 3' UTR de NPC1 que alberga la secuencia de dirección a miR-33 predicha se clonará en el vector pMIR-REPORT, seguido de mutación en el sitio diana de miR-33 y análisis de expresión de luciferasa como se ha descrito anteriormente en el presente documento para ABCA1. Para establecer el papel potencial de NPC1 en el tráfico/flujo de salida del colesterol, se examinarán los efectos de la dirección de ARNip de NPC1 en la línea celular de macrófagos de ratón J774 en la salida del colesterol usando los métodos descritos anteriormente para ABCA1.

Referencias

1. Maxfield FR, Tabas I (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438: 612-621.
2. Moller DE, Kaufman KD (2005) Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med* 56: 45-62.
3. Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J (2007) SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Curr Opin Cell Biol* 19: 215-222.
4. Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331-340.
5. Eberle D, *et al.* (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86: 839-848.
6. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109: 1125-1131.
7. Raghow R, *et al.* (2008) SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 19: 65-73.
8. Ericsson J, Edwards PA (1998) CBP is required for sterol-regulated and sterol regulatory element-binding protein-regulated transcription. *J Biol Chem* 273: 17865-17870.
9. Naar AM, *et al.* (1998) Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev.* 12: 3020-3031.
10. Naar AM, *et al.* (1999) Composite coactivator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. *Nature* 398: 828-832.
11. Naar AM, Lemon BD, Tjian R (2001) Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem* 70: 475-501.
12. Naar AM, *et al.* (2002) Human CRSP interacts with RNA polymerase II CTD and adopts a specific CTD-bound conformation. *Genes Dev* 16: 1339-1344.
13. Oliner JD AJ, Hansen SK, Zhou S, Tjian R. (1996) SREBP transcriptional activity is mediated through an interaction with the CREB-binding protein. *Genes Dev* 10: 2903-2911.
14. Taatjes DJ, *et al.* (2002) Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science* 295: 1058-1062.
15. Yang F, *et al.* (2006) An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis. *Nature* 442: 700-704.
16. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297.
17. He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5: 522-531.
18. Krutzfeldt J, Stoffel M (2006) MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab* 4: 9-12.
19. Lewis BP, *et al.* (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115: 787-798.
20. Lee YS, Dutta A (2008) MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Pathol.*
21. Mattes J, Collison A, Foster PS (2008) Emerging role of microRNAs in disease pathogenesis and strategies for therapeutic modulation. *Curr Opin Mol Ther* 10: 150-157.
22. Thum T, Catalucci D, Bauersachs J (2008) MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res* 79: 562-570.
23. Stefani G, Slack FJ (2008) Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 219-230.
24. Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A (2008) MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol* 18: 131-140.
25. van den Berg A, Mols J, Han J (2008) RISC-target interaction: Cleavage and translational suppression. *Biochim*

Biophys Acta.

26. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318: 1931-1934.
27. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-858.
- 5 28. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14: 1902-1910.
29. Elmen J, *et al.* (2008) LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452: 896-899.
30. Elmen J, *et al.* (2008) Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res* 36: 1153-1162.
- 10 31. Esau C, *et al.* (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 3: 87-98.
32. Krutzfeldt J, *et al.* (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438: 685-689.
33. Tall AR, *et al.* (2008) HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab* 7: 365-375.
- 15 34. Wang X, Rader DJ (2007) Molecular regulation of macrophage reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol* 22: 368-372.
35. Singaraja RR, *et al.* (2002) Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J Clin Invest* 110: 35-42.
36. Wang X, *et al.* (2007) Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* 117: 2216-2224.
- 20 37. Van Eck M, *et al.* (2006) Macrophage ATP-binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 929-934.
38. van Eck M, *et al.* (2002) Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6298-6303.
- 25 39. Koldamova R, Lefterov I (2007) Role of LXR and ABCA1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease - implications for a new therapeutic approach. *Curr Alzheimer Res* 4: 171-178.
40. Wahrle SE, *et al.* (2008) Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 118: 671-682.
- 30 41. Brunham LR, Kruit JK, Verchere CB, Hayden MR (2008) Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 118: 403-408.
42. Chawla A, *et al.* (2001) A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7: 161-171.
- 35 43. Venkateswaran A, *et al.* (2000) Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12097-12102.
44. Chisholm JW, Hong J, Mills SA, Lawn RM (2003) The LXR ligand T0901317 induces severe lipogenesis in the db/db diabetic mouse. *J Lipid Res* 44: 2039-2048.
45. Millatt LJ, Bocher V, Fruchart JC, Staels B (2003) Liver X receptors and the control of cholesterol homeostasis: potential therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1631: 107-118.
- 40 46. Schmitz G, Langmann T (2005) Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta* 1735: 1-19.
47. Tamehiro N, *et al.* (2007) Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J Biol Chem* 282: 21090-21099.
- 45 48. Wong J, Quinn CM, Brown AJ (2006) SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochem J* 400: 485-491.
49. Zeng L, *et al.* (2004) Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism. *J Biol Chem* 279: 48801-48807.
- 50 50. Haidar B, *et al.* (2002) cAMP induces ABCA1 phosphorylation activity and promotes cholesterol efflux from fibroblasts. *J Lipid Res* 43: 2087-2094.
51. Véase RH, *et al.* (2002) Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux. *J Biol Chem* 277: 41835-41842.
- 55 52. Lu R, *et al.* (2008) ApoA-I facilitates ABCA1 recycle/accumulation to cell surface by inhibiting its intracellular degradation and increases HDL generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1820-1824.
53. Taylor AJ (2008) Evidence to support aggressive management of high-density lipoprotein cholesterol: implications of recent imaging trials. *Am J Cardiol* 101: 36B-43B.
54. Yan-Charvet L, *et al.* (2007) Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 117: 3900-3908.
- 60 55. Ranalletta M, *et al.* (2006) Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with *Abcg1*^{-/-} bone marrow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2308-2315.
56. deGoma EM, deGoma RL, Rader DJ (2008) Beyond high-density lipoprotein cholesterol levels evaluating high-density lipoprotein function as influenced by novel therapeutic approaches. *J Am Coll Cardiol* 51: 2199-2211.
57. Neufeld EB, *et al.* (2004) The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease. *J Biol Chem* 279: 15571-15578.
- 65 58. Wang MD, *et al.* (2007) Differential regulation of ATP binding cassette protein A1 expression and ApoA-1

lipidation by Niemann-Pick type C1 in murine hepatocytes and macrophages. *J Biol Chem* 282: 22525-22533.

59. Boadu E, Francis GA (2006) The role of vesicular transport in ABCA1-dependent lipid efflux and its connection with NPC pathways. *J Mol Med* 84: 266-275.

60. Baek D, *et al.* (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455: 64-71.

5 61. Baskerville S, Bartel DP (2005) Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miARNs and host genes. *Rna* 11: 241-247.

62. Fougère F, Ferre P (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* 366: 377-391.

10 63. Foretz M, *et al.* (1999) ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol* 19: 3760-3768.

64. Radhakrishnan A, *et al.* (2007) Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6511-6518.

65. Repa JJ, *et al.* (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRBeta. *Genes Dev* 14: 2819-2830.

15 66. Hannah VC, *et al.* (2001) Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem* 276: 4365-4372.

67. Ou J, *et al.* (2001) Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6027-6032.

20 68. Sheng Z, Otani H, Brown MS, Goldstein JL (1995) Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 935-938.

69. Akinc A, *et al.* (2008) A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol* 26: 561-569.

70. de la Llera-Moya M, *et al.* (2010, Epub antes de impresión) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*

25 72. Tontonoz P, Mangelsdorf D, (2003) *Mol. Endocrinol.* 17:985.

71. Hyogo H, Roy S, Paigen B, Cohen D, (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 34117.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> The General Hospital Corporation
- <120> Uso de microARN MIR-33 en el tratamiento de trastornos relacionados con colesterol
- <130> 00786-0686WO1
- 35 <150> US 61/165,041
- <151> 31-03-2009
- <160> 20
- 40 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 21
- 45 <212> ARN
- <213> MiR-33 a humano
- <400> 1
- gugcauugua guugcauugc a 21
- 50 <210> 2
- <211> 20
- <212> ARN
- <213> miR-33 b humano
- 55 <400> 2
- gugcauugcu guugcauugc 20
- <210> 3
- <211> 21
- <212> ARN
- 60 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido anti-miR-33a

ES 2 610 622 T3

<400> 3
 ugcaaugcaa cuacaaugca c 21

5 <210> 4
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-33b

<400> 4
 gcaaugcaac agcaaugcac 20

15 <210> 5
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Fragmento de gen de ABCA1 humano

<400> 5
 tattcaatgc aatgcaatc aatgcaatga aaacaaaat 39

25 <210> 6
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Antisentido de Micro ARN 33a humano

<400> 6
 caaugcaacu acaaugcac 19

35 <210> 7
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Micro ARN 33a humano

<400> 7
 gugcauugua guugcauug 19

45 <210> 8
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Antisentido de Micro ARN 33b humano

<400> 8
 ugcaaugcaa cagcaaugcu c 21

55 <210> 9
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Micro ARN 33b humano

60 <400> 9
 gugcauugcu guugcauugc a 21

ES 2 610 622 T3

<210> 10
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Forma mutante de Micro ARN 33a humano
 <400> 10
 guuccuugua guugcauug 19
 10
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Forma mutante de Micro ARN 33b humano
 <400> 11
 guuccuugcu guugcauugc a 21
 20
 <210> 12
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Fragmento de gen de SREBP-1 humano
 <400> 12
 g c g g g c g g g c c c c g g g t g c a t t g c t g t t g c a t t g c a c g t g t g t g a g g c g g g t g c a g t g c c 60
 t c g g c a g t g c a g c c c c g g a g c c g g c c c c t g g c a c c a c 96
 30
 <210> 13
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Fragmento de gen de SREBP-2 humano
 <400> 13
 c t g t g g t g c a t t g t a g t t g c a t t g c a t g t t c t g g t g g t a c c c a t g c a a t g t t t c c a c a g t 60
 g c a t c a c a g 69
 40
 <210> 14
 <211> 69
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Fragmento de gen de SREBF-2 humano
 <400> 14
 c u g u g g u g c a u u g u a g u u g c a u g c a u g u u c u g g u g g u a c c c a u g c a a u g u u u c c a c a g u 60
 g c a u c a c a g 69
 50
 <210> 15
 <211> 69
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <210> 15
 <211> 69
 <212> ARN

ES 2 610 622 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento de gen de SREBF-2 de ratón

5 <400> 15

cuguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggcaauac cugugcaaug uuuccacagu 60
gcaucacgg 69

10 <210> 16
<211> 69
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Fragmento de gen de SREBF-2 de pollo

<400> 16

20 **cuguagugca uuguaguugc auugcaugug cuggcaguuaa cugugcaaug uuccugcagu 60**
gcaguaacag 69

25 <210> 17
<211> 68
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento de gen de SREBF-1 de rana potencial

30 <400> 17

cuguggugca uuguaguugc auugcaugug auaucagcgg ugugcaaugu gccugcagug 60
caacacag 68

35 <210> 18
<211> 99
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento de gen de SREBF-2 de D. Melanogaster

40 <400> 18

cucuuccucu ggagaugaca cgaaggugca uuguagucgc auugucuguc ccaauugcuu 60
caggcaauac aacuucagug caagcucugu gcuuuucac 99

45 <210> 19
<211> 96
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Fragmento de gen de SREBF-1 humano

<400> 19

55 **gcgggcggcc ccgcggugca uugcuguugc auugcacgug ugugaggcgg gugcagugcc 60**
ucggcagugc agccccgagc cggccccugg caccac 96

<210> 20
<211> 69

ES 2 610 622 T3

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Fragmento de gen de SREBF-2 de rana

<400> 20

ccuggugca uuguuguugc auugcauguc accuuggacg uugugcaaug uuucuucagu 60
gcaguaugg 69

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ácido nucleico que es complementario de las SEQ ID NO. 1 o 2, para uso en el tratamiento terapéutico de un sujeto que necesite homeostasis de colesterol reduciendo la cantidad de colesterol en circulación en la sangre del sujeto; o aumentando la salida de colesterol intracelular y/o la producción de HDL en el hígado del sujeto.
2. Un ácido nucleico que es complementario de las SEQ ID NO. 1 o 2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto que necesita homeostasis de colesterol tiene un defecto cardiovascular.
- 10 3. Un ácido nucleico que es complementario de las SEQ ID NO. 1 o 2 para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el uso aumenta la expresión de la proteína de casete de unión a ATP, subfamilia A, miembro 1, (ABCA1) en el sujeto.
- 15 4. Un ácido nucleico que es complementario de las SEQ ID NO. 1 o 2 para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el ácido nucleico es la SEQ ID NO. 3.
5. Un ácido nucleico que es complementario de las SEQ ID NO. 1 o 2 para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el ácido nucleico es la SEQ ID NO. 4.
- 20 6. Un ácido nucleico que es complementario de las SEQ ID NO. 1 o 2 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, que es un antagomir.
7. Un ácido nucleico que es complementario de las SEQ ID NO. 1 o 2 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, que es un oligonucleótido antisentido.
- 25 8. Un ácido nucleico que es complementario de las SEQ ID NO. 1 o 2 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, que incluye al menos un nucleótido modificado con 2'-O-metilo.
- 30 9. Un ácido nucleico que es complementario de las SEQ ID NO. 1 o 2 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, que es un ARN de interferencia pequeño (ARNip) o un ARN en horquilla pequeño.
10. Un ácido nucleico que es complementario de las SEQ ID NO. 1 o 2 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, en donde el ácido nucleico puede inhibir el procesamiento postranscripcional de la SEQ ID NO. 1.
- 35 11. Un ácido nucleico que es complementario de las SEQ ID NO. 1 o 2 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, en donde el ácido nucleico puede inhibir el procesamiento postranscripcional de la SEQ ID NO. 2.

FIGURA 1

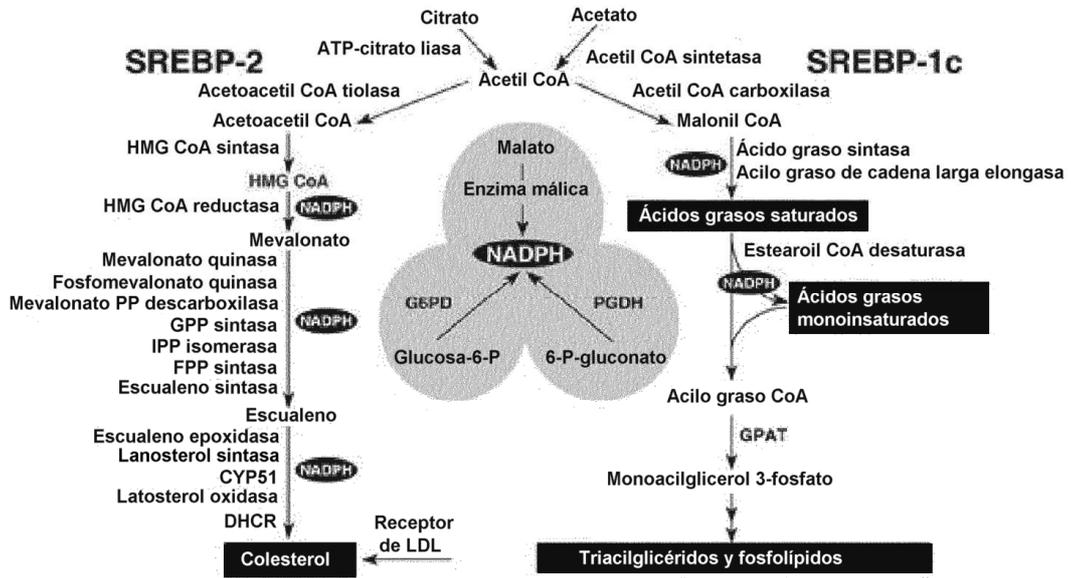


FIGURA 2

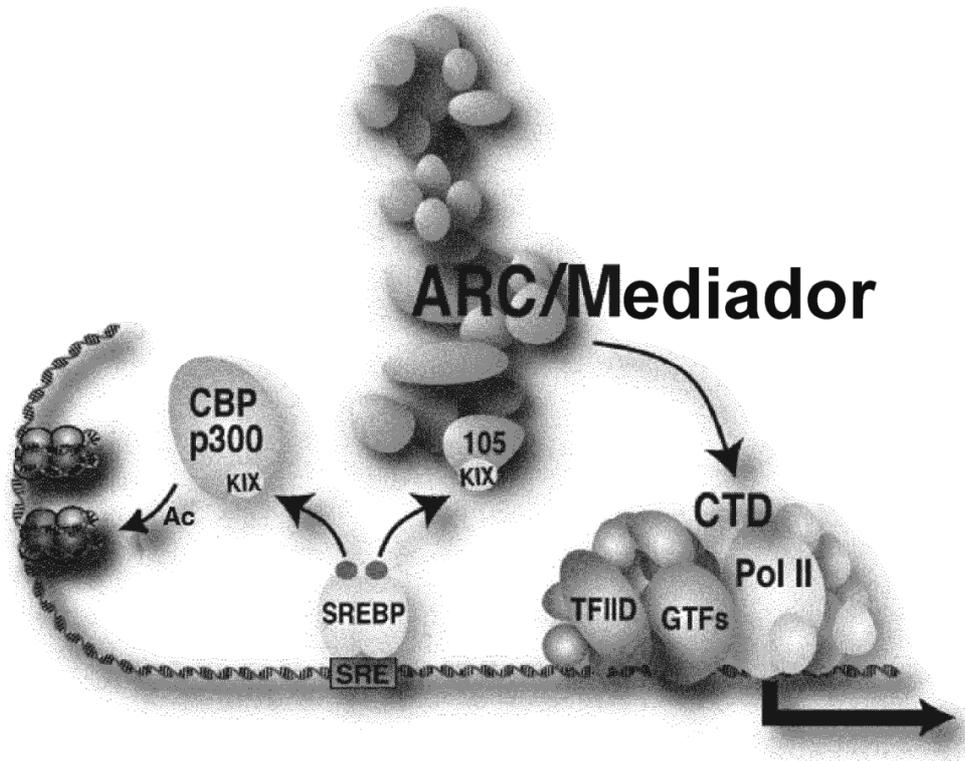


FIGURA 3

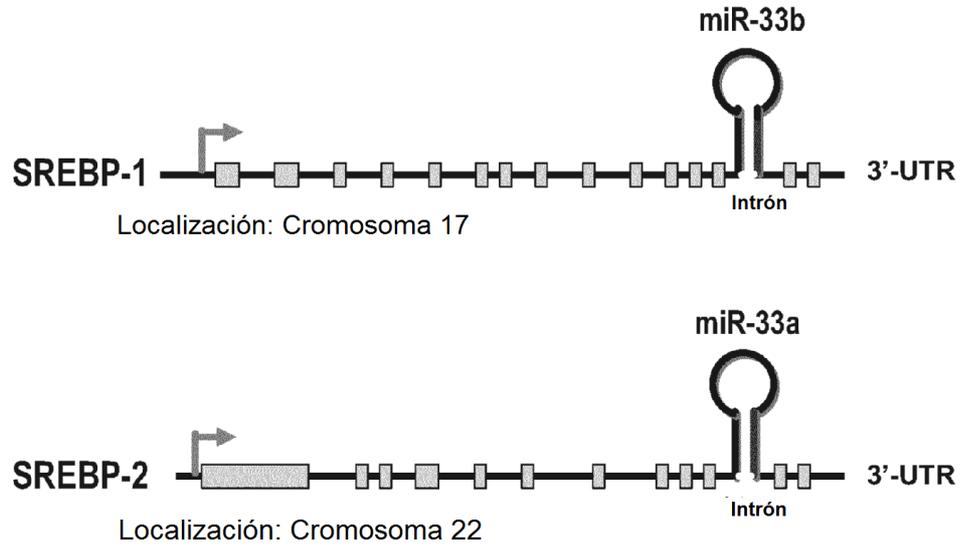


FIGURA 4

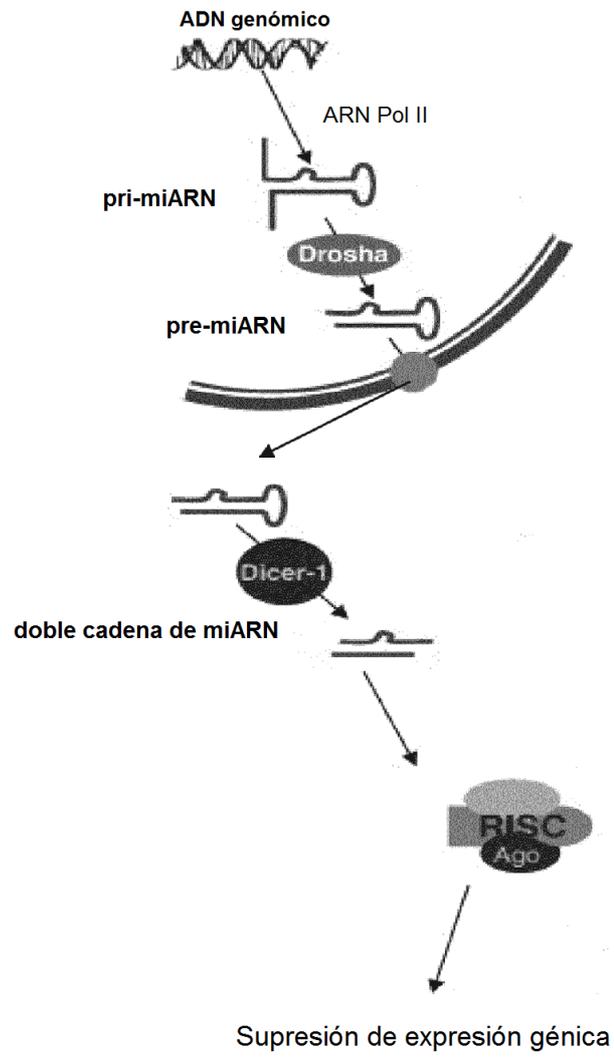


FIGURA 5

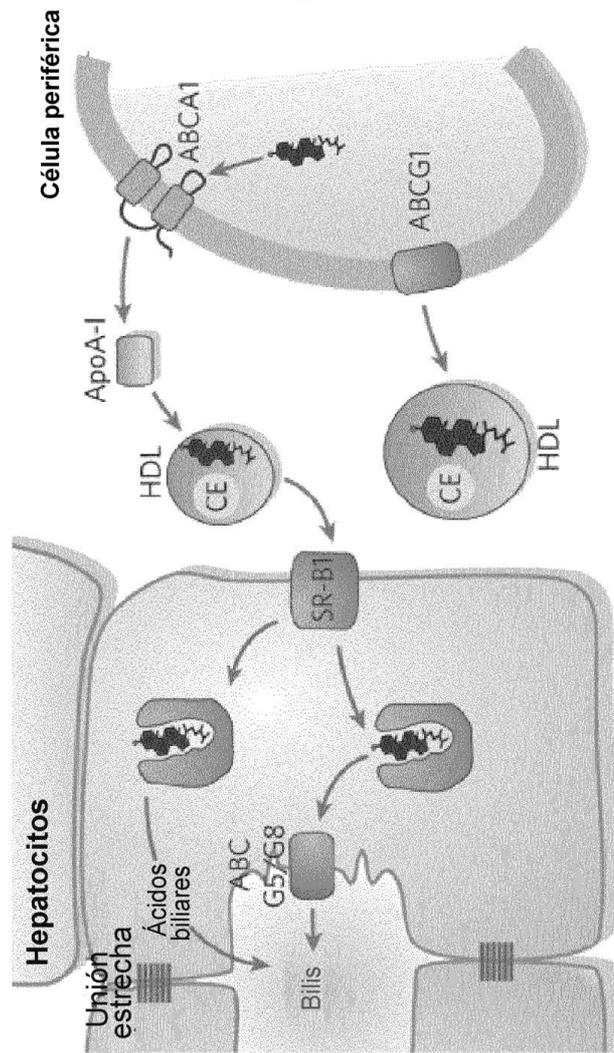


FIGURA 6

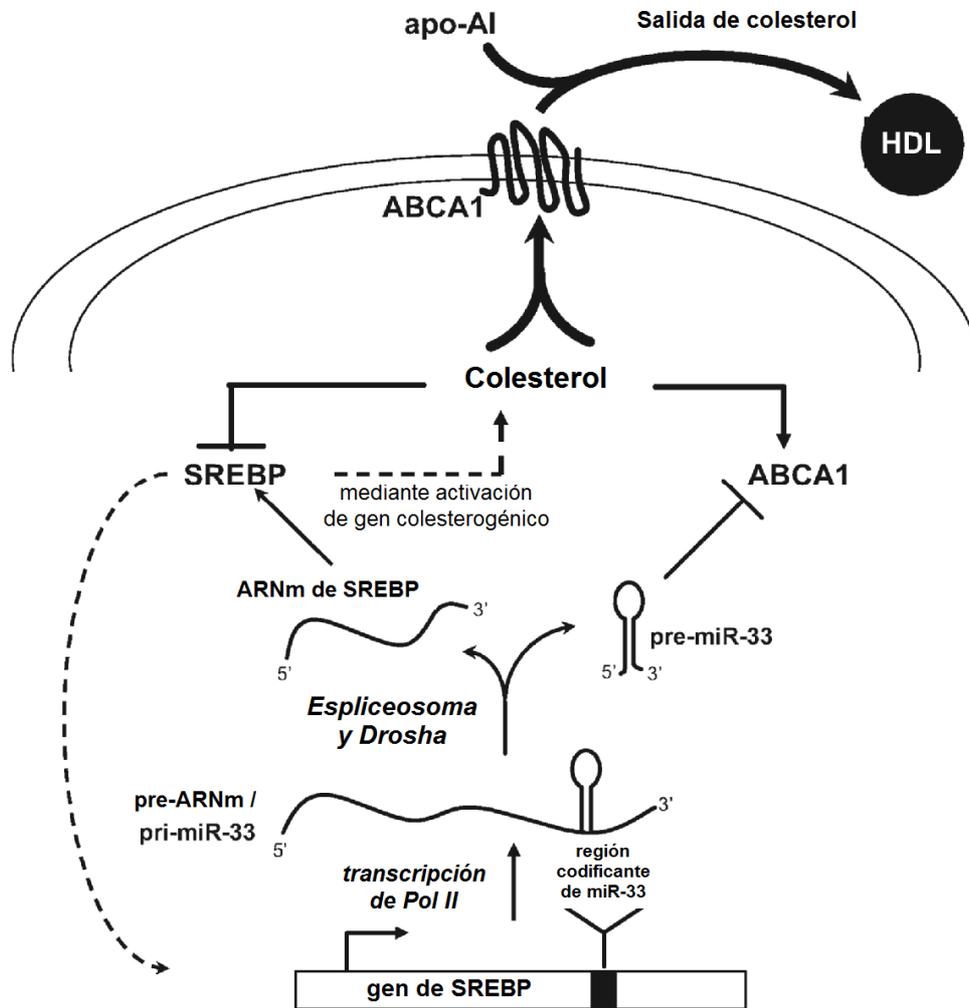


FIGURA 7A

Biogenesis de microARN

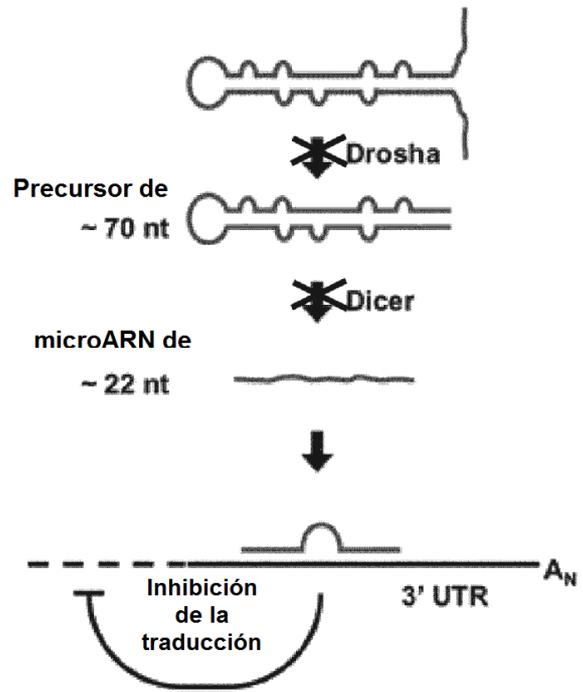
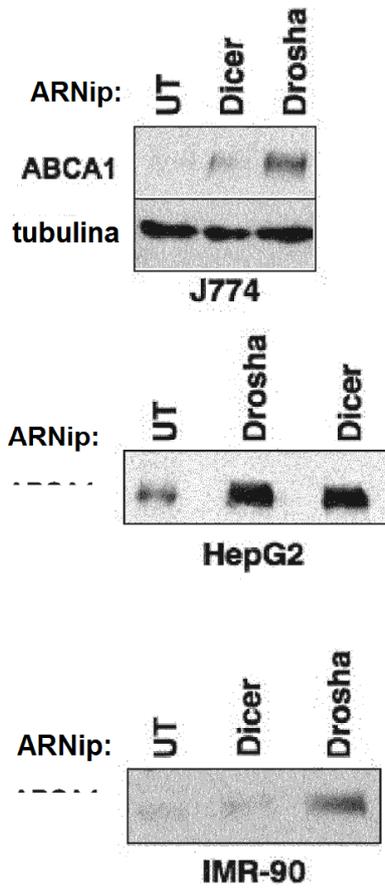


FIGURA 7B

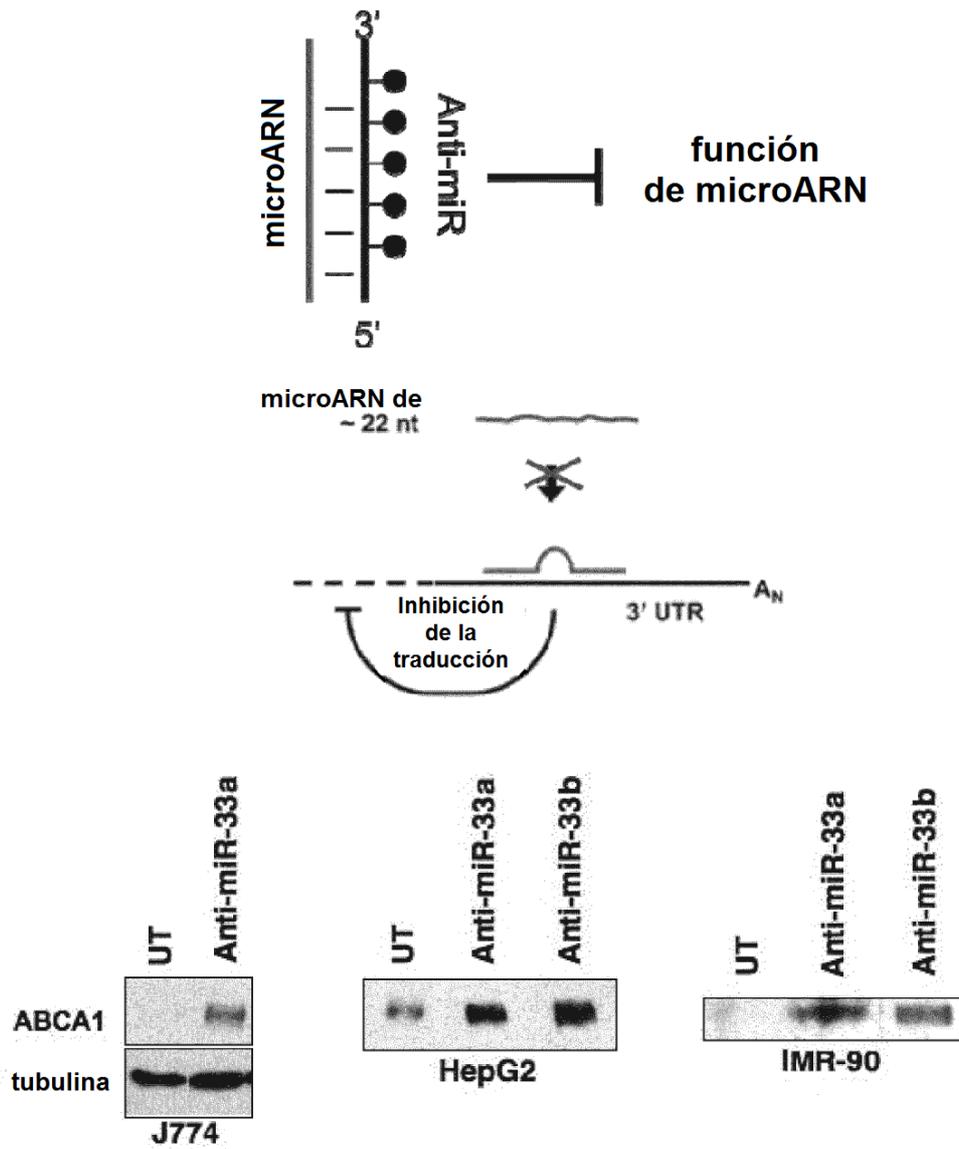
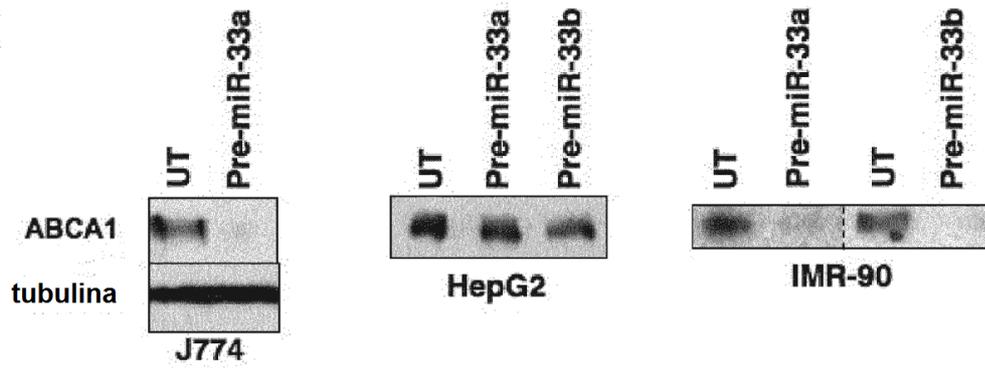
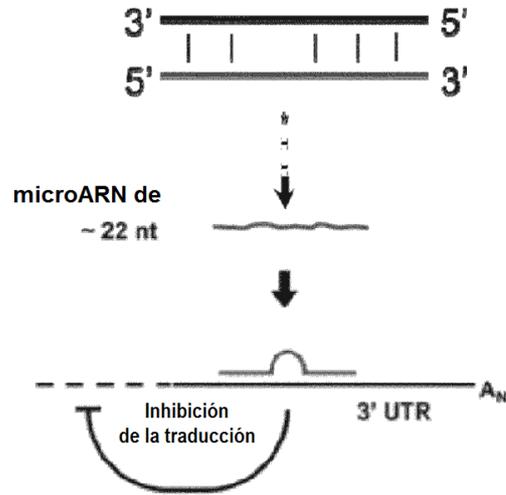


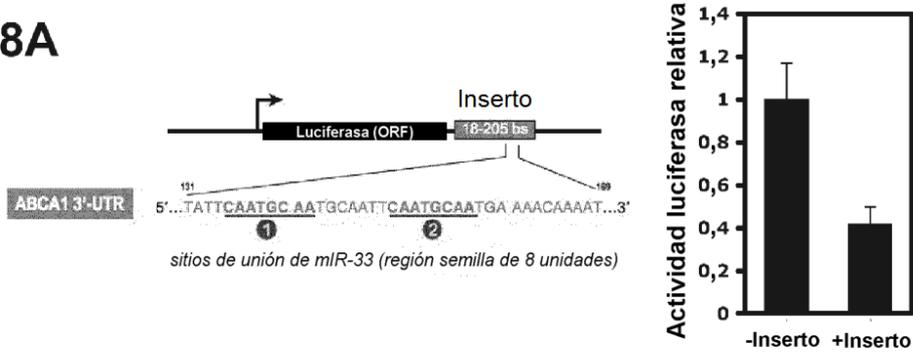
FIGURA 7C

Precursor de microARN

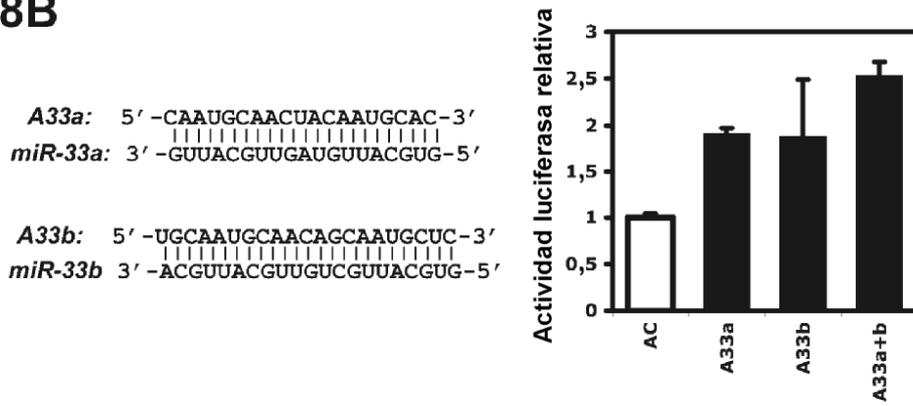


FIGURAS 8A-C

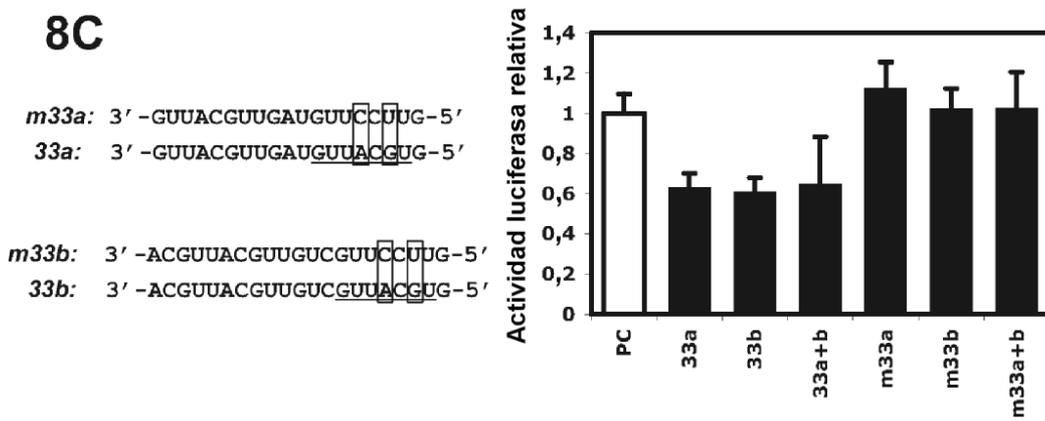
8A



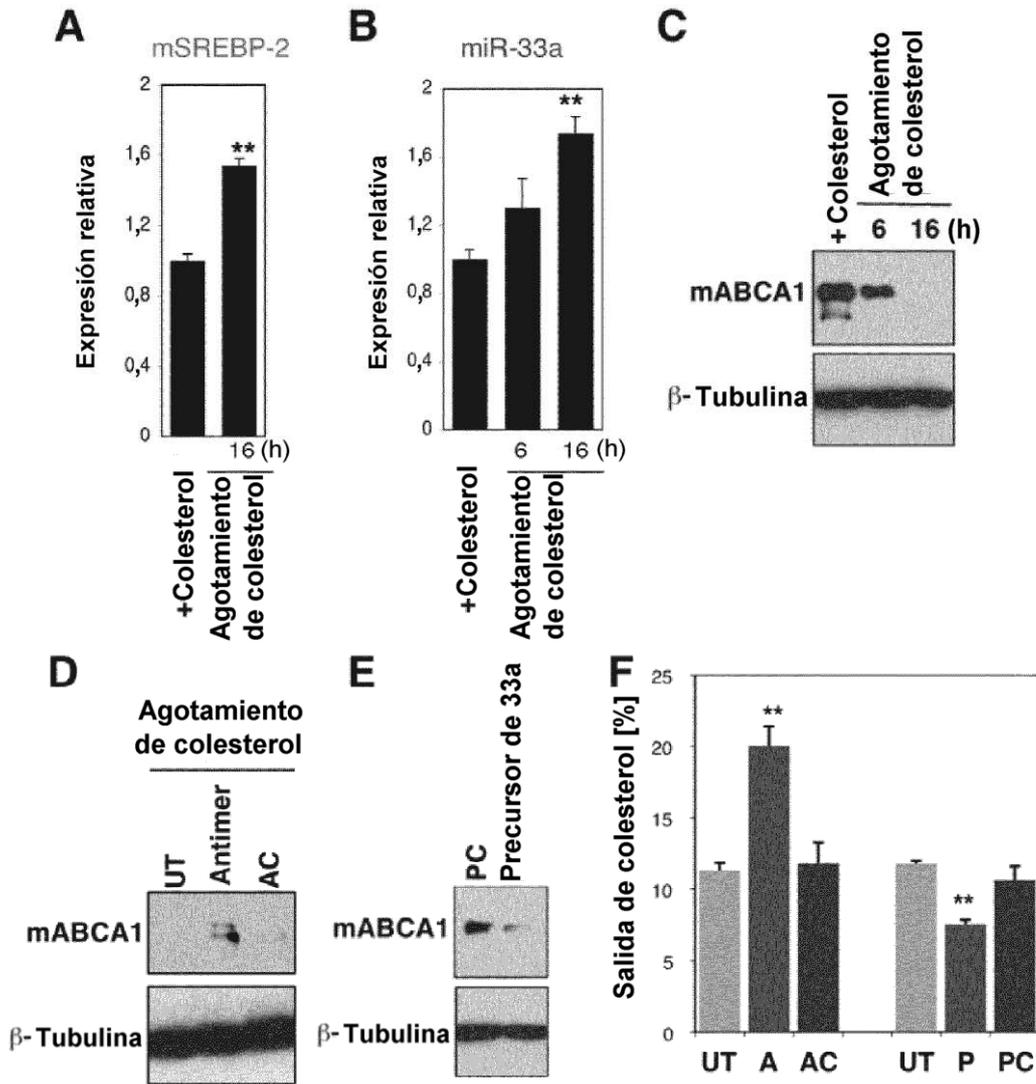
8B



8C



FIGURAS 9A-F



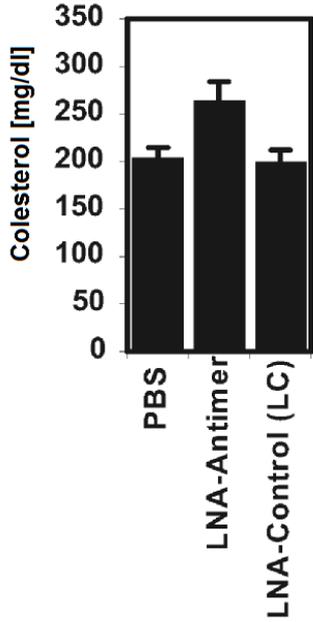


FIGURA 10A

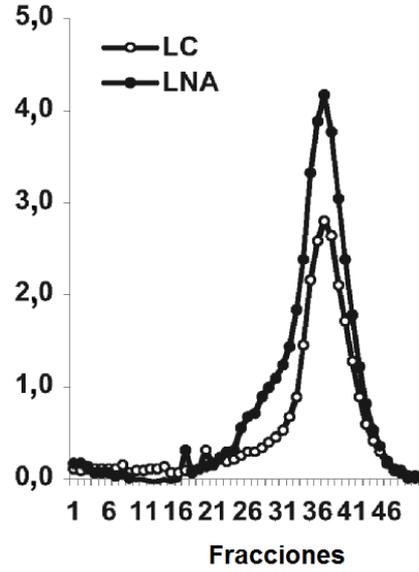


FIGURA 10B

FIGURA 10C

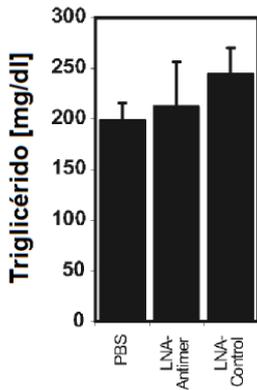


FIGURA 10D

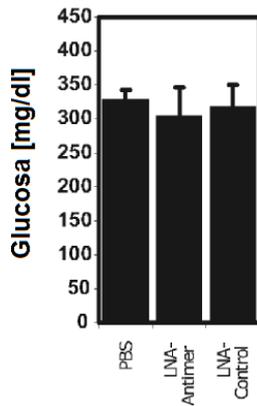


FIGURA 10E

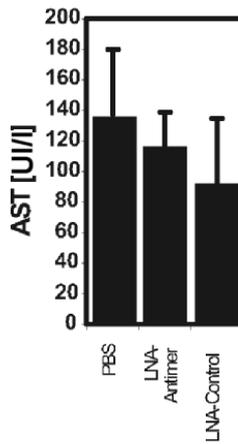
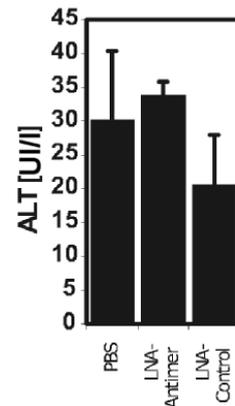


FIGURA 10F



FIGURAS 12A-B

A

miR-33a

<u>Especie</u>	<u>Secuencia de tallo-bucle</u>	<u>Gen hospedador</u>
Ser humano	CUGUGGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUUGUUCUGGGUACCCAUUGCAAUGUUCCACAGUGCAUCACAG	SREBF-2
Ratón	CUGUGGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUUGUUCUGGCAAUACCUUGCAAUGUUCCACAGUGCAUCACGG	SREBF-2
Pollo	CUGUAGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUUGGUGGCAUACUUGCAAUGUUCCACAGUGCAUCACAG	SREBF-2
Rana	CUGUGGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUUGAUUACGCGG-UGUGCAAUGGCCUGCAUGCAACACAG * ***** * ***** *	SREBF-1?

D. Melanogaster

CUCUCCUCUGGAGAUACACGAAAGGUGCAUUGUAGUGCAUUGUUCUGUCCAAUUGCUUCAGGCAAUACAACUUCAGUGCAAGCUCUGCAUUUAC
* ***** ** *****

B

miR-33b

<u>Especie</u>	<u>Secuencia de tallo-bucle</u>	<u>Gen hospedador</u>
Ser humano	GCGGGCGGCCCGCGGUGCAUUGUUGCAUUGCAGUGUGAGGGGGUGCAGUGCCUCGGCAGUGCAGCCCGGAGCCGGCCCCUGGCACCAC	SREBF-1
Rana	CCUUGGUGCAUUGUUGUUGCAUUGCAUGUCACCUUGGACGUUGGCAUUGUUUCUUCAGUGCAGUAUGG **** ***** *	SREBF-2

FIGURA 13A

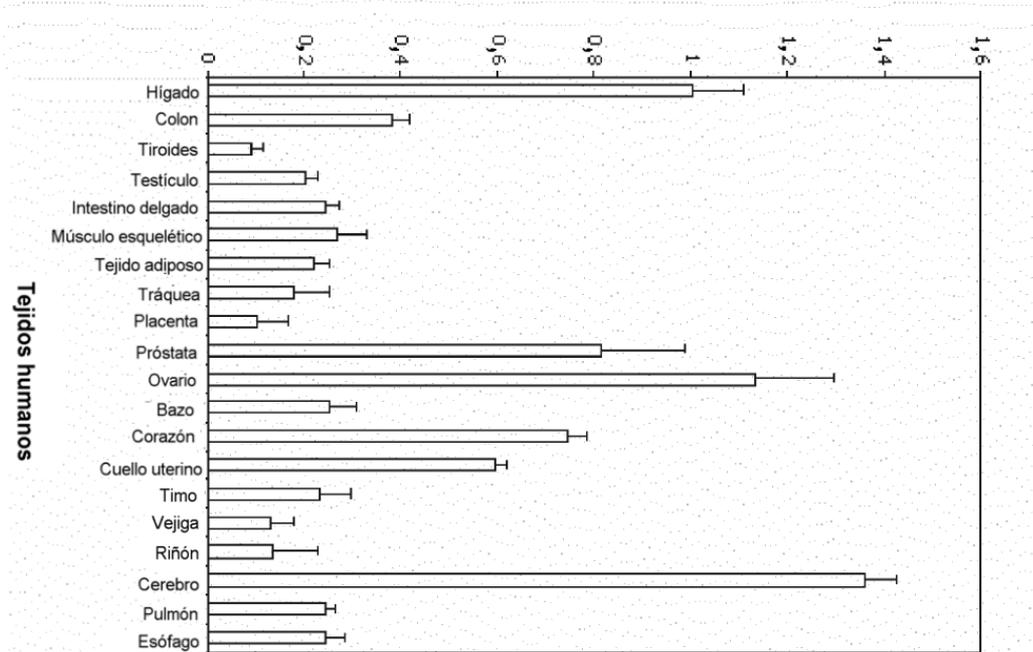
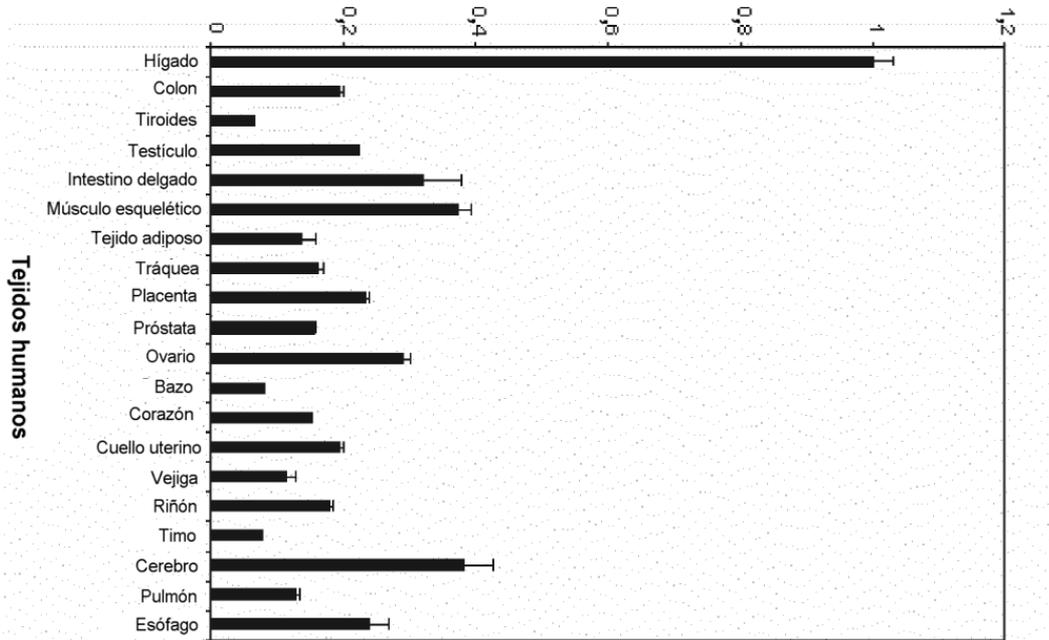


FIGURE 13B

FIGURA 14A

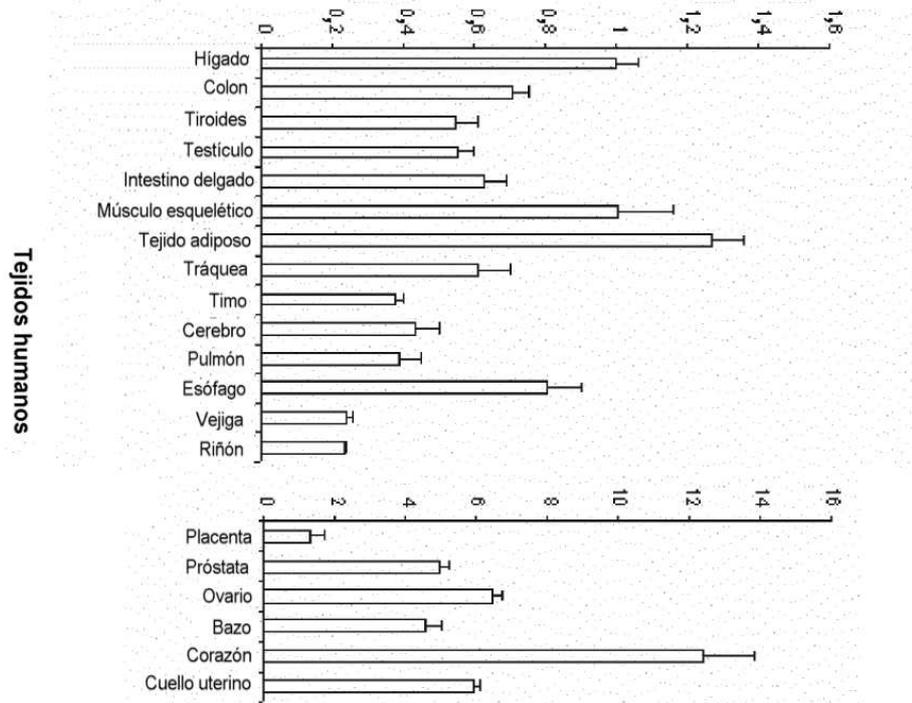
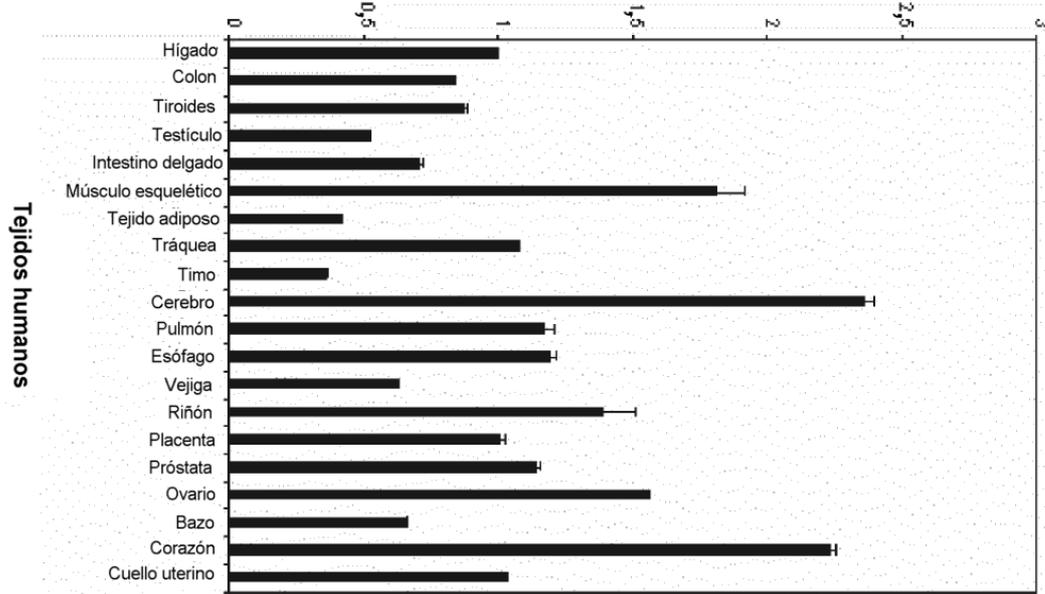
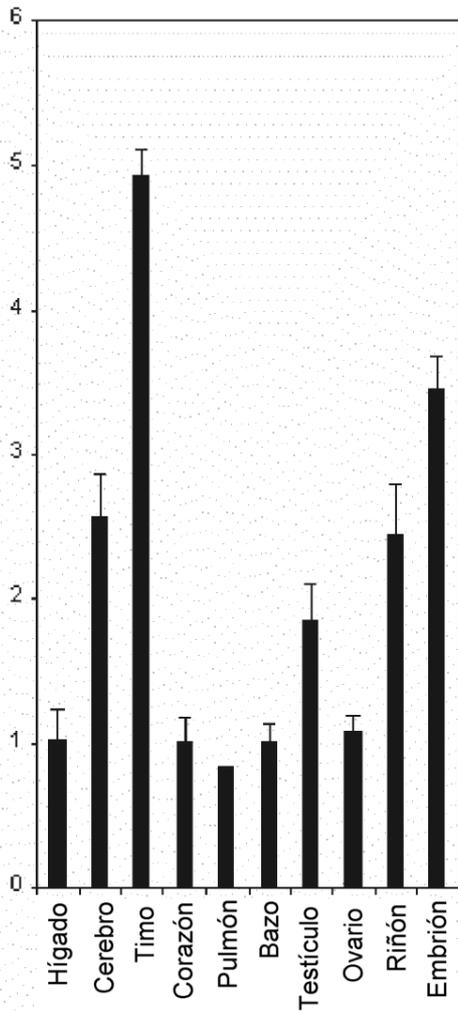


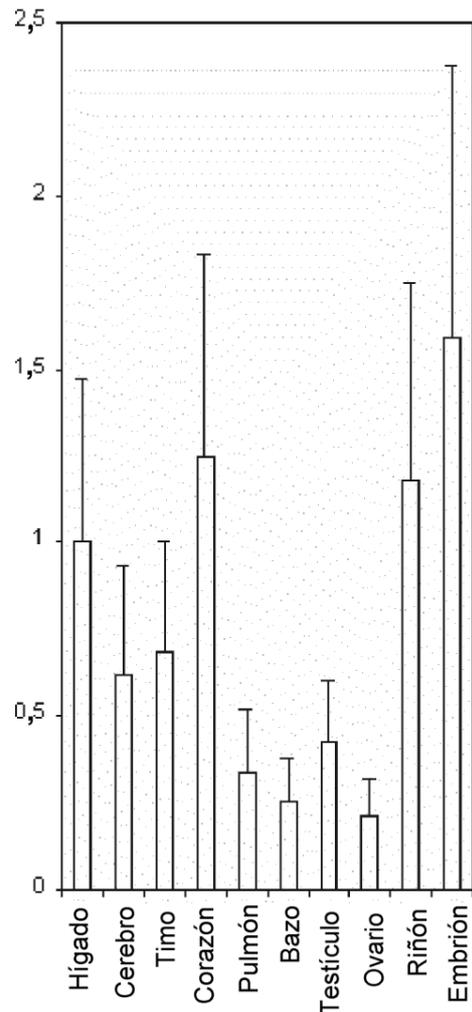
FIGURA 14B

FIGURA 15A



Tejidos de ratón

FIGURA 15B



Tejidos de ratón

FIGURA 16

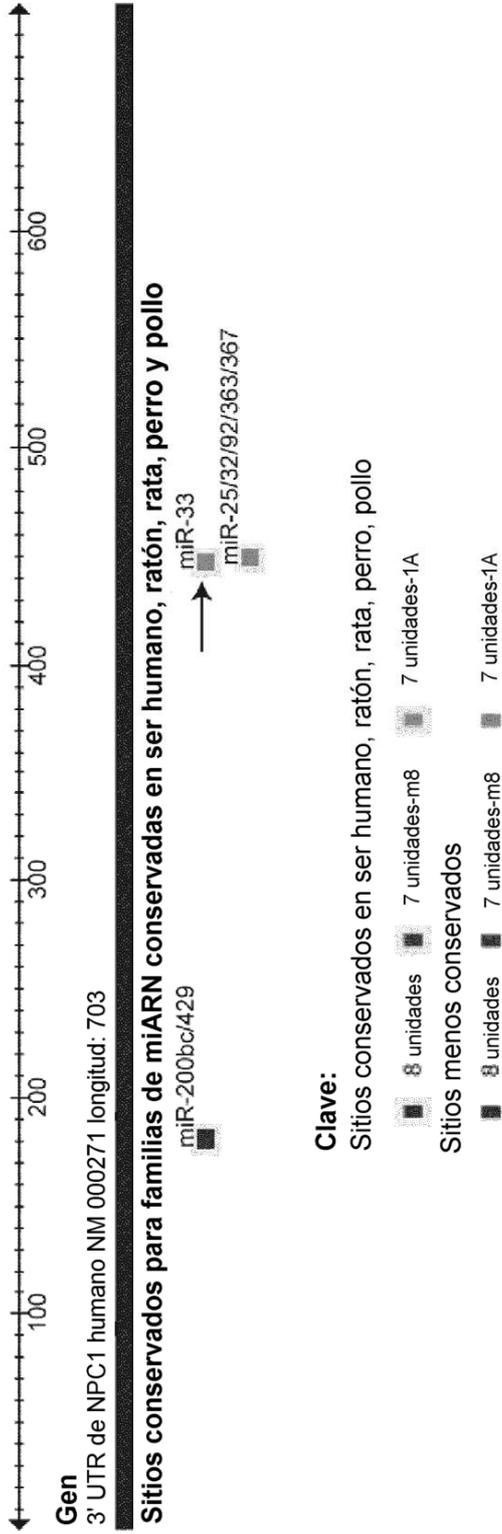


FIGURA 17

SEQ ID NO. 1 (Secuencia de nucleótidos de miR-33 a):
GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA

SEQ ID NO. 2 (Secuencia de nucleótidos de miR-33 b):
GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC

SEQ ID NO. 3 (Oligonucleótido anti-miR-33a):
UGCAAUGCAACUACAAUGCAC

SEQ ID NO. 4 (Oligonucleótido anti-miR-33b):
GCAAUGCAACAGCAAUGCAC