

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 600**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2011** E 17152700 (5)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019** EP 3210611

54 Título: **Métodos de tratamiento de los trastornos inflamatorios vasculares**

30 Prioridad:

12.03.2010 US 313274 P

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

20.02.2020

73 Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)**

**75 Francis Street
Boston, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

**FEINBERG, MARK W. y
SUN, XINGHUI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 743 600 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

Métodos de tratamiento de los trastornos inflamatorios vasculares

CAMPO TÉCNICO

5 En este documento se describe un ácido nucleico para el uso en un método de tratamiento de la aterosclerosis en un sujeto.

ANTECEDENTES

10 El endotelio vascular representa una conexión crítica entre la sangre y todos los tejidos. La disfunción endotelial contribuye al desarrollo tanto de estados inflamatorios patológicos agudos, como la endotoxemia y sepsis, como de estados inflamatorios patológicos crónicos, como la aterosclerosis, diabetes, artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria intestinal (Aird, *Blood* 101:3765-3777, 2003; Aird, *Lancet* 365:63-78, 2007; Baker et al., *CellMetab.* 13:11-22, 2011; Gareus et al., *CellMetab.* 8:372-383, 2008; Guerci et al., *Diabetes Metab.* 27:436-477, 2001; Hansson y Libby, *Nat. Rev. Immunol.* 6:508-519, 2006; Khan et al., *Nat. Rev. Rheumatol.* 6: 253-261, 2010; Roifman et al., *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 7:175-182, 2009). En respuesta a los estímulos inflamatorios, el endotelio vascular expresa una serie de moléculas de adhesión que desempeñan funciones clave en la captación de leucocitos en los puntos de inflamación (Ley et al., *Nat. Rev. Immunol.* 7:678-689, 2007; Pober y Sessa, *J. Immunol.* 138:3319-3324, 2007). En particular, la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), E-selectina, y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) median en la unión temprana de leucocitos y eventos desencadenantes. Posteriormente se genera una respuesta inflamatoria en los tejidos, una vez que se han producido eventos como la adhesión y trans migración firme (Ley et al., *Nat. Rev. Immunol.* 7:678-689, 2007). Estudios clínicos han demostrado que las formas solubles de estas moléculas de adhesión están incrementadas en aquellos pacientes que padecen enfermedad inflamatoria vascular (Shapiro et al., *Crit. Care* 14:R182, 2010; Xu et al., *Int. J. Cardiol.* 64:253-258, 1998).

15 WO 2005/013901 A2 divulga compuestos, composiciones y métodos para modular la expresión y función de pequeños fragmentos de ARN no codificante.

RESUMEN

25 El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Cualquier otra divulgación de la presente descripción, con independencia de que se indique como preferible o se exponga a modo de ejemplo, no forma parte de la presente invención.

30 La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que la sobreexpresión de miR-181b en las células endoteliales inhibe la regulación al alza mediada por NF- κ B inducida por TNF- α de la expresión de la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), E-selectina, y la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), inhibe la adhesión leucocitaria en monocapas de células endoteliales α activadas, y suprime la expresión de E-selectina y VCAM-1 mediada por NF- κ B inducida por TNF- α en el endotelio vascular *in vivo*. En vista del descubrimiento de que miR-181b inhibe la señal de NF- κ B, se proporcionan métodos de tratamiento de enfermedades causadas o mediadas por la señal de NF- κ B (por ej., enfermedades inflamatorias vasculares) y métodos para inhibir la señal de NF- κ B en un célula (por ej., una célula endotelial) que no forman parte de la invención.

35 La invención, definida en las reivindicaciones, manifiesta un ácido nucleico para el uso en un método de tratamiento de la aterosclerosis en un sujeto, donde el método comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho ácido nucleico, y donde el ácido nucleico comprende la secuencia de ID SEC. N°: 1. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende la secuencia de ID SEC. N°: 2 o ID SEC. N°: 3.

40 En algunas realizaciones, el ácido nucleico se conjuga con uno o más polímeros, un péptido o un polisacárido.

En algunas realizaciones, la administración provoca una reducción de la adhesión leucocitaria en el endotelio del sujeto o una reducción de la extravasación leucocitaria del endotelio del sujeto en comparación con un sujeto de control al que no se le ha administrado el ácido nucleico.

45 En algunas realizaciones, la administración provoca una reducción de la expresión de la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), E-selectina o de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) en el endotelio del sujeto en comparación con un sujeto de control al que no se le ha administrado el ácido nucleico.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico se administra al sujeto por vía oral, intramuscular, subcutánea, arterial, intravenosa o por inhalación.

50 Por consiguiente, en el presente documento se manifiesta un ácido nucleico para el uso en métodos de tratamiento o para retrasar la aparición de aterosclerosis, incluyendo la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un ácido nucleico que contiene (por ej., 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23 nucleótidos) la secuencia de miR-181b (ID SEC. N°: 1). En algunas realizaciones, que no forman parte de la invención, se trata de un ácido nucleico para el uso en métodos de tratamiento o para retrasar la aparición de otras enfermedades inflamatorias vasculares. En algunas realizaciones de estos métodos, que no forman parte de la invención, la enfermedad inflamatoria vascular es una enfermedad inflamatoria vascular aguda o una enfermedad inflamatoria vascular crónica.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente, el ácido nucleico para el uso en los métodos se administra por vía oral, intramuscular, subcutánea, arterial, intravenosa o por inhalación. En algunas realizaciones de estos métodos, se administra al sujeto una dosis o múltiples dosis (por ej., al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez dosis) del ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico se administra de forma continua durante un periodo de tratamiento (por ej., al menos cinco minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 10 horas, 18 horas, 24 horas, 48 horas o 1 semana).

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, la administración provoca una reducción (por ej., significativa (a efectos del presente documento, el término "significativo" significa estadísticamente significativo), como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) en la adhesión leucocitaria al endotelio del sujeto o una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) en la extravasación leucocitaria del endotelio del sujeto en comparación con un sujeto de control (por ej. un sujeto sano o asintomático, un sujeto al que no se le ha diagnosticado o que no presenta uno o más síntomas de aterosclerosis, o un sujeto diagnosticado o que presenta uno o más síntomas de aterosclerosis) al que no se le ha administrado el ácido nucleico. En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, la administración provoca una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) en la expresión (proteína o ácido nucleico) de VCAM-1, E-selectina, o ICAM-1 en el endotelio del sujeto en comparación con un sujeto de control (por ej. un sujeto sano o asintomático, un sujeto al que no se le ha diagnosticado o que no presenta uno o más síntomas de aterosclerosis, o un sujeto diagnosticado o que presenta uno o más síntomas de aterosclerosis) al que no se le ha administrado el ácido nucleico.

Se proporcionan asimismo métodos para la reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) en la señal del factor nuclear PB (NF-PB) en una célula endotelial (por ej. una célula endotelial en un sujeto o una célula endotelial *in vitro* o *ex vivo*), incluyendo la administración en la célula endotelial de un ácido nucleico que contiene la totalidad o parte (por ej. 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23 nucleótidos) de la secuencia de miR-181b (ID SEC. N°: 1), que no forma parte de la invención. En algunas realizaciones de la divulgación, la administración resulta en una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) en la expresión (proteína o ARNm) de importina- α 3 en la célula endotelial en comparación con una célula endotelial a la que no se le ha administrado el ácido nucleico o a la que se le ha administrado un ácido nucleico de control (por ej. una secuencia no específica codificada). En algunas realizaciones de la divulgación, la administración resulta en una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) en la importación nuclear de la subunidad p65 y/o p50 de NF-PB en el núcleo de la célula endotelial en comparación con una célula endotelial a la que no se le ha administrado el ácido nucleico o a la que se le ha administrado un ácido nucleico de control (por ej. una secuencia no específica codificada). En algunas realizaciones de la divulgación, la administración resulta en una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) en la expresión (proteína o ARNm) de una o más VCAM-1, E-selectina o ICAM-1 en la célula endotelial en comparación con una célula endotelial a la que no se le ha administrado el ácido nucleico o a la que se le ha administrado un ácido nucleico de control (por ej. una secuencia no específica codificada).

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula endotelial está en el sujeto y el ácido nucleico se le administra por vía oral, intramuscular, subcutánea, arterial, intravenosa o por inhalación.

En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el ácido nucleico puede contener la secuencia de ID SEC. N°: 2 o ID SEC. N°: 3. En cualquiera de los métodos descritos en el presente, el ácido nucleico puede ser modificado o conjugado con uno o más (por ej. dos o tres) polímeros (como polietilglicol o polialquilglicol), un péptido (como el péptido α RGD o un colágeno (por ej. telocolágeno tipo I) o un polisacárido (por ej. α β -1,3-glicano).

A efectos del presente documento, una "secuencia de ácido nucleico complementaria" es una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse con otra secuencia de ácido nucleico que comprende pares de bases de nucleótidos complementarias. Por "hibridar" se entiende un par que forma una molécula de doble cadena entre bases de nucleótidos complementarias (por ej. la adenina (A) forma un par de bases con la timina (T) (o el uracilo (U) en el caso del ARN), y la guanina (G) forma un par de bases con la citosina (C)) en condiciones de rigurosidad adecuadas. (Ver, por ej. Wahl, G. M. y S. L. Berger, *Methods Enzymol.* 152:399, 1987; Kimmel, A. R., *Methods Enzymol.* 152:507, 1987).

A efectos de los presentes métodos, el ácido nucleico no necesita ser complementario de la secuencia diana completa (por ej. una secuencia de ARNm de importina- α 3, como una secuencia de ARNm de la región 3'-UTR de importina-3 α), sino lo suficiente para proporcionar la inhibición específica; por ej. en algunas realizaciones la secuencia es 100% complementaria con al menos 5-23, 5-15 o 5-10 nucleótidos contiguos en 3'-UTR de un ARNm de importina-3 α (por ej. el sitio 1 o el sitio 2 de la región 3'-UTR de importina- α 3 que aparecen en la Figura 8A). A continuación se proporciona información más detallada.

A efectos del presente documento, un "oligonucleótido antisentido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ADN o ARN, como una secuencia presente en la importina- α 3 (por ej. una

secuencia presente en la región 3'-UTR del ARNm de la importina- α 3, como el sitio 1 o el sitio 2 de la región 3'-UTR del ARNm de la importina- α 3 que se ilustran en la Figura 8A).

Por "tratamiento" se entiende una reducción en la gravedad, duración o frecuencia de uno o más (por ej. dos, tres, cuatro, cinco o seis) síntomas de una enfermedad (por ej. una enfermedad inflamatoria vascular), la eliminación de uno o más (por ej. dos, tres, cuatro, cinco o seis) síntomas de una enfermedad (por ej. una enfermedad inflamatoria vascular) y/o un retraso en la aparición de uno o más (por ej. dos, tres, cuatro, cinco o seis) síntomas de una enfermedad (por ej. una enfermedad inflamatoria vascular) en un sujeto (por ej. un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad inflamatoria vascular o un sujeto identificado en riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria vascular). Un retraso en la aparición de uno o más síntomas de una enfermedad (por ej. una enfermedad inflamatoria vascular) en un sujeto al que se le ha administrado un ácido nucleico que contiene la totalidad o parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 se puede comparar con la evolución de los mismos síntomas en un sujeto con la misma enfermedad (por ej. la misma enfermedad inflamatoria vascular) al que no se le ha administrado el ácido nucleico.

Por "enfermedad inflamatoria vascular" se entiende un estado patológico que implica una o más (por ej. una, dos o tres) fases (por ej. una fase temprana (por ej. antes de desarrollar uno o más síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular o antes del diagnóstico por un profesional sanitario), una fase intermedia (por ej. tras desarrollar uno o más síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular o tras el diagnóstico por un profesional sanitario), o una fase tardía (por ej. tras la manifestación de uno o más síntomas graves de una enfermedad inflamatoria vascular que requiere ingreso en un centro sanitario (por ej. un hospital o una unidad de cuidados intensivos) en la patobiología de la enfermedad de uno o más (por ej. uno, dos, tres o cuatro) de los eventos siguientes: activación celular endotelial, adhesión leucocitaria al endotelio, extravasación leucocitaria del endotelio y aumento (por ej. un aumento significativo, como un aumento de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95%) de la expresión (proteína o ARNm) de una o más VCAM-1, E-selectina, o ICAM-1 en el endotelio, en comparación con un sujeto de control (por ej. un sujeto sano o asintomático, un sujeto al que no se le ha diagnosticado una enfermedad inflamatoria vascular, un sujeto que no presenta uno o más síntomas de enfermedad inflamatoria vascular, el mismo sujeto antes de desarrollar uno o más síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular, el mismo sujeto antes del diagnóstico de una enfermedad inflamatoria vascular, o el mismo sujeto en una fase más temprana de la enfermedad inflamatoria vascular).

Por "enfermedad inflamatoria vascular aguda" se entiende una enfermedad inflamatoria vascular que está tipificada por una respuesta inicial del organismo a estímulos nocivos (por ej. infección bacteriana o lesión tisular) que provoca un aumento del movimiento tanto del plasma como de los leucocitos (por ej. granulocitos) de la sangre en el tejido(s) lesionado.

Por "enfermedad inflamatoria vascular crónica" se entiende una enfermedad inflamatoria vascular que se caracteriza por un periodo prolongado (por ej. al menos 1 semana, 2 semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o 5 años) de inflamación en uno o más tejidos (por ej. dos, tres, cuatro o cinco) de un sujeto.

Por "lesión pulmonar aguda" se entiende una enfermedad inflamatoria del pulmón que produce un deterioro en la función respiratoria. La lesión pulmonar aguda se caracteriza a menudo por uno o más (por ej. dos, tres o cuatro) de los elementos siguientes: reducción de la presión parcial de oxígeno en sangre, edema pulmonar, función pulmonar disminuida y fuga capilar. La lesión pulmonar aguda puede estar producida por una inflamación local o sistémica. Por ejemplo, la lesión pulmonar aguda puede estar inducida por una sepsis ("lesión pulmonar aguda inducida por sepsis").

El término "retraso en la aparición" se refiere a reducir (por ej. una reducción significativa, de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95%) el ritmo de evolución o la evolución de uno o más (por ej. al menos dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de la enfermedad (por ej. una enfermedad inflamatoria vascular) en un sujeto, al administrarle un tratamiento terapéutico (por ej. un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1) en comparación con un sujeto de control (por ej. un sujeto que no recibe el tratamiento terapéutico o el mismo sujeto antes de que se le haya administrado el tratamiento terapéutico). Por la frase "una parte de la secuencia de miR-181b" o "una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1" se entiende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23 nucleótidos contiguos de la secuencia de ID SEC. N°: 1. Por ejemplo, una parte de la secuencia de miR-181b puede estar entre 5 y 23, 5 y 20, 5 y 15, o 5 y 10 nucleótidos contiguos de la secuencia de ID SEC. N°: 1. La secuencia contigua no tiene que empezar en el extremo 5' de la secuencia de ID SEC. N°: 1 y puede empezar en la posición del nucleótido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, o 18 de la ID SEC. N°: 1.

Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad que es suficiente para mejorar o tratar uno o más (por ej. dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular en un sujeto o retrasar la aparición de uno o más (por ej. dos, tres, cuatro o cinco síntomas) de una enfermedad inflamatoria vascular en un sujeto.

Por "síntoma de una enfermedad inflamatoria vascular" se entiende una manifestación física de una enfermedad inflamatoria vascular que puede ser valorada o medida por un profesional sanitario (por ej. un médico, un enfermero, un auxiliar o un técnico de laboratorio). Algunos ejemplos de síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular incluyen: dolor, enrojecimiento, inflamación, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, diarrea, náuseas, vómitos, calambres abdominales, dolor abdominal, sangre en las heces, fiebre, úlceras, falta de apetito, pérdida de peso, fatiga, inflamación ocular, dolor o molestias en el pecho, dificultad para respirar, mareos, aumento de la

frecuencia cardíaca, dolor en la parte superior del cuerpo, dolor de estómago, ansiedad, sudoración, calambres en las piernas, debilidad o entumecimiento en las piernas, úlceras en las piernas y dedos del pie, cambio de color de las piernas, pérdida de vello o crecimiento ralentizado del vello en pies o piernas, piel brillante en las piernas, pulso débil en piernas o pies, disfunción eréctil, estertores o tos persistente, flemas teñidas de sangre de color rosa o blanco, aumento de peso por la retención de líquidos, dificultad para concentrarse, palpitaciones, problemas de sueño causados por la dificultad para respirar, sibilancias o estertores audibles al exhalar, ataques de tos o estertores, debilidad o entumecimiento en brazos o piernas, dificultad para hablar o problemas de pronunciación, músculos faciales caídos, rigidez en las articulaciones, menos margen de movimiento, problemas de visión en uno o ambos ojos, dolor de cabeza, respiración con dificultad e inusualmente rápida, presión arterial baja y confusión.

"ARN" es una molécula que comprende al menos uno o más residuos de ribonucleótidos. Un "ribonucleótido" es un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de una fracción de beta-D- ribofuranosa. El término ARN, tal como se usa aquí, incluye un ARN bicatenario, un ARN monocatenario, ARN aislado, como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido por técnicas de recombinación, así como ARN alterado que difiere del ARN naturalmente presente por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Los nucleótidos de las moléculas de ARN también pueden comprender nucleótidos no estándar, como nucleótidos no presentes naturalmente, nucleótidos químicamente sintetizados o desoxinucleótidos.

Una "micro-ARN" (miARN) es una molécula de ARN monocatenaria de unos 21-23 nts de largo. En general, las miARN regulan la expresión génica. Las miARN están codificadas por genes de cuyo ADN han sido transcritas, pero las miARN no se traducen en proteína. Cada transcrito primario de miARN se transforma en una estructura en tallo-bucle corta antes transformarse posteriormente en un miARN funcional. Las moléculas de miARN maduras son parcialmente complementarias a una o más moléculas de ARN mensajeras (ARNm), y su principal función es regular a la baja la expresión génica. Los miARN maduros de ejemplo contienen la totalidad o parte de la secuencia de miR-181b (ID SEC. N°: 1). Los miARN maduros que forman parte de la invención contienen la secuencia de ID SEC. N°: 1. Los miARN precursores de ejemplo contienen la secuencia de ID SEC. N°: 2 o ID SEC. N°: 3. Algunos ejemplos de miARN están dirigidos a la región 3'-UTR del ARNm de una importina- α 3 (por ej. sitio 1 y sitio 2 de la región 3'-UTR del ARNm de la importina- α 3 como se ilustra en la Figura 8A).

Por "miR-181b" se entiende una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de ID SEC. N°: 1. Por ejemplo, el término incluye moléculas de miARN precursoras que contienen una secuencia de ID SEC. N°: 2 o ID SEC. N°: 3. Por "miR-181b maduro" se entiende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de ID SEC. N°: 1.

Tal como se usa aquí, un "ARN de interferencia" se refiere a cualquier secuencia de ARN bicatenaria o monocatenaria capaz de inhibir o regular a la baja, de forma directa o indirecta, la expresión génica mediando la interferencia de ARN. El ARN interferente incluye, entre otros, ARN interferente corto (siARN) y ARN de horquilla corta (shARN). "Interferencia de ARN" se refiere a la degradación selectiva de una transcripción de ARN mensajero compatible con la secuencia (por ej. un ARNm de importina- α 3). Un ejemplo de un ARN interferente es un ácido nucleico que contiene la totalidad o parte de la secuencia de miR-181b (ID SEC. N°: 1). Un ARN interferente que forma parte de la invención es un ácido nucleico que comprende la ID SEC. N°: 1. En otros ejemplos, un ARN interferente es un ácido nucleico que contiene la secuencia de ID SEC. N°: 2 o ID SEC. N°: 3, o dirigido a la región 3'-UTR del ARNm de una importina- α 3 (por ej. sitio 1 o sitio 2 de la región 3'-UTR del ARNm de la importina- α 3 como se ilustra en la Figura 8A).

Tal como se usa aquí, un "shARN" (ARN de horquilla corta) se refiere a una molécula de ARN que comprende una región antisentido, una región de bucle y una región sentido, donde la región sentido tiene nucleótidos complementarios que forman pares de bases con la región antisentido para crear un tallo dúplex. Después de la transformación postranscripcional, el ARN de horquilla corta se convierte en un ARN interferente corto por un evento de clivaje mediado por la enzima Dicer, que forma parte de la familia de las RNasa III. En algunos ejemplos, un shARN es un ácido nucleico que contiene la totalidad o parte de la secuencia de miR-181b (ID SEC. N°: 1), ID SEC. N°: 2 o ID SEC. N°: 3. Un ARN interferente que forma parte de la invención es un ácido nucleico que comprende la ID SEC. N°: 1. En otros ejemplos, un shARN está dirigido a la región 3'-UTR del ARNm de una importina- α 3 (por ej. sitio 1 o sitio 2 de la región 3'-UTR del ARNm de una importina- α 3 como se ilustra en la Figura 8A).

A efectos del presente documento, un "ARN interferente corto" o "siARN" se refiere a cualquier molécula corta de ARN capaz de inhibir o regular a la baja la expresión génica al mediar la interferencia de ARN en una forma específica de secuencia. El ARN corto puede tener, por ej. unos 18 a 21 nucleótidos de largo. Un siARN puede contener la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1. Un siARN de la invención comprende la secuencia de ID SEC. N°: 1. En otros ejemplos, un siARN puede dirigirse a la región 3'-UTR del ARNm de una importina- α 3 (por ej. sitio 1 o sitio 2 de la región 3'-UTR del ARNm de una importina- α 3 como se ilustra en la Figura 8A).

Un "sujeto" es un vertebrado, incluyendo cualquier miembro de la familia de los mamíferos, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, animales del zoo, animales utilizados en deportes o mascotas, como ratones, conejos, cerdos, ovejas, cabras, bovinos y primates superiores. En realizaciones preferibles, el sujeto es un ser humano.

A efectos del presente documento, un "vector" o "vector de expresión" es un vehículo con base de ácido nucleico que comprende secuencias reguladoras y un gen de interés, que puede ser utilizado para transferir su contenido a una célula. Por ejemplo, el vector puede ser utilizado para expresar un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de miR-181b (ID SEC. N°: 1) en una célula. Un vector de la invención se utiliza para expresar un ácido nucleico que

comprende la ID SEC. N°: 1. Por el término "señal del factor nuclear PB" o "señal de NF-PB" se entiende las múltiples trayectorias de señal dentro de una célula que resultan en la translocación de NF-PB (por ej. la translocación de la subunidad p65 y/o p50 de NF-PB) en el núcleo y la transcripción aumentada de uno o más (por ej. al menos dos, tres, cuatro o cinco) genes regulados por NF-PB. En el citoplasma, NF-PB forma un complejo con su inhibidor IPB. Las vías de señal secuencia arriba activan un complejo de quinasa IPB (IKK) que resulta en la degradación proteosomal inducida por fosforilación mediada por IKK del inhibidor IPB. La degradación de IPB permite que NF-PB se traslade al núcleo y que induzca la transcripción por la unión a promotores específicos de un gen. Tal y como se describe en el presente documento, la señal de NF-PB desempeña un papel o está implicada en diversos estados patológicos (como las enfermedades inflamatorias vasculares).

Por el término "molécula de adhesión vascular 1" o "VCAM-1" se entiende una proteína que es sustancialmente idéntica (por ej. al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) al NCBI N° de Acceso P19320; NP_001186763.1; NP_542413.1; NP_001069.1; EAW72949.1; AAA61269.1; AAA51917.1; AAA61270.1; AAM96190.1; AAH85003.1; AAH68490.2; o AAH17276.3, o un ácido nucleico (por ej. un ARNm) que es sustancialmente idéntico (por ej. al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) al NCBI N° de Acceso NM_001199834.1; NM_001078.3; NM_080682.2; M60335.1; M30257.1; BC085003.1; BC068490.1; BC017276.2; AK223266.1; o X53051.1. Los métodos para medir la proteína y el ARNm VCAM-1 se describen en este documento y son bien conocidos en la técnica.

Por el término "E-selectina" se entiende una proteína que es sustancialmente idéntica (por ej. al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) al NCBI N° de Acceso NP_000441.2 o AAQ67702.1, o un ácido nucleico (por ej. un ARNm) que es sustancialmente idéntico (por ej. al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) al NCBI N° de Acceso NM_001145667.1 o NM_000450.2. Los métodos para medir el ARNm y la proteína de E-selectina se describen en este documento y son bien conocidos en la técnica.

Por el término "molécula de adhesión intercelular" o "ICAM-1" se entiende una proteína que es sustancialmente idéntica (por ej. al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) al NCBI N° de Acceso CAA41977.1, NP_000192.2, P05362.2, o CAA30051.1, o un ácido nucleico (por ej. un ARNm) que es sustancialmente idéntico (por ej. al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) al NCBI N° de Acceso NG 012083.1, NM 000201.2, J03132.1, o BC015969.2. Los métodos para medir la

Proteína ICAM-1 y el ARNm se describen en el presente documento y son bien conocidos en la técnica.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en las figuras acompañantes y en la descripción siguiente. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la descripción y las figuras, así como de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A-1F son datos que muestran que MiR-181b suprime la expresión génica proinflamatoria inducida por TNF- α en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). La Figura 1A es un gráfico de barras que muestra la expresión de miR-181b en respuesta al tratamiento de TNF- α (10 ng/ml) en HUVEC. El nivel de miR-181b fue detectado por qPCR en tiempo real. Los valores representan la media \pm SD. *P < 0,01.

La Figura 1B es un gráfico de barras que muestra que miR-181b es el miembro dominante de la familia de miR-181 expresada en HUVEC. Los niveles de miR-181a, miR-181b, y miR-181c fueron detectados por qPCR en tiempo real. Los valores representan la media \pm SD. En las Figuras 1A y 1B, los resultados representan uno de los dos experimentos realizados independientemente con resultados similares.

La Figura 1C muestra los resultados del análisis western blot de los niveles de proteína de VCAM-1, E-selectina e ICAM-1 en HUVEC transfectados con un control negativo de miARN (NS-m) o miméticos de miR-181b (181b-m), control negativo inhibidor de miARN (NS-i) o un inhibidor de miR-181b (181b-i), respectivamente, tras un tratamiento con 10 ng/ml de TNF- α durante 8 horas (h). Se realizó una densitometría y el número de cambios de la expresión de proteína tras la normalización con respecto a la expresión de β -actina aparece debajo de cada banda correspondiente. Se consideró que el valor para el grupo NS-m o NS-i era 1. Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos.

La Figura 1D es un conjunto de seis gráficos de barras que muestran los resultados del análisis por qPCR en tiempo real de los niveles de VCAM-1 (fila superior), E-selectina (fila central) e ICAM-1 (fila inferior) en HUVEC transfectados con un control negativo de miARN (NS-m) o miméticos de miR-181b (181b-m), control negativo inhibidor de miARN (NS-i) o un inhibidor de miR-181b (181b-i), respectivamente, tras un tratamiento con 10 ng/ml de TNF- α durante los tiempos indicados. Los resultados representan uno de los tres experimentos realizados independientemente con resultados similares. Los valores representan la media \pm SD. #P < 0,05 y *P < 0,01.

La Figura 1E es un conjunto de seis gráficos de barras que muestran los resultados del análisis ELISA de los niveles de proteína elaborados de VCAM-1 (fila superior), E-selectina (fila central) e ICAM-1 (fila inferior) en un medio de cultivo celular 16 horas después de un tratamiento con TNF- α (10 ng/ml). Las HUVEC se sometieron a transfección como se indica en la Figura 1 A. #P < 0,05 y *P < 0,01. Los valores representan la media \pm SD, n = 3.

La Figura 1F es un conjunto de seis fotografías y dos gráficos de barras que muestran que miR-181b regula la adhesión de las células THP-1 a HUVEC activadas TNF- α . Se muestran fotografías de células THP-1 que se adhieren a HUVEC

- 5 sometidas a transfección con control negativo de miARN (NS-m) (paneles superior e inferior a la izquierda) o miméticos de miR-181b (181b-m) (paneles superior e inferior centrales a la izquierda), control negativo inhibidor de mi ARN (NS-i) (paneles superior e inferior centrales a la derecha), o inhibidor de miR-181b (181b-i) (paneles superior e inferior a la derecha), respectivamente, con (paneles inferiores) o sin (paneles superiores) tratamiento con 10 ng/ml de TNF- α durante 4 h. Los resultados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. *P < 0,01, control negativo de miRNA frente a miR-181b (gráfico de barras de la izquierda), o control negativo inhibidor de miRNA frente al inhibidor de miR-181b (gráfico de barras de la derecha). Barras: 100 μ m.
- 10 Las Figuras 2A-2E presentan dos transferencias western blot y cinco gráficos de barras que muestran que miR-181b inhibe la inducción proinflamatoria de la expresión de VCAM-1. La Figura 2A es una transferencia western blot de los niveles de proteína de VCAM-1 en HUVEC sometidos a transfección con control negativo de miARN (NS-m) o miméticos de miR-181b (181b-m), respectivamente, y tratados con dosis crecientes de LPS (serotipo O26:B6) durante 16 h. Se realizó una densitometría y el número de cambios de la expresión de proteína tras la normalización frente a la expresión de β -actin se presenta en un gráfico de barras en la Figura 2B. Los datos representan la media \pm SD de dos experimentos independientes. *P < 0,05.
- 15 La Figura 2C contiene tres gráficos de barras que muestran datos de un experimento en el que las HUVEC se sometieron a transfección como en la Figura 2A y se trataron con LPS durante 6 horas. Se realizó un análisis qPCR en tiempo real de los niveles de ARNm de VCAM-1 (izquierda), E-selectina (centro), e ICAM-1 (derecha). Los valores representan la media \pm SD, n = 3. *P < 0,05.
- 20 La Figura 2D es un gráfico de barras que muestra que miR-181b no afecta a la actividad de 3'-UTR del gen de VCAM-1. Se muestra la actividad relativa de la luciferasa de los lisados de HUVEC sometidos a transfección con una estructura de 3'-UTR de VCAM-1 de luciferasa en presencia de control negativo de miARN (NS-m) o miméticos de miR-181b (181b-m) a 10 nM o 50 nM, respectivamente. Los valores representan la media \pm SD, n = 3.
- 25 La Figura 2E es una transferencia western blot de VCAM-1 en HUVEC sometidas a transfección con control negativo de miARN (NS-m), miméticos de miR-181b (181b-m) o miméticos de miR-181a (181a-m) a concentraciones de 0,2, 2, 10 o 20 nM y tratadas con 10 ng/ml de TNF- α durante 8 h.
- 30 Las Figuras 3A-E presentan una transferencia western blot, cuatro gráficos de barras y nueve microfotografías que muestran que miR-181b reprime la expresión génica proinflamatoria inducida por TNF- α *in vivo*. La Figura 3A es una transferencia western blot de un experimento en el que a los ratones se les inyectó por vía intravenosa un vehículo, control negativo de miARN (NS-m), o miméticos de miR-181b (181b-m). Veinticuatro horas más tarde se trató a los ratones con o sin TNF- α durante 4 horas y se cultivaron los pulmones para análisis western blot de los niveles de proteína de VCAM-1. Se realizó una densitometría y se cuantificó el número de cambios de la expresión de proteína tras la normalización frente a la expresión de β -actina. Se consideró que el valor para el grupo del vehículo era 1. *P < 0,05.
- 35 La Figura 3B es un gráfico de barras que muestra datos de experimentos realizados como se describe en la Figura 3A, en los que se realizó un análisis por qPCR en tiempo real de los niveles de ARNm de VCAM-1 en los tejidos indicados. *P < 0,05.
- 40 La Figura 3C es un conjunto de nueve microfotografías que muestran la tinción de VCAM-1 de secciones del pulmón y la aorta. Los ratones tratados con el vehículo en ausencia de TNF- α se muestran en los paneles superiores; los ratones tratados con el control negativo de miARN (NS-m) y TNF- α se muestran en los paneles del medio; y los ratones tratados con miméticos de miR-181b (181b-m) se muestran en los paneles inferiores. Los paneles centrales representan una ampliación del campo mostrado en los paneles de la izquierda. Los ratones fueron tratados como en la Figura 3A. Barras: 25 μ m.
- 45 La Figura 3D es un gráfico de barras que muestra la cuantificación de la tinción de VCAM-1 en el endotelio pulmonar. *P < 0,05.
- 50 La Figura 3E es un gráfico de barras que muestra la cuantificación de la tinción de VCAM-1 en el endotelio de la aorta. *P < 0,05. En las Figuras 3A-E, el grupo del vehículo eran tres ratones; el grupo de NS-m eran cinco ratones; y el grupo de 181b-m eran cinco ratones. Los valores representan la media \pm SEM.
- 55 Las Figuras 4A-C incluyen tres gráficos de barras que muestran que miR-181b reprime la expresión génica proinflamatoria inducida por TNF- α *in vivo*. Se muestran los datos del análisis por qPCR en tiempo real de los niveles de ARNm de E-selectina (gráfico de barras de la Figura 4A) o ICAM-1 (gráfico de barras de la Figura 4B) en tejidos extirpados de los ratones a los que se les había inyectado el vehículo (n = 3 ratones), control negativo de miARN (NS-m) (n = 5 ratones) o miR-181b (181b-m) (n = 5 ratones) con o sin un tratamiento con TNF- α durante 4 h. *P < 0,05. El eje Y de la derecha representa los valores de la expresión de E-selectina en el hígado. Los datos representan la media \pm SD.
- La Figura 4C es un gráfico de barras que muestra datos del análisis por qPCR en tiempo real de miR-181b en íntima, media o adventicia de la aorta de ratones (n = 2) a los que se les había inyectado un control negativo de miR o miR-181b. *P < 0,01. Los datos representan la media \pm SD.
- Las Figuras 5A-C incluyen cinco gráficos de barras y dos transferencias western blot que muestran que miR-181b inhibe la activación de la trayectoria de señal de NF-PB. La Figura 5A incluye cuatro gráficos de barras de los datos

de actividad de luciferasa de indicadores que contienen el concatémero de NF-PB o el promotor de VCAM-1 en HUVEC sometidas a transfección con controles negativos de miARN (NS-m) o miméticos de miR-181b (gráficos superior e inferior de la izquierda), control negativo inhibidor de miARN (NS-i) o inhibidor de miR-181b (181b-i) (gráficos superior e inferior de la derecha) y 12 horas después del tratamiento con 10 ng/ml de TNF- α . #P < 0,05; *P < 0,01. Los valores representan la media \pm SD, n = 3.

La Figura 5B es un gráfico de barras que muestra la tinción nuclear de p65 de HUVEC sometidas a transfección con control negativo de miARN (NS-m) o miméticos de miR-181b (181b-m).

La Figura 5C incluye dos transferencias western blot que muestran que las proteínas indicadas se detectaron en fracciones citoplásmicas (blot de la derecha) o nucleares (blot de la izquierda) preparadas con HUVEC sometidas a transfección con control negativo de miARN o miméticos de miR-181b, y tratadas con 10 ng/ml de TNF- α durante 1 h. Los experimentos se realizaron dos veces. Se realizó una densitometría y el número de cambios de la expresión de proteína de p65 y p50 tras la normalización aparece debajo de cada banda correspondiente.

La Figura 6 es una transferencia western blot de fosfo-ERK, ERK total, fosfo-p38, p38 total, fosfo-JNK y JNK total en HUVEC sometidas a transfección con 10 nM de control negativo de miARN o 10 nM de miméticos de miR-181b, y tratadas con 10 ng/ml de TNF- α durante los tiempos indicados.

Las Figuras 7A-F muestran una transferencia western blot y un conjunto de seis gráficos de barras que muestran que miR-181b reduce la expresión de importina- α 3. La Figura 7A es una transferencia western blot de los niveles de proteína de importina- α 1, importina- α 3, e importina- α 5 en células sometidas a transfección con control negativo de miARN (NS-m) o miméticos de miR-181b (181b-m), respectivamente, en ausencia o presencia de 10 ng/ml de TNF- α . Se muestran imágenes representativas de al menos cuatro experimentos.

La Figura 7B es un gráfico de barras que muestra los datos de la actividad de luciferasa normalizada de un indicador que contiene la región 3'-UTR de ARNm de importina- α 3 cuando se somete a transfección conjunta con cantidades crecientes de un vector vacío de pcDNA3.1 o pcDNA3.1 -miR- 181b. Los valores representan la media \pm SD, n = 3. Los resultados mostrados son de uno de dos experimentos independientes con resultados similares. *P < 0,01.

La Figura 7C es un gráfico de barras que muestra los datos de la actividad de luciferasa normalizada de un indicador que contiene la región 3'-UTR de importina- α 1, importina- α 3, importina- α 4, o importina- α 5, respectivamente, cuando se somete a transfección conjunta con un vector vacío de pcDNA3.1 o pcDNA3.1 -miR- 181b. *P < 0,01.

La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra los datos de la actividad de luciferasa normalizada de un indicador que contiene la región 3'-UTR de longitud completa de importina- α 3, los sitios de unión de miR-181b previstos por el algoritmo individual de ma22 de 3TJTR de importina- α 3, o los sitios de unión de 181b mutados. El indicador fue sometido a transfección conjunta con el vector vacío de pcDNA3.1 o pcDNA3.1- miR-18 lb. *P < 0,05. En las Figuras 7C y 7D, los valores representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

La Figura 7E contiene dos gráficos de barras que muestran los datos de un análisis de miRNP-IP para importina- α 3 o ARNm de Smad1 en HUVECs sometidas a transfección con control negativo de miARN (NS-m) o miméticos de miR-181b (181b-m). Los valores representan la media \pm SD de dos experimentos independientes. *P < 0,01.

La Figura 7F es un gráfico de barras de los datos de actividad de la luciferasa de los indicadores que contienen el concatémero de NF-PB en células sometidas a transfección con control negativo de miARN (NS-m) o miméticos de miR-181b (181b-m) en ausencia o presencia de un gen de importina- α 3 que carece de su región 3'- UTR. Los valores representan la media \pm SD, n = 3. *P < 0,05.

Las Figuras 8A-B son un diagrama que muestra ocho sitios de unión previstos de miR-181b y un gráfico de barras que muestra que miR-181b se dirige a la región 3'-UTR de importina- α 3. La Figura 8A es una diagrama de los ocho sitios de unión de miR-181b en la región 3'-UTR de importina- α 3 previstos por ma22. Las posiciones de los sitios de unión se indican como números entre paréntesis. Las líneas indican emparejamientos perfectos, mientras que dos puntos indican pares G:U. Los nucleótidos marcados con puntos han sido mutados. Se muestran las secuencias de miR-181b (ID SEC. Nº: 1), 3'UTR sitio 1 (ID SEC. Nº: 120), 3'UTR sitio 2 (ID SEC. Nº: 121), 3'UTR sitio 3 (ID SEC. Nº: 122), 3'UTR sitio 4 (ID SEC. Nº: 123), 3'UTR sitio 5 (ID SEC. Nº: 124), 3'UTR sitio 6 (ID SEC. Nº: 125), 3'UTR sitio 6 (ID SEC. Nº: 126), 3'UTR sitio 7 (ID SEC. Nº: 127), 3'UTR sitio 8 (ID SEC. Nº: 128), 3'UTR sitio 1 mutado (ID SEC. Nº: 129), y 3'UTR sitio 2 mutado (ID SEC. Nº: 130).

La Figura 8B es un gráfico de barras de datos de qPCR en tiempo real de los niveles de ARNm de importina- α 3 en HUVEC sometidas a transfección con control negativo de miARN (NS-m) o miméticos de miR-181b (181b-m).

Las Figuras 9A-D contienen dos gráficos de barras, una transferencia de western blot y una tabla que muestra los datos de caracterización de la expresión génica de HUVEC sometidas a transfección con miR-181b y el análisis bioinformático de estos datos. La Figura 9A es un gráfico de barras que muestra la expresión génica relativa de genes regulados por el TNF- α en HUVEC sometidas a transfección con un control negativo de miARN (NS-m) o miméticos de miR-181b (181b-m), identificados por un ensayo de microarray de chip génico. La expresión se presenta como el número de cambios con respecto a las HUVEC sometidas a transfección con control negativo de miARN. Los datos mostrados representan la media \pm SD, n = 4. *P < 0,05.

La Figura 9B es un gráfico de barras que muestra el análisis de qPCR en tiempo real de los genes enumerados en la Figura 9A. Todos los genes examinados se redujeron de forma significativa por sobreexpresión de miR-181b ($P < 0,05$).

La Figura 9C es una transferencia western blot de CX3CL-1, PAI-1, COX-2, y VCAM-1 de HUVEC sometidas a transfección con control negativo de miARN (NS-m) o miméticos de miR-181b (181b-m). Los experimentos se realizaron dos veces.

La Figura 9D es una tabla que muestra los resultados del análisis de enriquecimiento del conjunto de genes.

Las Figuras 10A-F son un conjunto de 15 microfotografías y cinco gráficos de barras que muestran que miR-181b reduce la activación de las células endoteliales y la acumulación de leucocitos en la inflamación del pulmón inducida por LPS. La Figura 10A es un conjunto de 15 microfotografías de un experimento en el que a los ratones se les inyectó por vía intravenosa un vehículo (paneles superiores), control negativo de miARN (NS-m) (paneles centrales) o miméticos de miR-181b (181b-m) (paneles inferiores). Veinticuatro horas más tarde, los ratones fueron tratados con o sin LPS i.p. (40 mg/kg, serotipo 026:B6) durante 4 h, y se extirparon los pulmones para la histología; a continuación, se tiñeron para detectar H & E (paneles de la izquierda), Gr-1 (paneles centrales), CD45 (paneles centrales de la izquierda), o VCAM-1 (paneles centrales de la derecha y primeros a la derecha). Barras: 50 μ m.

La Figura 10B es un gráfico de barras de lesión pulmonar (puntuación de lesión pulmonar), 4 horas después de la inyección de LPS i.p. en ratones a los que se les había administrado un vehículo, control negativo (NS-m) o miméticos de miR-181b (181b-m), tal y como se describe en la Figura 10A. * $P < 0,05$.

La Figura 10C es un gráfico de barras de los datos de cuantificación de células positivas CD45. * $P < 0,05$. La Figura 10D es un gráfico de barras de los datos de cuantificación de células positivas Gr-1. * $P < 0,05$.

La Figura 10E es un gráfico de barras de los datos de cuantificación de la expresión de VCAM-1. * $P < 0,05$. En las Figuras 10A-10D se incluyeron cuatro ratones en cada grupo y los valores representan la media \pm SD.

La Figura 10F es un gráfico de barras de datos de un experimento en el que los ratones fueron tratados como en la Figura 10A. A continuación se extirparon los pulmones y se valoró la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), y se fijó el valor del grupo del vehículo en 1. Los valores representan la media \pm SD, con seis ratones por grupo.

Las Figuras 11A-D son un conjunto de tres microfotografías y tres gráficos de barras que muestran que miR-181b reduce la adhesión leucocitaria al endotelio vascular en la inflamación pulmonar inducida por LPS.

Las Figuras 11A-11B son dos gráficos de barras de datos de qPCR en tiempo real de un experimento en el que los ratones fueron tratados con TNF- α (2 μ g/ratón) i.p., LPS i.p. (40 mg/kg, serotipo 026:B6), o suero salino durante 4 h. Las íntimas aórticas (endotelio) se aislaron para la extracción del ARN total, se sometieron a transcripción inversa, y al análisis de qPCR en tiempo real. Los datos para la expresión de ARNm de miR-181b se muestran en la Figura 11B y los datos para la expresión de ARNm de VCAM-1 se muestran en la Figura 11A. Había entre 3 y 4 ratones por grupo. Los valores representan la media \pm SEM. * $P < 0,05$.

La Figura 11C es un conjunto de tres microfotografías de un experimento en el que a los ratones se les inyectó por vía intravenosa un vehículo (arriba), control negativo de miARN (NS-m) (centro) o miméticos de miR-181b (181b-m) (abajo). Veinticuatro horas más tarde, los ratones fueron tratados con o sin LPS i.p. (40 mg/kg, serotipo 026:B6) durante 4 h, y se extirparon los pulmones y se tiñeron para detectar Gr-1. Barras: 20 μ m.

La Figura 11D es un gráfico de barras de datos de cuantificación del número células positivas Gr-1 por la longitud del vaso en mm. Se incluyeron cuatro ratones en cada grupo y los valores representan la media \pm SD. * $P < 0,05$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se detallan ácidos nucleicos para el uso en métodos de tratamiento o el retraso de la aparición de la aterosclerosis inducida o mediada por la señal de NF-PB, incluyendo la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un ácido nucleico que comprende la secuencia del miR-181b maduro (ID SEC. N°: 1). También se detallan los métodos para reducir la señal de NF-PB en una célula (por ej. en un sujeto, *in vitro*, o *ex vivo*), incluyendo la administración a la célula endotelial de un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia del miR-181b maduro (ID SEC. N°:1) que no forma parte de la invención.

NF-PB

La inducción de VCAM-1, E-selectina, e ICAM-1 en células endoteliales (EC) está mediada principalmente por la activación de la ruta NF-PB. La activación de los factores de transcripción de NF-PB han estado implicados en muchos procesos fisiológicos y patológicos (Baker et al., *Cell Metab.* 13:11 -22, 2011; Ghosh y Hayden, *Nature Rev. Immunol.* 8:837-848, 2008; Perkins, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8:49-62, 2007). Por ejemplo, NF-PB está implicado en el fallo cardíaco, isquemia/reperfusión, hipertrofia cardíaca, aterosclerosis, esclerosis múltiple, distrofia muscular, reabsorción ósea, enfermedad de Alzheimer, incontinencia pigmentaria, displasia ectodérmica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedades neuropatológicas, heliobacterias, gastritis asociada a *helicobacter pylori*, enfermedades renales, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, apnea del sueño, infecciones virales (por ej. VIH), enfermedades de la piel, enfermedades intestinales, sepsis, lupus, envejecimiento, diabetes (tipo I y II), dolor de cabeza, asma, artritis y cáncer (Kumar et al., *J. Mol. Med.* 82:434-448, 2004). Las terapias disponibles actualmente para el tratamiento de estas enfermedades a menudo tienen efectos secundarios negativos. Por tanto,

son deseables nuevas terapias para tratar estas enfermedades (por ej. inhibiendo la señal de NF-PB o la activación de la célula endotelial mediada por NF-PB).

La actividad de transcripción de NF-PB puede ser inducida por diversos estímulos, incluyendo las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL- β , factores de crecimiento, mitógenos, productos virales o bacterianos (por ej. LPS), participación de receptores de células T y estimulación de los receptores de CD40 y linfotóxina- β (Perkins, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:49-62, 2007). En las rutas de señales convencionales de NF-PB, la activación mediada por estímulos del inhibidor del complejo kappa B (IPB) quinasa (IKK) provoca que IKK fosforile rápidamente a IPB α en dos serinas N-terminales, que a su vez provoca su degradación inducida por ubiquitina por el proteasoma 26S (Karin y Ben-Neriah, *Ann. Rev. Immunol.* 18:621-663, 2000). Este evento provoca entonces la liberación de heterodímeros de NF-PB, que después se trasladan al núcleo vía proteínas de importina y dan lugar a un amplio rango de expresión génica al unirse a diversos elementos promotores de PB.

En el endotelio vascular, la activación de NF-PB da lugar a la expresión de genes proinflamatorios, incluyendo aquellos que codifican citoquinas, moléculas de adhesión y proteínas quimioatrayentes que juntas desempeñan funciones críticas en todos los aspectos de las respuestas inflamatorias e inmunitarias (Blackwell y Christman, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17:3-9, 1997; Hajra et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:9052-9057, 2000; Kempe et al., *Nucleic Acids Res.* 33:5308-5319, 2005; Molestina et al., *Infect. Immun.* 68:4282-4288, 2000; Zhou et al., *Cell Signal.* 19:1238-1248, 2007). Por tanto, el enfoque en la activación de las células endoteliales mediada por NF-PB parece prometedor para el desarrollo de nuevas terapias antiinflamatorias.

Enfermedades inflamatorias vasculares

Las células endoteliales realizan múltiples funciones que son críticas para la homeostasis vascular, incluyendo el control del tráfico de leucocitos, la regulación de la permeabilidad de las paredes de los vasos y el mantenimiento de la fluidez de la sangre. La captación de leucocitos y la extravasación a la pared del vaso sanguíneo son eventos esenciales para la respuesta inflamatoria normal y estados patológicos relacionados. Se trata de un proceso de múltiples pasos en el que las células endoteliales primero expresan moléculas de adhesión específicas, como E-selectina y VCAM-1 (Berlin et al., *Cell* 80:413-422, 1995; Bevilacqua et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:9238-9242, 1989; Kansas, *Blood* 88:3259-3287, 1996; Ley et al., *Nat. Rev. Immunol.* 7:678-689, 2007), que facilitan la unión temprana al endotelio vascular. Las células endoteliales también producen una variedad de quimioquinas C-C y C-X-C, que actúan para promover también la captación de leucocitos. Una vez que se produce la trans migración de leucocitos, la invasión de tejidos adyacentes permite la propagación de la respuesta inflamatoria inicial.

El descubrimiento de que miR-181b puede inhibir de forma potente las moléculas de adhesión, las quimioquinas y otros mediadores sensibles a NF-PB indica que puede servir para obstaculizar las fases tempranas y tardías de la inflamación vascular. La inhibición mediada por miR-181b se observa en varios mediadores proinflamatorios fisiológicos importantes, como TNF-a y LPS (ver figuras 1, 3, 9 y 10). Funcionalmente, miR-181b obstaculizó la adhesión de leucocitos en una sola capa de una célula endotelial estimulada *in vitro* y la acumulación de leucocitos en los pulmones *in vivo* (Figuras 3 y 10). Se determinó que el efecto de miR-181b es específico para la ruta de la señal de NF-PB, dado que la mayoría de los genes inducibles por TNF-a examinados fueron inhibidos por miR-181b. Por otra parte, la interrogación de todo el conjunto de más de 800 genes reducidos por miR-181b identificados por análisis de microarray reveló seis rutas de señal biológicas asociadas con la activación de NF-PB. miR-181b no tuvo ningún efecto sobre la fosforilación de los mediadores secuenciados abajo de MAPK, ERK, p38 y JNK (Figura 6). Estas conclusiones demuestran que miR-181b funciona como inhibidor negativo de los eventos de señal de NF-PB en respuesta a estímulos proinflamatorios en el endotelio vascular.

La presente invención describe el ácido nucleico para el uso en un método de tratamiento de la aterosclerosis. Aquí se describen otros métodos para tratar otras enfermedades inflamatorias vasculares que no forman parte de la invención. Una enfermedad inflamatoria avascular es aquella que implica en una o más (por ej. una, dos o tres) fases (por ej. una fase temprana (antes de desarrollar uno o más síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular o antes del diagnóstico por parte de un profesional de la salud), una fase intermedia (por ej. después de haber desarrollado uno o más síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular o después del diagnóstico por parte de un profesional de la salud), o una fase tardía (por ej. después de la manifestación de uno o más síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular que exige el ingreso en un centro de atención sanitaria (por ej. un hospital o una unidad de cuidados intensivos))) de la patobiología de la enfermedad uno o más de los elementos siguientes: activación de las células endoteliales, adhesión de leucocitos al endotelio, extravasación leucocitaria del endotelio, y aumento (por ej. un aumento significativo de al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95%) de la expresión (proteína o ARNm) en uno o más VCAM-1, E-selectina, o ICAM-1 en el endotelio en comparación con un sujeto de control (por ej. un sujeto sano o asintomático, un sujeto al que no se le ha diagnosticado una enfermedad inflamatoria vascular, un sujeto que no presenta uno o más síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular, el mismo sujeto antes de desarrollar uno o más síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular, el mismo sujeto antes del diagnóstico de una enfermedad inflamatoria vascular, o el mismo sujeto en una fase más temprana de la enfermedad inflamatoria vascular). Algunos ejemplos de enfermedades inflamatorias vasculares incluyen inflamación de los pulmones (por ej. lesión pulmonar aguda, como lesión pulmonar aguda inducida por sepsis), asma, aterosclerosis, artritis, accidente cerebrovascular, síndrome del intestino irritable, enfermedad cardiovascular, infarto de miocardio, enfermedad de las arterias coronarias, fallo cardíaco, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y enfermedad arterial periférica.

Como se ha descrito anteriormente, el NF-PB está implicado en el desarrollo de enfermedades inflamatorias vasculares. Por ejemplo, la señal de NF-PB media en la expresión regulada al alza de VCAM-1, E-selectina e ICAM-1 en las células endoteliales, que median en la unión de los leucocitos y permiten la extravasación de leucocitos al punto de la lesión. La evidencia de esta conexión entre NF-PB y las enfermedades inflamatorias vasculares específicas es conocida. Por ejemplo, el NF-PB activado ha sido identificado *in situ* en placas ateroscleróticas humanas, pero no en vasos sin aterosclerosis (Collins et al., *J. Clin. Invest.* 107:255-264, 2001), NF-PB desempeña una función casi exclusiva en la isquemia/reperfusión (Valen et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 38:307-314, 2001) y en la fase temprana del infarto de miocardio (Shimizu et al., *Cardiovasc. Res.* 38:116-124, 1998), el NF-PB activado es una característica común en la sinovia de la artritis reumatoide humana (Marok et al., *Arthritis Rheum.* 39:583-591, 1996; Gilston et al., *Biochem. Soc. Trans.* 25:518S, 1997; Miyazawa et al., *Am. J. Pathol.* 152:793-803, 1998) y en diversos modelos animales de artritis reumatoide en ratas, artritis inducida por colágeno en ratones y artritis inducida en la pared celular de estreptococo en ratas (Makarov et al., *Arthritis Res.* 3:300-206, 2001), y una activación superior de NF-PB se ha documentado en muestras de biopsias de colon, así como en células mononucleares de lámina propia de pacientes con enfermedad de Crohn (Ellis et al., *Inflamm. Res.* 47:440- 445, 1998).

Un profesional de la salud (por ej. un médico, un enfermero, un auxiliar o un técnico de laboratorio) puede diagnosticar que un sujeto padece una enfermedad inflamatoria vascular o puede controlar la gravedad, frecuencia o duración de uno o más (por ej. dos, tres, cuatro, cinco o seis) síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular en un sujeto (por ej. en un sujeto que recibe una o más dosis de un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1). Este diagnóstico se puede realizar utilizando métodos conocidos en la técnica (por ej. por la evaluación de uno o más síntomas físicos de una enfermedad inflamatoria vascular conocida en la técnica o pruebas de diagnóstico, como las que se describen en Maksimowic-McKinnon et al., *Curr. Opin. Rheumatol.* 16:18-24, 2004). Otros análisis de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias vasculares específicas son conocidos en la técnica (por ej. proteína C-reactiva y citoquinas proinflamatorias, como TNF- α and IL-1). Un sujeto diagnosticado de enfermedad inflamatoria vascular o que recibe tratamiento para una enfermedad inflamatoria vascular puede ser ingresado en un centro de atención sanitaria (por ej. un hospital, una unidad de cuidados intensivos o un centro de residencia asistida).

Indicaciones adicionales

Como se ha descrito anteriormente, además de su papel en las enfermedades inflamatorias vasculares, el NF-PB está implicado en otros estados patológicos, que no forman parte de la invención. Por ejemplo, la señal de NF-PB está implicada en la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes (tipo I y II), infecciones víricas (por ej. SIDA), cáncer, enfermedad de Alzheimer, distrofia muscular, reabsorción ósea, isquemia/reperfusión, hipertrofia cardíaca, incontinenia pigmentaria, displasia ectodérmica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, gastritis asociada a *helicobacter pylori*, enfermedades renales, apnea del sueño, enfermedades cutáneas, lupus, envejecimiento y dolor de cabeza. Los mutantes transdominantes de IPBa que bloquean la inducción de NF-PB también inhiben la infección por VIH-1 de novo en células T interfiriendo en la replicación viral, lo que indica que NF-PB fomenta la patogénesis del VIH-1 en células infectadas (Quinto et al., *J. Bio. Chem.* 274:17567-17572, 1999; Kwon et al., *J. Biol. Chem.* 273:7431-7440, 1998). La capacidad de NF-PB para contener la apoptosis e inducir la expresión de protooncogenes, como c-myc y ciclina D1, que estimulan directamente la proliferación, sugiere que NF-PB participa en muchos aspectos de la oncogénesis (Pahl, *Oncogene* 18:6853-6866, 1999; Guttridge et al., *Mol. Cell Biol.* 19:5785-5799, 1999). NF-PB también regula la expresión de diversas moléculas, como proteínas de adhesión celular, metaloproteinasas de matriz, ciclooxigenasa 2, sintasa de óxido nítrico inducible, quimioquinas y citoquinas inflamatorias, que promueven todas ellas la invasión de células tumorales y la angiogénesis (Bharti et al., *Biochem. Pharmacol.* 64:883-888, 2002). Además, las evidencias acumuladas implican a los radicales libres y la señal de NF-PB en la destrucción del islote (3 células y progresión de la diabetes (Ho et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:205-213, 1999). Una vía de señal de NF-PB elevada también se observó en las fibras del músculo esquelético de pacientes con polimiositis, dermatomiositis, y distrofia muscular de Duchenne (Monici et al., *Neurology* 60:993-997, 2003). La inmunorreactividad de NF-PB también se encontró en los tipos tempranos de placas neuríticas de la enfermedad de Alzheimer (Kaltschmidt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:9409-9414, 1999; O'Neill et al., *Trends Neurosci.* 20:252-258, 1997). La activación incrementada de NF-PB también se ha documentado en lesiones de esclerosis múltiple activas (Bonetti et al., *Am. J. Pathol.* 155:1433-1438, 1999; Gveric et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57:168-178, 1998). Por otra parte, la señal de NF-PB ha desempeñado un papel mecanicista en la reabsorción ósea (Kumar et al., *J. Mol. Med.* 82:434-448, 2004).

Dado que la señal de NF-PB está implicada en el desarrollo o la progresión de estos estados patológicos, el tratamiento de estos estados patológicos también se puede hacer, en parte, administrando un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de miR-181b maduro (ID SEC. N°: 1), tal y como se describe para las enfermedades inflamatorias vasculares más abajo, que no forma parte de la divulgación.

MiR-181b

Los miARN son un tipo de pequeños fragmentos de ARN monocatenario no codificante que típicamente se unen a la región 3' no traducida (3'-UTR) de secuencias de ARNm diana, un efecto que provoca la reducción de la expresión de proteína de forma predominante mediante la desestabilización de ARNm diana y/o la inhibición de la traducción (Baek et al., *Nature* 455:64-71, 2008; Bartel, *Cell* 136:215-233, 2009; Guo et al., *Nature* 466:835-840, 2010; Valencia-Sanchez et al., *Genes Dev.* 20:515-524, 2006). A pesar de que hay más de 1000 secuencias de miARN humano

maduro inscritas en el registro de miARN, solo un pequeño grupo se ha caracterizado como reguladores funcionales de la respuesta leucocitaria o inflamatoria de las células endoteliales.

miR-181b pertenece a la familia de miR-181 que se compone de cuatro miembros: miR-181a, miR-181b, miR-181c, y miR-181d. Las funciones biológicas de esta familia de miARN se identificaron por primera vez cuando se reconoció que miR-181a contribuía al compromiso del linaje hematopoyético y a la diferenciación (Chen et al., *Science* 303:83-86, 2004; Li et al., *Cell* 129:147-161, 2007). Estudios posteriores revelaron que el aumento de la actividad de miR-181a en las células endoteliales linfáticas embrionarias primarias se tradujo en unos niveles sustancialmente reducidos de ARNm de Prox1 y proteína y, por consiguiente, en un desarrollo vascular regulado y la neoinfangiogénesis (Kazenwadel et al., *Blood* 116:2395-2401, 2010). MiR-181b se definió como un regulador del repertorio de anticuerpos primarios de células B basados en su capacidad para limitar la actividad de la deaminasa de citidina inducida por activación (de Yebenes et al., *J. Exp. Med.* 205:2199-2206, 2008). Los miembros de la familia miR-181 pueden tener funciones no redundantes, tal y como sugieren los datos descritos aquí y un estudio en el que miR-181a, pero no miR-181c, promovió el desarrollo de células T positivas tanto en CD4 como en CD7 cuando se expresaron ectópicamente en células progenitoras tímicas (Liu et al., *PLoS One* 3:e3592, 2008).

Se descubrió que miR-181b es el miembro dominante de la familia miR-181 expresado en las células endoteliales y se demostró que es capaz de contener de forma más potente la activación de las células endoteliales que el siguiente miembro de la familia con unos niveles de expresión más elevados (miR-181a) (Figura 2E). También se descubrió que miR-181b se dirige a la región 3'-UTR de la importina- α 3: una proteína que media en la translocación de NF-PB del citoplasma hacia el núcleo.

Las importinas son una familia de proteínas implicadas en la translocación nuclear. Utilizando una combinación de enfoques experimentales, incluyendo bioinformáticos, ensayos del indicador de 3'-UTR, y miRPN-IP, se demostró que miR-181b se dirige directamente a la importina- α 3 expresada en EC en respuesta al TNF- α . Por otra parte, la sobreexpresión de importina- α 3 (que carece de su región 3'-UTR) rescató eficazmente la inhibición mediada por miR-181b de la actividad inducida por NF-PB (Figura 7F).

El miR-181b humano maduro tiene la secuencia de: aacaucauugcugucgguggu (ID SEC. Nº: 1). El miR-181b maduro es generado por el procesamiento de una molécula de miARN precursora, por ej. una secuencia de horquilla precursora de miR-181b (hsa-mir-181b-1) codificada en el cromosoma 1 (Lim et al., *Science* 299:1540, 2003) (CCUGUGCAGAAUU AUUUUUAAAAGGUCACAAUCAACAUUCAUUGCUGU CGGUGGUUGAACUGUGUGGACAAGCUCACUGAACAAUGAAUGCAACUGU GGCCCCGCUU; ID SEC. Nº: 2) o una secuencia de horquilla precursora de miR-181b (hsa-mir-181b-2) codificada en el cromosoma humano 9 (Weber, *FEBSJ.* 272:59-73, 2005) (CUGAUGGCUGCACUCAACAUAU C AUU GCU GU CGGU GGGUUU G AGU CU GAAU C AACU C ACU G AU C AAU GAAU G CAAACUGCGGACCAAACA; ID SEC. Nº: 3). En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, un ácido nucleico que contiene la ID SEC. Nº: 2 o ID SEC. Nº: 3 se administra a un sujeto.

El ácido nucleico descrito en el presente documento para el uso en un método de tratamiento de la aterosclerosis en un sujeto, donde el método incluye la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho ácido nucleico, y donde el ácido nucleico comprende la secuencia de miR-181b maduro (ID SEC. Nº: 1). A continuación se describen diversos ejemplos de estos ácidos nucleicos. Un ácido nucleico que contiene la secuencia de miR-181b maduro (ID SEC. Nº: 1) puede incluir una o más de las modificaciones que se describen en el presente documento, sin limitación.

Ácidos nucleicos

En el presente documento se describe un ácido nucleico para el uso en métodos para el tratamiento o el retraso de la aparición de aterosclerosis que incluyen la administración de un ácido nucleico que contiene la secuencia de miR-181b maduro (ID SEC. Nº: 1). El ácido nucleico puede ser, por ej. un oligonucleótido antisentido que contiene la secuencia de miR-181b maduro (ID SEC. Nº: 1); en algunas realizaciones, tal y como se describe detalladamente más abajo, el ácido nucleico incluye diferentes modificaciones, por ejemplo, en la red troncal del azúcar, para que sea más permeable a las células y resistente a la nucleasa por una parte, y fisiológicamente no tóxico a bajas concentraciones por otra. Los ácidos nucleicos para el uso en la práctica de los métodos descritos en el presente documento, que contienen la secuencia de miR-181b maduro (ID SEC. Nº: 1), pueden ser aquellos que se unen a la región 3'-UTR de la importina- α 3 (por ej. se unen a una parte del sitio 1 o del sitio 2 de la región 3'-UTR del ARNm de una importina- α 3 como se muestra en la Figura 8A) y/o previenen la traducción del ARNm de la importina- α 3, como el ARN de interferencia, incluyendo, entre otros, shRNA o siRNA.

Ácidos nucleicos inhibidores

Entre los ácidos nucleicos útiles en los presentes métodos y composiciones se incluyen microARN, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siARN, compuestos de ARN de interferencia (ARNi) monocatenario o bicatenario como compuestos de siARN, bases modificadas/ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y otros compuestos oligoméricos o miméticos de oligonucleótidos que contienen la totalidad o una parte de la secuencia de miR-181b maduro (ID SEC. Nº: 1) y/o se hibridan al menos con una porción de la región 3'-UTR de importina-3 α (por ej. el sitio 1 o el sitio 2 de la región 3'-UTR del ARNm de la importina- α 3 mRNA como se muestra en la Figura 8A) y modulan su expresión. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos incluyen microARN, ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido

quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (ARNi), ARN corto de interferencia (siARN), micro ARN de interferencia (miARN), ARN corto temporal (stARN), o ARN de horquilla corta (shARN), ARN corto que induce la activación génica (ARNa), ARN corto de activación (saARN) o combinaciones de estos. Ver, por ej. WO 10/040112.

5 El ácido nucleico de la invención comprende la secuencia de ID SEC. N°: 1 como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones de la divulgación, los ácidos nucleicos tienen entre 10 y 120, 10 y 110, 10 y 100, 10 y 90, 10 y 80, 10 y 70, 10 y 60, 10 y 50, 13 y 50, 13 y 30, o 15 y 25 nucleótidos de longitud. Un experto en la técnica apreciará que esto abarca, como parte de la divulgación, oligonucleótidos que tienen porciones antisentido de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 10 45, 46, 47, 48, 49, o 50 nucleótidos de longitud o cualquier rango intermedio. En algunas realizaciones de la divulgación, los oligonucleótidos tienen 15 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de la divulgación, los compuestos de oligonucleótidos o antisentido tienen 12 o entre 13 y 30 nucleótidos de longitud. Un experto en la técnica apreciará que esto abarca, como parte de la divulgación, ácidos nucleicos que tienen porciones antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud o cualquier rango intermedio. El ácido nucleico contiene 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23 nucleótidos continuos de la ID SEC. N°: 1. En otras realizaciones de la divulgación, el ácido nucleico contiene la totalidad o una parte (por ej. al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, o 100 nucleótidos de la ID SEC. N°: 2 o ID SEC. N°: 3).

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden estar diseñados para dirigirse a la región 3'-UTR de la importina- α 3 como se describe en los ejemplos (por ej. sitio diana 1 y/o sitio 2 de la 3'-UTR del ARNm de una importina- α 3 mRNA como se muestra en la Figura 8A). Alternativa o adicionalmente, las regiones altamente conservadas dentro del ARNm de la importina- α 3 se pueden establecer como diana, por ejemplo regiones identificadas alineando secuencias de diferentes especies como un primate (por ej. un humano) y un roedor (por ej. un ratón) y buscando regiones con elevados grados de identidad. El porcentaje de identidad se puede determinar rutinariamente utilizando herramientas de búsqueda de alineamiento local básicas (programas BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990; Zhang y Madden, *Genome Res.*, 7:649-656, 1997), por ejemplo utilizando los parámetros por defecto.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son oligonucleótidos quiméricos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, compuestas cada una de ellas al menos por un nucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región de nucleótidos modificada que confiere una o más propiedades beneficiosas (como, por ej. mayor resistencia a la nucleasa, mayor absorción en las células, mayor afinidad de unión con la diana) y una 30 región que es un sustrato para enzimas capaces de clivar híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. Los ácidos nucleicos quiméricos utilizados en los métodos pueden estar formados como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos como los descritos en el presente. Estos compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gámperos. Entre las patentes USA representativas que explican la preparación de estas estructuras híbridas se incluyen las Patentes USA N° 5 013 830; 5 149 797; 5 220 007; 5 256 775; 5 366 878; 5 403 711; 5 491 133; 5 565 350; 5 623 065; 5 652 355; 35 5 652 356; y 5 700 922.

En algunas realizaciones, cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento contiene al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, más preferiblemente un nucleótido modificado en 2'-O-alquilo 2'-O-alquilo-O-alquilo, o 2'-fluoro. En otras realizaciones preferibles, las modificaciones del ARN incluyen modificaciones 40 en 2'-fluoro, 2'-amino, y 2' O-metilo en la ribosa de pirimidinas, un residuo básico, o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Estas modificaciones se incorporan rutinariamente a los oligonucleótidos y se ha demostrado que estos oligonucleótidos tienen una Tm superior (es decir, una afinidad de unión superior con la diana) que los 2'-desoxioligonucleótidos frente a una diana dada.

Se ha demostrado que una serie de modificaciones del nucleótido y el nucleósido permiten que el oligonucleótido en el que se incorporan sea más resistente a la digestión de nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo; estos oligonucleótidos modificados sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos no modificados. Entre los ejemplos específicos de oligonucleótidos modificados se incluyen aquellos que comprenden redes troncales modificadas, como por ejemplo fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, alquilos de cadena corta, o enlaces interazúcar de cicloalquilo, o enlaces interazúcar heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Más preferibles son 50 los oligonucleótidos con redes troncales de fosforotioato y aquellos con una red troncal de heteroátomos, particularmente $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$ (denominada red troncal de metileno(metilimino) o MMI), redes troncales de $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ y $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2$, donde la red troncal de fosfodiéster nativa está representada como O-P-O-CH_2 ; redes troncales de amida (ver De Mesmaeker et al. *Ace. Chem. Res.* 28:366-374, 1995); estructuras de red troncal de morfolino (ver la Patente USA N° 5 034 506); y la red troncal de ácido nucleico peptídico (PNA) (donde la red troncal de fosfodiéster del oligonucleótido es sustituida por una red troncal de poliamida, y donde los nucleótidos se unen directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la red troncal de poliamida, ver Nielsen et al., *Science* 254:1497, 1991). Los enlaces que contienen fósforo incluyen, entre otros, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilfosfonatos y otros alquilfosfonatos que comprenden 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, 60 fosforamidatos que comprenden 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfonatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos de estos unidos en 2'-5', y aquellos que tienen una polaridad invertida, donde los pares de unidades de nucleósidos adyacentes están unidos 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'; véanse las Patentes USA N° 3 687 808; 4 469 863; 4 476 301; 5 023 243;

5 177 196; 5 188 897; 5 264 423; 5 276 019; 5 278 302; 5 286 717; 5 321 131; 5 399 676; 5 405 939; 5 453 496; 5 455 233; 5 466 677; 5 476 925; 5 519 126; 5 536 821; 5 541 306; 5 550 111; 5 563 253; 5 571 799; 5 587 361; y 5 625 050.

5 Los compuestos oligoméricos basados en morfolino se describen en Braasch y Corey, *Biochemistry* 41(14):4503-4510, 2002; *Genesis*, volumen 30, número 3, 2001; Heasman, J., *Dev. Biol.* 243:209-214, 2002; Nasevicius et al., *Nat. Genet.* 26:216-220, 2000; Lacerra et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9591-9596, 2000; y en la Patente USA Nº 5 034 506. Los miméticos de oligonucleótidos de ácido nucleico de ciclohexenilo se describen en Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.* 122:8595-8602, 2000.

10 Las redes troncales de oligonucleótidos modificados que no incluyen un átomo de fósforo tienen redes troncales que están formadas por enlaces internucleósidos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósidos mixtos de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos comprenden aquellos que tienen enlaces de morfolino (formados en parte por la porción de azúcar de un nucleósido); redes troncales de siloxano; redes troncales de sulfido, sulfóxido y sulfona; redes troncales de formacetilo y tioformacetilo; redes troncales de metilenoformacetilo y tioformacetilo; redes troncales que contienen alqueno; redes troncales de sulfamato; redes troncales de metileno y metilenoimidato; redes troncales de sulfonato y sulfonamida; redes troncales de amida; y otras que tienen partes componentes mixtas de N, O, S y CH₂; ver las Patentes USA Nº 5 034 506; 5 166 315; 5 185 444; 5 214 134; 5 216 141; 5 235 033; 5 264 562; 5 264 564; 5 405 938; 5 434 257; 5 466 677; 5 470 967; 5 489 677; 5 541 307; 5 561 225; 5 596 086; 5 602 240; 5 610 289; 5 602 240; 5 608 046; 5 610 289; 5 618 704; 5 623 070; 5 663 312; 5 633 360; 5 677 437; y 5 677 439.

20 También se pueden incluir una o más fracciones de azúcar sustituidas, por ejemplo una de las siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃OCH₃, OCH₃O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂ u O(CH₂)_n CH₃ donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo inferior, alcoxilalcoxi, alquilo inferior sustituido, alcarilo, o alcarilo C1 a C10; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de clivaje de ARN; un grupo indicador; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes con propiedades similares. Una modificación preferible incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también denominado 2'-O-(2-metoxietilo)] (Martin et al, *Helv. Chim. Acta* 78:486, 1995). Otras modificaciones preferibles incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-propoxi (2'-OCH₂ CH₂CH₃), y 2'-fluoro (2'-F). También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones del oligonucleótido, particularmente en la posición 3' del azúcar en el extremo terminal 3' del nucleótido y la posición 5' del extremo terminal 5 del nucleótido. Los oligonucleótidos pueden tener también miméticos del azúcar como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

35 Cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente puede incluir también, adicional o alternativamente, modificaciones o sustituciones en la nucleobase (en la técnica denominada a menudo simplemente "base»). Tal como se usa aquí, las nucleobases "sin modificar" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C), y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen nucleobases que solo se encuentran con poca frecuencia o temporalmente en ácidos nucleicos naturales, por ejemplo hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2' desoxicitosina y a menudo denominada en la técnica 5-Me-C), 5- hidroximetilcitosina (HMC), glicosilo HMC y gentobiosilo HMC, así como nucleobases sintéticas, por ejemplo 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromuracilo, 5- hidroximetiluracilo, 8- azaguanina, 7-deazaguanina, N₆ (6-aminohehexil)adenina y 2,6-diaminopurina. Komberg, A., *DNA Replication*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp75-77, 1980; Gebeyehu, G., et al. *Nucl. Acids Res.* 15:4513, 1987). Una base "universal" conocida en la técnica, como inosina, también se puede incluir. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-Me-C aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., en Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, pp. 276-278, 1993) y son en la actualidad sustituciones de bases preferibles.

50 No es necesario que todas las posiciones de un oligonucleótido dado sea modificado uniformemente; de hecho, más de una (por ej. dos, tres, cuatro o cinco) de las modificaciones mencionadas puede ser incorporada en un único oligonucleótido o incluso en un único nucleósido de un oligonucleótido. Dentro de un ácido nucleico dado utilizado en los métodos descritos aquí, uno o más (por ej. al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15) de los nucleótidos puede ser modificado utilizando cualquiera de las modificaciones descritas en el mismo (por ej. azúcar, base o enlace internucleósido).

55 En algunas realizaciones, tanto un enlace de azúcar como un enlace internucleósido, es decir la red troncal de las unidades del nucleótido, son sustituidos por grupos nuevos. Las unidades base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado (por ej. la región 3'-UTR de importina-α3). Uno de estos compuestos oligoméricos, un mimético de oligonucleótido que se ha demostrado que tiene unas propiedades de hibridación excelentes, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos de PNA, la red troncal de azúcar de un oligonucleótido es sustituida por una red troncal que contiene amida, por ej. una red troncal de aminoetilglicina. Las nucleobases se conservan y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la red troncal. Algunas Patentes USA representativas que explican la preparación de compuestos de PNA comprenden,

entre otras, las Patentes USA Nº 5 539 082; 5 714 331; y 5 719 262. Se puede encontrar más información sobre los compuestos de PNA en Nielsen et al, *Science* 254:1497-1500, 1991.

Algunos ácidos nucleicos también pueden incluir una o más (por ej. al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15) modificaciones o sustituciones en la nucleobase (en la técnica denominada a menudo simplemente "base"). A efectos del presente documento, las nucleobases "sin modificar" o "naturales" comprenden las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C), y uracilo (U). Las nucleobases modificadas comprenden otras nucleobases sintéticas y naturales como: 5-metilcitosina (5-me-C); 5-hidroximetil citosina; xantina; hipoxantina; 2-aminoadenina; 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina; 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina; 2-tiouracilo; 2-tiotimina; 2-tiocitosina; 5-halouracilo y citosina; 5-propinil uracilo y citosina; 6- azo uracilo, citosina, y timina; 5-uracilo (pseudo-uracilo); 4-tiouracilo; 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo, y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas; 5-halo, particularmente 5- bromo, 5-trifluorometilo, y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos; 7- metilguanina; 7-metiladenina; 8-azaguanina; 8-azaadenina; 7-deazaguanina; 7-deazaadenina; 3-deazaguanina; y 3-deazaadenina.

Asimismo, las nucleobases comprenden las divulgadas en la Patente USA Nº 3 687 808, las divulgadas en "The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering", páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., Ed. John Wiley & Sons, 1990, las divulgadas por Englisch et al., *Angewandte Chemie*, International Edition, volumen 30, página 613, 1991, y las divulgadas por Sanghvi, Y. S., capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, páginas 289- 302, Croke, S.T. y Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos utilizados en los métodos descritos en el presente documento. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas, y N-2, N-6 y purinas 0-6 sustituidas, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo, y 5- propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., Croke, S. T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, pp. 276-278, 1993) y son en la actualidad sustituciones de bases preferibles, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-O metoxietilo. Las nucleobases modificadas se describen en las Patentes USA Nº 3 687 808, 4 845 205; 5 130 302; 5 134 066; 5 175 273; 5 367 066; 5 432 272; 5 457 187; 5 459 255; 5 484 908; 5 502 177; 5 525 711; 5 552 540; 5 587 469; 5 596 091; 5 614 617; 5 750 692; y 5 681 941.

En algunas realizaciones, cualquiera de los ácidos nucleicos descritos aquí están químicamente unidos a uno o más (por ej. dos, tres, cuatro, cinco o seis) fracciones o conjugados (por ej. un polímero, un péptido o un polisacárido) que mejoran la actividad, distribución celular o absorción celular del oligonucleótido. Estas fracciones comprenden, entre otras, fracciones de lípidos como una fracción de colesterol (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:6553-6556,1989), ácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:1053- 1060, 1994), un tioéter, por ejemplo hexil-S- tritilitol (Manoharan et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660:306-309, 1992; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3:2765-2770, 1993), un tiocolesterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.* 20:533-538, 1992), una cadena alifática, por ejemplo residuos de dodecandiol o undecilo (Kabanov et al., *FEBS Lett.* 259:327-330, 1990; Svinarchuk et al., *Biochimie* 75:49- 54, 1993), un fosfolípido, por ejemplo di-hexadecil-rac- glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil- rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.* 36:3651-3654, 1995; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*18:3777-3783, 1990), una poliamina, una cadena de polietilenglicol, o una cadena de polialquilenglicol (Mancharan et al., *Nucleosides & Nucleotides* 14:969-973, 1995), o ácido acético de adamantano (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.* 36:3651-3654, 1995), una fracción de palmitilo (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1264:229-237, 1995), o una fracción de octadecilamina o hexilamino-carbonil-t-oxicoesterol (Croke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:923-937, 1996). Ver las Patentes USA Nº 4 828 979; 4 948 882; 5 218 105; 5 525 465; 5 541 313; 5 545 730; 5 552 538; 5 578 717; 5 580 731; 5 580 731; 5 591 584; 5 109 124; 5 118 802; 5 138 045; 5 414 077; 5 486 603; 5 512 439; 5 578 718; 5 608 046; 4 587 044; 4 605 735; 4 667 025; 4 762 779; 4 789 737; 4 824 941; 4 835 263; 4 876 335; 4 904 582; 4 958 013; 5 082 830; 5 112 963; 5 214 136; 5 082 830; 5 112 963; 5 214 136; 5 245 022; 5 254 469; 5 258 506; 5 262 536; 5 272 250; 5 292 873; 5 317 098; 5 371 241; 5 391 723; 5 416 203; 5 451 463; 5 510 475; 5 512 667; 5 514 785; 5 565 552; 5 567 810; 5 574 142; 5 585 481; 5 587 371; 5 595 726; 5 597 696; 5 599 923; 5 599 928 y 5 688 941.

Estas fracciones o conjugados pueden incluir grupos de conjugados covalentemente unidos a grupos funcionales como grupos hidroxilos primarios o secundarios. Los grupos de conjugados incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos de conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenacina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la absorción, la resistencia a la degradación y/o refuerzan la hibridación específica de una secuencia con el ácido nucleico diana (por ej. la región 3'-UTR de importina- α 3). Los grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la absorción, distribución, metabolismo o excreción de los compuestos de la presente invención. Grupos de conjugados representativos se divulgan en WO 93/007883, y en la Patente USA Nº 6 287 860. Las fracciones de conjugados incluyen, entre otras, fracciones de lípidos como una fracción de colesterol, ácido cólico, un tioéter, como hexil-5-tritilitol, un tiocolesterol, una cadena alifática, como residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, como di-hexadecil-rac- glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina, un glicol de polialquilenol o una cadena de glicol de polialquilenol, un ácido acético de adamantano, una

fracción palmítica, o una fracción de colesterol de hexilamino-carbonil-oxi u octadecilamina. Ver, por ej. las Patentes USA N° 4 828 979; 4 948 882; 5 218 105; 5 525 465; 5 541 313; 5 545 730; 5 552 538; 5 578 717; 5 580 731; 5 580 731; 5 591 584; 5 109 124; 5 118 802; 5 138 045; 5 414 077; 5 486 603; 5 512 439; 5 578 718; 5 608 046; 4 587 044; 4 605 735; 4 667 025; 4 762 779; 4 789 737; 4 824 941; 4 835 263; 4 876 335; 4 904 582; 4 958 013; 5 082 830; 5 112 963; 5 214 136; 5 082 830; 5 112 963; 5 214 136; 5 245 022; 5 254 469; 5 258 506; 5 262 536; 5 272 250; 5 292 873; 5 317 098; 5 371 241; 5 391 723; 5 416 203; 5 451 463; 5 510 475; 5 512 667; 5 514 785; 5 565 552; 5 567 810; 5 574 142; 5 585 481; 5 587 371; 5 595 726; 5 597 696; 5 599 923; 5 599 928 y 5 688 941.

Los ácidos nucleicos de la invención contienen la secuencia de miR-181b maduro (ID SEC. N°: 1), por ejemplo se hibridan suficientemente bien y con una especificidad suficiente (por ej. complementaria de una secuencia presente en la región 3'-UTR de importina- α 3, como el sitio 1 y/o el sitio 2 de la región 3'-UTR de un ARNm de importina- α 3 como la mostrada en la Figura 8A), para obtener el efecto deseado. "Complementario" se refiere a la capacidad de emparejarse, a través de enlaces de hidrógeno, de dos secuencias que comprenden bases naturalmente presentes o no, o análogas. Por ejemplo, si una base en una posición de un ácido nucleico es capaz de unirse por un enlace de hidrógeno con una base en la posición correspondiente de la diana (por ej. una base en la región 3'-UTR de importina- α 3), entonces las bases se consideran complementarias entre sí en esa posición. No se requiere una complementariedad del 100%.

En el contexto de esta invención, hibridación significa unión por un enlace de hidrógeno, que puede ser un enlace de hidrógeno Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido, entre bases de nucleótidos o nucleósidos complementarias. Por ejemplo, adenina y timina son nucleobases complementarias que se emparejan mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Complementario, tal como se usa aquí, se refiere a la capacidad de dos nucleótidos de emparejarse de forma precisa. Los ácidos nucleicos y una secuencia presente en el ARNm de una importina- α 3 (por ej. una secuencia presente en la región 3'-UTR de importina- α 3) son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes de cada molécula está ocupado por nucleótidos que pueden unirse por un enlace de hidrógeno entre sí. Por tanto, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se utilizan para indicar un grado de complementariedad o emparejamiento preciso suficiente para que se produzca una unión estable y específica entre el ácido nucleico y la secuencia diana (por ej. una secuencia presente en el ARNm de importina- α 3, como una secuencia presente en la región 3'-UTR de importina- α 3). Por ejemplo, si una base en una posición de un ácido nucleico es capaz de unirse con un enlace de hidrógeno con una base en la posición correspondiente del ARNm de una importina- α 3, entonces las bases se consideran complementarias entre sí en esa posición.

A pesar de que en algunas realizaciones es deseable una complementariedad del 100%, se entiende en la técnica que una secuencia de ácido nucleico complementaria no necesita ser 100% complementaria con la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Una secuencia de ácido nucleico complementaria, a efectos del presente método, es específicamente hibridable cuando la unión de la secuencia al ARNm de una importina- α 3 interfiere en el funcionamiento normal del ARNm de la importina- α 3 para causar una pérdida de actividad, y existe un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica de la secuencia con secuencias de ARNm no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, por ejemplo en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos o tratamiento terapéutico *in vivo*, y en el caso de ensayos *in vitro* en condiciones en las que los ensayos se realicen bajo condiciones de rigurosidad adecuadas. Por ejemplo, una concentración de sal rigurosa será normalmente inferior a unos 750 mM de NaCl y 75 mM de citrato trisódico, preferiblemente inferior a unos 500 mM de NaCl y 50 mM de citrato trisódico, y más preferiblemente inferior a unos 250 mM de NaCl y 25 mM de citrato trisódico. Se puede obtener una hibridación de baja rigurosidad en ausencia de solvente orgánico, como formamida, mientras que la hibridación de alta rigurosidad se puede obtener en presencia de al menos un 35% de formamida, y más preferiblemente al menos un 50% de formamida. Unas condiciones de temperatura rigurosas incluirán normalmente temperaturas de al menos unos 30°C, más preferiblemente de al menos unos 37°C, y más preferiblemente de al menos unos 42°C. Otros parámetros variables, como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, como dodecil sulfato sódico (SDS), y la inclusión o exclusión de ADN vehicular, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los diversos niveles de rigurosidad se consiguen combinando estas diversas condiciones según las necesidades. En una realización preferible, la hibridación se producirá a 30°C en 750 mM de NaCl, 75 mM de citrato trisódico, y 1% de SDS. En una realización más preferible, la hibridación se producirá a 37 °C en 500 mM de NaCl, 50 mM de citrato trisódico, 1% de SDS, 35% de formamida, y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado (ssADN). En la realización más preferible, la hibridación se producirá a 42°C en 250 mM de NaCl, 25 mM de citrato trisódico, 1% de SDS, 50% de formamida, y 200 µg/ml de (ssADN). Las variaciones útiles de estas condiciones resultarán claramente evidentes para los expertos en la técnica.

En la mayoría de las aplicaciones, los pasos de lavado que siguen a la hibridación también variarán por lo que respecta a la rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad de lavado se pueden definir por la concentración de sal y por la temperatura. Como anteriormente, la rigurosidad del lavado se puede aumentar reduciendo la concentración de sal o aumentando la temperatura. Por ejemplo, una concentración de sal rigurosa para los pasos de lavado será preferiblemente inferior a unos 30 mM de NaCl y 3 mM de citrato trisódico, y más preferiblemente inferior a unos 15 mM de NaCl y 1,5 mM de citrato trisódico. Las condiciones de rigurosidad de temperatura para los pasos de lavado incluirá normalmente una temperatura de al menos unos 25°C, más preferible de al menos unos 42°C, e incluso más preferiblemente de al menos unos 68°C. En una realización preferible, los pasos de lavado se realizarán a 25°C en 30 mM de NaCl, 3 mM de citrato trisódico, y 0,1% de SDS. En una realización preferible, los pasos de lavado se producirán

a 42° C en 15 mM de NaCl, 1,5 mM de citrato trisódico, y 0,1% de SDS. En una realización preferible, los pasos de lavado se producirán a 68°C en 15 mM de NaCl, 1,5 mM de citrato trisódico, y 0,1% de SDS. Otras variaciones de estas condiciones resultarán claramente evidentes para los expertos en la técnica. Las técnicas de hibridación son bien conocidas por los expertos en la técnica y se describen, por ej. en Benton y Davis (*Science* 196:180, 1977); Grunstein y Hogness (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:3961, 1975); Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, Nueva York, 2001); Berger y Kimmel (*Guide to Molecular Cloning Techniques*, Academic Press, Nueva York, 1987); y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

En general, los ácidos nucleicos útiles en los métodos descritos aquí tienen al menos una complementariedad de secuencia del 80% con una región diana del ácido nucleico diana, por ejemplo un 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de complementariedad de secuencia con la región diana del ARNm de una importina- $\alpha 3$ (por ej. una región diana de la región 3'-UTR del ARNm de la importina- $\alpha 3$, como el sitio 1 y/o el sitio 2 de la región 3'-UTR del ARNm de una importina- $\alpha 3$ como se muestra en la Figura 8A). Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 23 nucleobases del oligonucleótido antisentido son complementarias y, por tanto, se hibridarían específicamente con una región diana, representando una complementariedad del 90%. El porcentaje de complementariedad de un ácido nucleico con una región de un ácido nucleico diana se puede determinar rutinariamente utilizando herramientas de búsqueda de alineación local básicas (programas BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410, 1990; Zhang y Madden, *Genome Res.* 7:649-656, 1997). Los compuestos antisentido y otros compuestos que se pueden utilizar en los métodos que se hibridan con una secuencia diana de ARNm de importina- $\alpha 3$ se identifican a través de la experimentación rutinaria. En general, los ácidos nucleicos deben conservar la especificidad por su diana, es decir, que no se deben unir directamente ni afectar directamente de forma significativa a los niveles de expresión de transcritos distintos de la diana prevista.

Para más información sobre ejemplos de ácidos nucleicos que se pueden utilizar en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, ver USA 2010/0317718 (oligonucleótidos antisentido); USA 2010/0249052 (ácido ribonucleico bicatenario (dsARN)); USA 2009/0181914 y USA 2010/0234451 (LNA); USA 2007/0191294 (análogos de siARN); USA 2008/0249039 (siARN modificado); y WO 10/129746 y WO 10/040112 (ácidos nucleicos inhibidores).

Ácidos nucleicos antisentido

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido están típicamente diseñados para bloquear la expresión de una diana de ADN o ARN, uniéndose a la diana y deteniendo la expresión a nivel de transcripción, traducción o partición. Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención son secuencias de ácido nucleico complementarias diseñadas para hibridarse en condiciones de rigurosidad con una secuencia contigua en el ARNm de una importina- $\alpha 3$ (por ej. el sitio 1 y/o el sitio 2 de la región 3'-UTR del ARNm de una importina- $\alpha 3$ como se muestra en la Figura 8A). Por tanto, se seleccionan oligonucleótidos que tengan una complementariedad suficiente con la diana, es decir que se hibriden suficientemente bien y con una especificidad suficiente para obtener el efecto deseado.

Bases modificadas/Ácidos nucleicos bloqueados (LNA)

En algunas realizaciones, cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento contiene uno o más enlaces o bases modificados. Entre las bases modificadas se incluyen moléculas de fosforotionato, metilfosfonato, ácidos nucleicos peptídicos o ácido nucleico bloqueado (LNA). Preferiblemente, los nucleótidos modificados son moléculas de ácido nucleico bloqueado, incluyendo [alfa]-L-LNAs. Los LNA comprende análogos de ácido ribonucleico donde el anillo de ribosa está "bloqueado" por un puente de metileno entre 2'-oxígeno y 4'-carbono, es decir oligonucleótidos que contienen al menos un monómero de LNA, es decir un nucleótido de 2'-O,4'-C-metilen- β -D-ribofuranosilo. Las bases de LNA forman pares de bases de Watson-Crick estándar, pero la configuración bloqueada aumenta la tasa y estabilidad de la reacción de emparejamiento de bases (Jepsen et al., *Oligonucleotides* 14:130-146, 2004). Los LNA también tienen una afinidad aumentada con el par de bases con el ARN en comparación con el ADN. Estas propiedades hacen que los LNA sean especialmente útiles como sondas para la hibridación fluorescente in situ (FISH) y para la hibridación genómica comparativa, y como oligonucleótidos antisentido para dirigirse a los ARNm u otros ARN.

Las moléculas de LNA pueden incluir moléculas que comprenden 10-120, 10-110, 10-100, 10-90, 10-80, 10-70, 10-60, 10-50, 10-40, 10-30, por ejemplo 12-24, por ejemplo 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos en cada cadena, donde una de las cadenas es sustancialmente idéntica, por ejemplo al menos un 80% (o más, por ejemplo, un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) idéntica (por ej. tiene 3, 2, 1, o 0 nucleótido(s) no emparejado(s)) a una secuencia diana (por ej. una secuencia presente en el ARNm de una importina- $\alpha 3$, como una secuencia presente en la región 3'-UTR del ARNm de una importina- $\alpha 3$). Las moléculas de LNA pueden ser sintetizadas químicamente utilizando métodos conocidos en la técnica. Las moléculas de LNA pueden ser diseñadas utilizando cualquier método conocido en la técnica; se conocen diversos algoritmos y están disponibles en el mercado (Internet, por ej. página web de Exiqon). Ver, por ej. You et al., *Nuc. Acids. Res.* 34:e60, 2006; McTigue et al., *Biochemistry* 43:5388-405, 2004; y Levin et al., *Nuc. Acids. Res.* 34:e142, 2006. Por ejemplo, los métodos de "paseo cromosómico", similares a los utilizados para diseñar oligonucleótidos antisentido, pueden ser utilizados para optimizar la actividad inhibidora del LNA (o cualquier otro ácido nucleico descrito aquí); por ej. se puede preparar una serie de oligonucleótidos de 10-30 nucleótidos que abarquen la longitud de una secuencia de importina- $\alpha 3$ diana y, a continuación, realizar un ensayo para detectar la actividad. Opcionalmente, se pueden dejar huecos, por ejemplo de

5-10 nucleótidos o más, entre los LNA para reducir el número de oligonucleótidos sintetizados y ensayados El contenido de GC es preferiblemente de entre el 30-60%. Las directrices generales para diseñar LNA son conocidas en la técnica; por ejemplo las secuencias de LNA se unirán con fuerza con otras secuencias de LNA, por lo que es preferible evitar una complementariedad significativa dentro de un LNA. Las series contiguas de tres o más G o C, o más de cuatro residuos de LNA, deberán ser evitadas en la medida posible (por ej. puede no resultar posible con oligonucleótidos muy cortos (por ej. unos 9-10 nt)). En algunas realizaciones, los LNA son xilo-LNA. Para más información sobre LNA, ver las Patentes USA Nº 6 268 490; 6 734 291; 6 770 748; 6 794 499; 7 034 133; 7 053 207; 7 060 809; 7 084 125; y 7 572 582; y la Publicación de las Solicitudes de Patente USA Nº 2010/0267018; 2010/0261175; y 2010/0035968; Koshkin et al. *Tetrahedron* 54:3607-3630, 1998; Obika et al. *Tetrahedron Lett.* 39:5401-5404, 1998; Jepsen et al., *Oligonucleotides* 14:130-146, 2004; Kauppinen et al., *Drug Disc. Today* 2(3):287-290, 2005; y Ponting et al., *Cell* 136(4):629-641, 2009, y las referencias citadas en el presente documento.

siARN/shARN

En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede ser un ARN de interferencia, incluyendo, entre otros, un ARN corto de interferencia ("siARN") o un ARN de horquilla corta ("shARN"). Los métodos para construir ARN de interferencia son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARN de interferencia se puede construir con dos oligonucleótidos separados, donde una cadena es la cadena sentido y la otra es la cadena antisentido, donde las cadenas antisentido y sentido son autocomplementarias (es decir, cada cadena comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria con la secuencia de nucleótidos de la otra cadena; por ejemplo donde la cadena antisentido y la cadena sentido forman un dúplex o una estructura bicatenaria); la cadena antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria con una secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico diana (por ej. complementaria de una secuencia presente en el ARNm de una importina- α 3, como el sitio 1 y/o el sitio 2 de la región 3'-UTR del ARNm de una importina- α 3 como se muestra en la Figura 8A) o una porción de esta y la cadena sentido comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana (por ej. una secuencia presente en el ARNm de una importina- α 3, como el sitio 1 y/o el sitio 2 de la región 3'-UTR del ARNm de una importina- α 3 como se muestra en la Figura 8A) o una porción de esta. Alternativamente, el ARN de interferencia se construye con un único oligonucleótido, donde las regiones sentido y antisentido autocomplementarias están unidas por medio de un ligador o ligadores basados en ácido nucleico o no basados en ácido nucleico. El ARN de interferencia puede ser un polinucleótido con un dúplex, un dúplex asimétrico, una horquilla, o una estructura secundaria de horquilla asimétrica, que tienen regiones sentido y antisentido complementarias, donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria con la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico diana separada o una porción de esta y la región sentido tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una porción de esta. El ARN de interferencia puede ser un polinucleótido monocatenario circular que tiene dos o más estructuras de bucle y un tallo que comprenden regiones sentido y antisentido complementarias, donde la región antisentido comprende la secuencia de nucleótidos que es complementaria con la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico diana o una porción de esta y la región sentido tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una porción de esta, y donde el polinucleótido circular se puede procesar *in vivo* o *in vitro* para generar una molécula de siARN activa capaz de mediar en la interferencia del ARN.

En algunas realizaciones, la región que codifica el ARN de interferencia codifica una molécula de ARN autocomplementaria que tiene una región sentido, una región antisentido y una región de bucle. Esta molécula de ARN cuando se expresa de forma deseable forma una estructura de "horquilla" y en el presente documento se denomina "shARN". La región de bucle tiene generalmente entre unos 2 y 10 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la región de bucle tiene entre unos 6 y 9 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la región sentido y la región antisentido tienen entre unos 15 y 20 nucleótidos de longitud. Después de la transformación postranscripcional, el ARN de horquilla corta se convierte en un siARN por un evento de clivaje mediado por la enzima Dicer, que es miembro de la familia de las RNasa III. Después el siARN es capaz de inhibir la expresión de un gen con el que comparte homología. Para los detalles, ver Brummelkamp et al., *Science* 296:550-553, 2002; Lee et al., *Nature Biotechnol.* 20:500-505, 2002; Miyagishi y Taira, *Nature Biotechnol.* 20:497-500, 2002; Paddison et al., *Genes & Dev.* 16:948-958, 2002; Paul, *Nature Biotechnol.* 20:505-508, 2002; Sui, *Proc. Natl. Acad. Soc. U.S.A.* 99(6):5515-5520, 2002; Yu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:6047-6052, 2002.

La reacción de clivaje del ARN diana guiada por siARN es altamente específica de una secuencia. En general, el siARN que contiene una secuencia de nucleótidos idéntica a una porción del ácido nucleico diana es preferible para la inhibición. Sin embargo, una identidad de secuencia del 100% entre el siARN y el gen diana no es necesaria para la práctica de la presente invención. Por tanto, los métodos proporcionados ofrecen la ventaja de poder tolerar variaciones de la secuencia que cabría esperar debido a mutación genética, polimorfismo de la cadena o divergencia evolutiva. Por ejemplo, se ha descubierto que las secuencias de siARN con inserciones, deleciones y mutaciones en un solo punto en comparación con la secuencia diana también son efectivas para la inhibición. Alternativamente, las secuencias de siARN con inserciones o sustituciones análogas de nucleótidos pueden ser efectivas para la inhibición. En general, los siARN deben conservar la especificidad por su diana, es decir que no se deben unir directamente ni afectar directamente de forma significativa a los niveles de expresión de transcritos distintos de la diana prevista (por ej. un ARNm de importina- α 3).

Ribozimas

También se pueden utilizar moléculas de ácido nucleico enzimático de transclivaje; estas han demostrado ser prometedoras como agentes terapéuticos para la patología humana (Usman & McSwiggen, *Ann. Rep. Med. Chem.* 30:285-294, 1995; Christoffersen y Man; *J. Med. Chem.* 38:2023- 2037, 1995). Las moléculas de ácido nucleico enzimático pueden ser diseñadas para clivar el ARNm de una importina- α 3 en el contexto del ARN celular. Este evento de clivaje hace que el ARNm de la importina- α 3 deje de ser funcional.

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de clivaje de ARN actúan uniéndose primero a un ARN diana. Esta unión ocurre a través de la porción de unión diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene muy próximo a una porción enzimática de la molécula que actúa para clivar el ARN diana. Por tanto, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y se une después a un ARN diana a través de un emparejamiento de bases complementarias y, una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. El clivaje estratégico de este ARN diana destruirá su capacidad para la síntesis directa de una proteína codificada (una proteína de importina- α). Una vez que el ácido nucleico enzimático se ha unido y ha clivado su diana de ARN, es liberado del ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y clivar nuevas dianas.

Varios enfoques como las estrategias de selección (evolución) *in vitro* (Orgel, *Proc. R. Soc. London, B* 205:435, 1979) han sido utilizados para desarrollar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar diversas reacciones, como el clivaje y la unión de enlaces de fosfodiéster y enlaces de amida (Joyce, *Gene*, 82:83-87, 1989; Beaudry et al., *Science* 257:635-641, 1992; Joyce, *Scientific American* 267:90-97, 1992; Breaker et al., *TIBTECH* 12:268, 1994; Bartel et al., *Science* 261:1411-1418, 1993; Szostak, *TIBS* 17:89-93, 1993; Kumar et al., *FASEB J.*, 9:1183, 1995; Breaker, *Curr. Op. Biotech.* 1:442, 1996).

20 Producción y uso de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos para el uso en los métodos descritos en el presente documento, sea ARN, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o híbridos de estos, pueden ser aislados de diversas fuentes, modificadas genéticamente, amplificadas y/o expresadas/generadas recombinantemente. Las secuencias de ácido nucleico recombinante pueden ser individualmente aisladas o clonadas y sometidas a ensayo para detectar una actividad deseada. Se puede utilizar cualquier sistema de expresión recombinante, incluyendo, por ej. sistemas de expresión de células de plantas, insectos, levaduras, mamíferos, hongos o bacterias *in vitro*. Las secuencias de ácido nucleico para el uso en los métodos descritos en el presente documento pueden ser insertadas en vectores de entrega y expresadas a partir de unidades de transcripción de los vectores. Los vectores recombinantes pueden ser vectores virales o plásmidos de ADN. La generación de la estructura del vector se puede realizar utilizando cualesquiera técnicas de ingeniería genética adecuadas bien conocidas en la técnica, incluyendo, entre otras, las técnicas estándar de PCR, síntesis de oligonucleótidos, digestión de endonucleasa de restricción, ligación, transformación, purificación de plásmidos y secuenciación de ADN, por ej. tal y 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 técnica, existen diversos vectores adecuados disponibles para la transferencia de ácidos nucleicos que contienen la ID SEC. N°: 1 a las células. La selección de un vector apropiado para la entrega de ácidos nucleicos y la optimización de las condiciones para la inserción del vector de expresión seleccionado en la célula se encuentran dentro del alcance de un experto en la técnica sin necesidad de una experimentación indebida. Los vectores virales comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene secuencias para la producción de virus recombinantes en una célula de empaquetamiento. Se pueden construir vectores virales que expresan ácidos nucleicos que contienen la ID SEC. N°: 1 basándose en redes troncales virales que incluyen, entre otras, un retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus de la viruela o alfavirus. Los vectores recombinantes capaces de expresar un ácido nucleico que contiene la ID SEC. N°: 1 se pueden administrar como se describe en el presente documento y persisten en células diana (por ej. transformantes estables).

Las secuencias de ácido nucleico que contienen la ID SEC. N°: 1 se pueden sintetizar *in vitro* con técnicas de síntesis química bien conocidas, como se describe, por ej. en Adams, *J. Am. Chem. Soc.* 105:661, 1983; Belousov, *Nucleic Acids Res.* 25:3440-3444, 1997; Frenkel, *Free Radic. Biol. Med.* 19:373-380, 1995; Blommers, *Biochemistry* 33:7886-7896, 1994; Narang, *Meth. Enzymol.* 68:90, 1979; Brown, *Meth. Enzymol.* 68:109, 1979; Beaucage, *Tetra. Lett.* 22:1859, 1981; y en la Patente USA N°: 4 458 066.

Las secuencias de ácido nucleico que contienen la ID SEC. N°: 1 se pueden estabilizar contra la degradación nucleolítica, por ejemplo mediante la incorporación de una modificación, por ejemplo una modificación del nucleótido. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que contienen la ID SEC. N°: 1 pueden incluir un fosforotioato al menos en el primer, segundo o tercer enlace internucleotídico en el extremo 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos. En otro ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede incluir un nucleótido modificado en 2', 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-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE), o 2'-O—N-metilacetamida (2'-O-NMA). En otro ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede incluir al menos un nucleótido modificado en 2'-O-metilo y en algunas realizaciones todos los nucleótidos incluyen una modificación en 2'-O-metilo. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos están "bloqueados", es decir que comprenden análogos de ácido nucleico en los que el anillo de ribosa está "bloqueado" por un puente de metileno que conecta el átomo de 2'-O con el átomo de 4'-C (ver por ej. Kaupinnen et al., *Drug Disc. Today* 2(3):287-290, 2005; Koshkin et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120(50): 13252-13253, 1998). Para obtener información sobre modificaciones adicionales, ver USA 2010/0004320, USA 2009/0298916, y USA 2009/0143326.

Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos utilizadas para la práctica de esta invención, como la subclonación, las sondas de marcado (por ej. marcado con cebador aleatorio utilizando polimerasa de Kenow, traducción de mella, y amplificación), secuenciación, hibridación y similares están ampliamente descritas en la bibliografía científica y de patentes; ver, por ej. Sambrook et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual 3d ed., 2001; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., Eds. (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2010); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual, 1990; 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.

Composiciones farmacéuticas

Los ácidos nucleicos para el uso en los métodos descritos en el presente documento pueden incluir la administración de composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen el ácido nucleico que contiene la secuencia de ID SEC. N°: 1.

En algunas realizaciones, las composiciones se formulan con un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas pueden ser administradas por vía parenteral, intramuscular, subcutánea, arterial, intravenosa, tópica, oral, o por administración local, como en un aerosol o por vía transdérmica. Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas de cualquier forma y pueden ser administradas en diferente formas de dosis unitarias, dependiendo de la condición o enfermedad y del grado de enfermedad, del estado médico de cada paciente, del método de administración preferible resultante y similares. Los datos detallados sobre las técnicas para la formulación y administración de productos farmacéuticos están ampliamente descritos en la bibliografía científica y de patentes; ver por ej. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª ed., 2005.

Los ácidos nucleicos para el uso en el método pueden ser administrados solo o en forma de un componente de una formulación farmacéutica (composición). Los compuestos pueden estar formulados para su administración de cualquier forma conveniente para uso en la medicina o veterinaria. También puede haber presentes en las composiciones agentes humectantes, emulgentes y lubricantes, como laurilsulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes, perfumes, conservantes y antioxidantes.

Las formulaciones de las composiciones que se pueden utilizar en los métodos descritos en el presente documento incluyen aquellas adecuadas para administración intradérmica, inhalación, intramuscular, subcutánea, arterial, intravenosa, oral/nasal, tópica, parenteral, rectal y/o intravaginal. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitarias y pueden estar preparadas por cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. La cantidad de ingrediente activo (por ej. una secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento) que se puede combinar con un material portador para producir una única forma de dosis variará en función del sujeto al que se vaya a tratar y del modo de administración concreto, por ejemplo por vía intravenosa o inhalación. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una única forma de dosis generalmente será aquella cantidad del compuesto que produzca un efecto terapéutico. Las formulaciones farmacéuticas de esta invención se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de productos farmacéuticos. Estos fármacos pueden contener agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes. Una formulación se puede combinar con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que resulten adecuados para su fabricación. Las formulaciones pueden comprender uno o más diluyentes, emulsionantes, conservantes, tampones, excipientes, etc., y se pueden proporcionar en forma de líquido, polvo, emulsiones, polvo liofilizado, aerosol, crema, loción, formulaciones de liberación controlada, tabletas, píldoras, geles, parches, implantes, etc.

Las formulaciones farmacéuticas para administración oral pueden ser formuladas utilizando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica, en dosis apropiadas y adecuadas. Estos vehículos permiten que los productos farmacéuticos sean formulados en forma de dosis unitarias como tabletas, píldoras, polvos, grageas, cápsulas, líquidos, pastillas, geles, jarabes, pastas, suspensiones, etc. adecuados para la ingestión por el paciente. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden ser formuladas como un excipiente sólido, opcionalmente reduciendo a polvo una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de haber añadido los compuestos adicionales adecuados, si se desea, para obtener los núcleos de las tabletas o grageas. Entre los excipientes sólidos adecuados se encuentran rellenos de carbohidratos o proteína, incluyendo, por ej. azúcares, como lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, patata u otras plantas; celulosa como metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, o carboxi-metilcelulosa de sodio; y gomas como goma arábica y tragacanto; y proteínas, por ejemplo gelatina y colágeno. se pueden añadir agentes disgregadores y solubilizantes, como polivinil pirrolidona reticulada, agar, ácido alginico, o una sal de estos, como alginato sódico. Las cápsulas duras pueden contener agentes activos mezclados con un relleno o aglomerantes como lactosa o almidones, lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los agentes activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como ácidos grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

Las suspensiones acuosas pueden contener un agente activo; secuencias de ácido nucleico que contienen la ID SEC. N°: 1, mezclada con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas, por ejemplo inyecciones intradérmicas acuosas. Estos excipientes incluyen un agente de suspensión, como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma de acacia,

y agentes dispersantes o humectantes como una fosfatina naturalmente presente (por ej. lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (por ej. estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ej. heptadecaetilen-oxicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol (por ej. monooleato de polioxietilen-sorbitol), o un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ej. monooleato de polioxietilen-sorbitano). Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes como etil o n-propil p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes, como sacarosa, aspartamo o sacarina. Las formulaciones se pueden ajustar a efectos de osmolaridad.

En algunas realizaciones, se utilizan productos farmacéuticos a base de aceite para la administración de las secuencias de ácido nucleico que contienen la ID SEC. N°: 1. Las suspensiones a base de aceite se pueden formular suspendiendo un agente activo en un aceite vegetal, como aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral como parafina líquida, o una mezcla de estos. Ver por ej. la Patente USA N° 5 716 928, que describe el uso de aceites esenciales o componentes de aceites esenciales para mejorar la biodisponibilidad y reducir la variabilidad entre sujetos y en un mismo sujeto de los compuestos farmacéuticos hidrófobos administrados por vía oral (ver también la Patente USA N° 5 858 401). Las suspensiones en aceite pueden contener un agente espesante, como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes para proporcionar una preparación oral apetecible, como glicerol, sorbitol o sacarosa. Estas formulaciones se pueden preservar añadiendo un antioxidante como ácido ascórbico. Como ejemplo de un vehículo de aceite inyectable, ver Minto, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281:93-102, 1997.

Las formulaciones farmacéuticas también pueden adoptar la forma de emulsiones de aceite en agua.

La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral, descrito en el presente documento, o una mezcla de estos. Entre los agentes emulsionantes adecuados se incluyen gomas naturalmente presentes, como goma de acacia y goma de tragacanto, fosfatidas naturalmente presentes, como lecitina de soja, ésteres o ésteres parciales obtenidos de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, como monooleato de sorbitano, y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, como monooleato de sorbitano polioxietileno. La emulsión también puede contener agentes edulcorantes y aromatizantes, como en la formación de jarabes y elixires. Estas formulaciones también pueden contener un agente demulcente, conservante o colorante. En realizaciones alternativas, las emulsiones de aceite en agua inyectables que se pueden utilizar en los métodos descritos en el presente documento comprenden un aceite de parafina, un monooleato de sorbitano, un monooleato de sorbitano etoxilado y/o un trioletato de sorbitano etoxilado.

Los compuestos farmacéuticos también se pueden administrar por vía intranasal, intraocular e intravaginal, incluyendo supositorios, insuflación, formulaciones en polvo y aerosol (para ejemplos de inhaladores, ver, por ej. Rohatagi, *J. Clin. Pharmacol.* 35:1187-1193, 1995; Tjwa, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 75:107-111, 1995). Las formulaciones en supositorios se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperaturas normales pero líquido a temperaturas corporales y que, por tanto, se fundirá en el cuerpo para liberar el fármaco. Estos materiales son manteca de cacao y polietilenglicoles.

En algunas realizaciones, los compuestos farmacéuticos pueden ser administrados transdérmicamente, por vía tópica, formulados como varillas aplicadoras, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, cremas, pomadas, pastas, gelatinas, pinturas, polvos y aerosoles.

En algunas realizaciones, los compuestos farmacéuticos también se pueden administrar como microesferas para la liberación lenta en el organismo. Por ejemplo, las microesferas se pueden administrar a través de una inyección intradérmica del fármaco que se libera lentamente de forma subcutánea; ver Rao, *J. Biomater Sci. Polym. Ed.* 7:623-645, 1995; como formulaciones en gel biodegradable e inyectable, ver, por ej. Gao, *Pharm. Res.* 12:857-863, 1995; o como microesferas para administración oral, ver, por ej. Eyles, *J. Pharm. Pharmacol.* 49:669-674, 1997.

En algunas realizaciones, los compuestos farmacéuticos se pueden administrar parenteralmente, por ejemplo por vía intravenosa (IV) o se pueden administrar en una cavidad corporal o en el lumen de un órgano (por ej. en el pulmón). Estas formulaciones pueden comprender una solución de agente activo disuelto en un portador farmacéuticamente aceptable. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua y la solución de Ringer, un cloruro de sodio isotónico. Además, se pueden utilizar aceites fijos estériles como solvente o medio de suspensión. Para este efecto se puede emplear cualquier aceite fijo suave que incluya mono o diglicéridos sintéticos. Además, también se pueden utilizar ácidos grasos como ácido oleico en la preparación de inyectables. Estas soluciones son estériles y generalmente carecen de materia no deseada. Estas formulaciones pueden ser esterilizadas con técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las formulaciones pueden contener las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables que puedan ser necesarias para aproximar condiciones fisiológicas como el ajuste del pH y agentes tampón, agentes de ajuste de la toxicidad, como acetato de sodio, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato de sodio y similares. La concentración de agente activo en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará sobre todo basándose en los volúmenes de fluido, las viscosidades, el peso corporal y similares, de conformidad con el modo de administración particular seleccionado y con las necesidades del paciente. Para la administración IV, la formulación puede ser una preparación inyectable estéril, como una suspensión oleaginoso o acuosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular utilizando agentes dispersantes o humectantes y los agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una

suspensión en un disolvente o diluyente no tóxico parenteralmente aceptable, como una solución de 1,3-butanediol. La administración se puede realizar por un bolo o por infusión continua (por ej. introducción sustancialmente ininterrumpida en un vaso sanguíneo durante un periodo de tiempo especificado).

En algunas realizaciones, los compuestos farmacéuticos y las formulaciones pueden ser liofilizados. Se pueden producir formulaciones liofilizadas estables que comprenden un ácido nucleico, liofilizando una solución que comprende un producto farmacéutico descrito en el presente documento, que incluye un ácido nucleico que contiene la ID SEC. N°: 1 y un agente de carga, por ejemplo manitol, trehalosa, rafflesina y sacarosa o mezclas de estos. Un proceso para preparar una formulación liofilizada estable puede incluir la liofilización de una solución de unos 2,5 mg/mL de proteína, unos 15 mg/mL de sacarosa, unos 19 mg/mL de NaCl, y un tampón de citrato sódico que tiene un pH superior a 5.5 pero inferior a 6.5. Ver, por ej. US 2004/0028670.

Las composiciones y formulaciones se pueden administrar utilizando liposomas. Utilizando liposomas, particularmente cuando la superficie del liposoma porta ligandos específicos para las células diana o cuando están preferiblemente dirigidos de otro modo a un órgano específico, es posible centrarse en la administración del agente activo en las células diana *in vivo*. Ver por ej. las Patentes USA N° 6.063.400 y 6.007.839; Al-Muhammed, *J. Microencapsul.* 13:293-306, 1996; Chonn, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:698-708, 1995; Ostro, *Am. J. Hosp. Pharm.* 46:1576-1587, 1989. A efectos de la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada de un material lipofílico y un interior acuoso que contiene la composición a administrar. Los liposomas catiónicos son liposomas de carga positiva que se cree que interactúan con las moléculas de ADN de carga negativa para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas sensibles al pH o de carga negativa atrapan el ADN en lugar de formar un complejo con este. Tanto los liposomas catiónicos como los no catiónicos han sido utilizados para administrar ADN a las células.

Los liposomas también pueden incluir liposomas "estabilizados estéricamente», es decir liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan a los liposomas, estos lípidos especializados dan lugar a liposomas con unos tiempos de vida de circulación mejorados en comparación con los liposomas que carecen de estos lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los que parte de la porción del lípido que forma la vesícula del liposoma comprende uno o más glicolípidos o se obtiene con uno o más polímeros hidrófilos, como una fracción de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos también se describen en la Patente USA N° 6.287.860.

30 **Ácido nucleico para el uso en métodos de tratamiento de la aterosclerosis**

En el presente documento se proporciona un ácido nucleico para el uso en métodos de tratamiento o el retraso de la aparición de aterosclerosis en un sujeto que incluye la administración al sujeto de un ácido nucleico que comprende la secuencia del miR-181b maduro (ID SEC. N°: 1) (por ej. una secuencia que contiene la ID SEC. N°: 2 o ID SEC. N°: 3).

El sujeto que puede ser tratado con el ácido nucleico para el uso en los métodos de la presente invención, al que se le puede haber diagnosticado previamente aterosclerosis, puede presentar uno o más (por ej. dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de aterosclerosis, puede tener mayor riesgo de desarrollar una aterosclerosis, puede estar ingresado en un centro médico (por ej. una unidad de cuidados intensivos), puede estar en una fase temprana de una aterosclerosis o puede estar en una fase tardía de una aterosclerosis. El sujeto puede ser un hombre, una mujer, un niño o un bebé.

El sujeto puede comenzar a recibir tratamiento en un plazo de al menos 48 horas, 36 horas, 24 horas, 20 horas, 16 horas, 12 horas o 6 horas desde su presentación ante un profesional de la salud o en un centro médico. En algunos ejemplos, el sujeto puede ya estar ingresado en un centro de atención sanitaria. El sujeto puede recibir tratamiento antes de que presente cualquier síntoma, antes de un diagnóstico de aterosclerosis, tras la indicación de que el sujeto tiene un riesgo aumentado de desarrollar una aterosclerosis, en una fase intermedia de la enfermedad (por ej. tras la presentación de uno o más síntomas de aterosclerosis) o en una fase tardía de la enfermedad (por ej. tras la presentación de uno o más síntomas graves de aterosclerosis que requieren el ingreso en un centro de atención sanitaria). El tratamiento puede ser realizado por un profesional de la salud (por ej. un médico, un enfermero o un asistente) o por el sujeto.

Un profesional de la salud puede valorar el efecto del tratamiento observando o midiendo uno o más (por ej. dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de aterosclerosis en un sujeto. Algunos ejemplos de síntomas de enfermedades inflamatorias vasculares se describen como parte de la divulgación y se pueden medir mediante un examen físico. Otros métodos moleculares para determinar la gravedad de una enfermedad inflamatoria vascular son conocidos en la técnica y también pueden ser utilizados para valorar la eficacia del tratamiento en un sujeto (por ej. niveles en suero de proteína C-reactiva y citoquinas inflamatorias, como TNF- α o IL-1). El profesional de la salud puede ajustar la frecuencia, dosis o duración del tratamiento basándose en la valoración y en la medición de uno o más (por ej. dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular en un sujeto durante el tratamiento.

Un ácido nucleico que contiene la secuencia de ID SEC. N°: 1 para el uso en un método de tratamiento de la aterosclerosis puede ser administrado para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En algunas realizaciones, para aplicaciones terapéuticas, el ácido nucleico para el uso en un método de tratamiento de la aterosclerosis se administra a un sujeto que padece aterosclerosis, o un sujeto que corre el riesgo de desarrollar aterosclerosis, en una cantidad suficiente para reducir (el número, la gravedad y/o la duración), o para detener parcialmente, uno o más síntomas (por

ej. dos, tres, cuatro, cinco o seis) de la aterosclerosis; esto se puede denominar una cantidad terapéuticamente efectiva. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se administran composiciones farmacéuticas que incluyen un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la ID SEC. N°: 1 en una cantidad suficiente para reducir (por ej. una reducción significativa de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) la adhesión leucocitaria al endotelio del sujeto, reducir (por ej. una reducción significativa de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) la extravasación leucocitaria del endotelio del sujeto, reducir (por ej. una reducción significativa de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) la expresión (proteína o ARNm) de VCAM-1, E-selectina, y/o ICAM-1 en el endotelio del paciente, reducir (por ej. una reducción significativa de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) la expresión (proteína o ARNm) de importina- α 3 en el endotelio del sujeto, y/o reducir (por ej. una reducción significativa de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) la importación de la subunidad p65 y/o p50 de NF-PB en el núcleo de una célula endotelial del sujeto en comparación con un sujeto de control (por ej. un sujeto al que no se le ha administrado el ácido nucleico o el mismo sujeto antes del tratamiento con el ácido nucleico).

La cantidad del ácido nucleico adecuada para conseguir esto es una dosis terapéuticamente efectiva. El programa de dosificación y las cantidades efectivas para este uso, es decir la posología, dependerá de diversos factores, incluyendo la fase de la enfermedad o condición, la gravedad de la enfermedad o condición, el estado de salud general del paciente, el estado físico del paciente, su edad y similares. Para calcular la posología para un paciente también se tiene en cuenta el modo de administración.

Para la posología también se tienen en cuenta parámetros farmacocinéticos bien conocidos en la técnica, es decir la tasa de absorción activa del agente, la biodisponibilidad, el metabolismo, la eliminación y similares (ver, por ej. Hidalgo-Aragones, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58:611-617, 1996; Groning, *Pharmazie* 51:337-341, 1996; Fotherby, *Contraception* 54:59-69, 1996; Johnson, *J. Pharm. Sci.* 84:1144-1146, 1995; Rohatagi, *Pharmazie* 50:610-613, 1995; Brophy, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24:103-108, 1983; Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21^a ed., 2005). El estado de la técnica permite al profesional de la salud determinar la posología para cada paciente individual, agente activo y enfermedad o condición tratada. Se pueden utilizar directrices proporcionadas para composiciones similares utilizadas como productos farmacéuticos a modo de guía para determinar la posología, es decir para determinar si el programa y los niveles de dosificación administrados para la práctica de los métodos descritos en el presente documento son correctos y apropiados.

Se puede realizar una única o múltiples administraciones de las formulaciones dependiendo, por ej. de la dosis y frecuencia necesarias y toleradas por el paciente, el grado y cantidad de efecto terapéutico generado tras cada administración (por ej. el efecto sobre uno o más síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular) y similares. Las formulaciones deberán proporcionar una cantidad suficiente de agente activo para tratar de forma eficaz, mejorar o retrasar la aparición de aterosclerosis o uno o más (por ej. dos, tres, cuatro, cinco o seis) de sus síntomas.

Uno o más (por ej. dos, tres, cuatro o cinco) ácidos nucleicos descritos en el presente documento y, opcionalmente, uno o más (por ej. dos, tres, cuatro o cinco) agentes antiinflamatorios adicionales (descritos a continuación) pueden ser administrados por vía parenteral, intramuscular, subcutánea, arterial, intravenosa, tópica, oral, o mediante administración local, por ejemplo con un aerosol o por vía transdérmica, al sujeto.

Al sujeto se le puede administrar el ácido nucleico una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana, una vez al mes, dos veces al mes, tres veces al mes, cuatro veces al mes, cinco veces al mes, seis veces al mes, siete veces al mes, ocho veces al mes, una vez cada dos meses, una vez al año, dos veces al año, tres veces al año o cuatro veces al año. Al sujeto se le puede administrar el ácido nucleico de forma continuada (por ej. durante al menos 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 1 semana) por vía intravenosa.

En realizaciones alternativas, las formulaciones farmacéuticas para administración oral contienen una cantidad diaria de entre unos 1 y 100 o más mg por kg de peso corporal por día. Se pueden utilizar dosis más bajas, a diferencia de la administración oral, en el torrente sanguíneo, en una cavidad corporal o en el lumen de un órgano (por ej. en el pulmón). Por ejemplo se puede administrar una dosis aproximada de 0,1 a 80, 0,1 a 70, 0,1 a 60, 0,1 a 50, 1 a 40, 1 a 30, 1 a 20, 0,1 a 15, 0,1 a 10, o 0,1 a 5 mg por kg de peso corporal por día al sujeto. Se pueden utilizar dosis significativamente superiores en la administración tópica u oral o en la administración en polvo, aerosol o inhalación. Los métodos reales para preparar formulaciones administrables por vía parenteral y no parenteral son bien conocidas o resultarán evidentes para los expertos en la técnica y se describen detalladamente en publicaciones como Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21^a ed., 2005.

Diversos estudios, incluyendo los datos del modelo animal proporcionados en el presente documento, han documentado una administración de dosis efectiva en mamíferos utilizando secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, Esau C., et al., *Cell Metabolism*, 3(2):87-98, 2006, documentó una administración a ratones normales de dosis intraperitoneales de un oligonucleótido antisentido miR-122 en un rango de 12,5 a 75 mg/kg dos veces a la semana durante 4 semanas. Los ratones estaban sanos y en condiciones normales al final del tratamiento, sin pérdida de peso corporal ni reducción de los alimentos ingeridos. Los niveles plasmáticos de transaminasas se encontraban dentro del rango 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,

donde se registró un incremento muy leve de los niveles de ALT y AST. Concluyeron que 50 mg/kg era una dosis efectiva y no tóxica. Otro estudio de Krutzfeldt J., et al., *Nature* 438, 685-689, 2005, inyectó un ácido nucleico para silenciar miR-122 en ratones utilizando una dosis total de 80, 160 o 240 mg por kg de peso corporal. La dosis más alta provocó una pérdida completa de la señal de miR-122. En otro estudio, los ácidos nucleicos bloqueados («LNA») se aplicaron con éxito en primates para silenciar miR-122. Elmen et al., *Nature* 452, 896-899, 2008, expone que una silenciación eficiente de miR-122 se consiguió en primates con tres dosis de 10 mg por kg de LNA-anti-miR, lo que provocó una reducción duradera y reversible del colesterol plasmático total sin ninguna evidencia de toxicidades asociadas a los LNA ni cambios histopatológicos en los animales del estudio.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente pueden incluir la administración conjunta con otros fármacos o productos farmacéuticos, por ejemplo uno o más (por ej. dos, tres, cuatro o cinco) agentes antiinflamatorios adicionales (por ej. corticosteroides, agentes inmunosupresores, antagonistas del TNF- α , como etanercept, infliximab, o adalimumab, y antagonistas de la IL-1, como anakinra). Por ejemplo, los ácidos nucleicos proporcionados se pueden administrar conjuntamente con agentes adicionales para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria vascular descrita en el presente documento. En la técnica se conocen varios agentes útiles para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria vascular.

El agente o los agentes antiinflamatorios adicionales se pueden administrar al sujeto en una dosis de entre 0,1 a 100, 0,1 a 80, 0,1 a 70, 0,1 a 60, 0,1 a 50, 1 a 40, 1 a 30, 1 a 20, 0,1 a 15, 0,1 a 10, o 0,1 a 5 mg por kg de peso corporal por día, dependiendo del agente específico y de la vía de administración. El agente o los agentes antiinflamatorios adicionales se pueden formular junto con uno o más de los ácidos nucleicos descritos en el presente en forma de una única dosis (por ej. un aerosol para inhalación, una forma sólida para administración oral o una solución para administración intravenosa). En algunas realizaciones, se puede administrar uno o más de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento que contienen la ID SEC. N°: 1 en forma de dosis separada de uno o más agentes antiinflamatorios adicionales. En algunas realizaciones, al sujeto se le administra primero al menos una dosis de un agente antiinflamatorio adicional, antes de la administración de al menos una dosis de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, al sujeto se le administra primero al menos una dosis de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento, antes de la administración de al menos una dosis de un agente antiinflamatorio adicional. En algunas realizaciones, los periodos bioactivos del ácido nucleico y del agente antiinflamatorio adicional se solapan en el sujeto.

Métodos para reducir la señal de NF-PB en una célula

También se proporcionan métodos para reducir la señal de NF-PB en una célula (por ej. una célula endotelial), administrando al menos un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de miR-181b maduro (ID. SEC. N°: 1), que no forma parte de la invención. La célula (por ej. una célula endotelial) puede estar presente en un sujeto o puede ser una célula (por ej. una célula endotelial) que está presente *in vitro* (cultivo de tejidos) o una célula que se extrae de un sujeto y se cultiva en un cultivo de tejidos (por ej. una célula endotelial *ex vivo*).

Célula en un sujeto

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula (por ej. una célula endotelial) se encuentra en un sujeto. Por ejemplo, un profesional de la salud puede determinar que un sujeto presenta o puede presentar un nivel aumentado de señal de NF-PB que contribuye a una condición patofisiológica del sujeto (por ej. una o más de las enfermedades, como una enfermedad inflamatoria vascular, descritas en el presente documento). En estos casos, un profesional de la salud puede prescribir un tratamiento del sujeto de acuerdo con los métodos proporcionados. El sujeto puede presentar uno o más síntomas de esta condición (por ej. una enfermedad inflamatoria vascular), puede haber sido previamente diagnosticado que padece esta condición (por ej. una enfermedad inflamatoria vascular), puede ser asintomático pero presentar un riesgo aumentado de desarrollar posteriormente esta condición (por ej. una enfermedad inflamatoria vascular), puede encontrarse en una fase temprana de la enfermedad (por ej. una enfermedad inflamatoria vascular), puede encontrarse en una fase tardía de la enfermedad (por ejemplo una enfermedad inflamatoria vascular), puede estar ingresado en un centro médico (por ej. un hospital, una unidad de cuidados intensivos o un centro de atención asistida), puede tener diagnosticada una infección bacteriana o se puede sospechar que presenta una infección bacteriana. El sujeto también puede presentar una o más (por ej. dos, tres, cuatro o cinco) de las características siguientes: aumento (por ej. un aumento significativo, como un aumento de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%) de la adhesión leucocitaria al endotelio de un sujeto, aumento (por ej. un aumento significativo, como un aumento de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%) de la extravasación leucocitaria del endotelio del sujeto, aumento (por ej. un aumento significativo, como un aumento de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%) de la expresión (proteína o ARNm) de uno o más de VCAM-1, E-selectina, y ICAM-1 en el endotelio, aumento (por ej. un aumento significativo, como un aumento de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%) de la expresión (proteína o ARNm) de uno o más genes regulados por la actividad de NF-PB, aumento (por ej. un aumento significativo, como un aumento de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%) de los niveles de citoquinas proinflamatorias (por ej. IL-1 y TNF- α), y aumento (por ej. un aumento significativo, como un aumento de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,

85%, 90%, 95%, o 100%) de los niveles de proteína C-reactiva. El sujeto puede ser un hombre, una mujer, un niño o un bebé.

El sujeto puede comenzar a recibir tratamiento en un plazo de al menos 48 horas, 36 horas, 24 horas, 20 horas, 16 horas, 12 horas o 6 horas desde su presentación ante un profesional de la salud o en un centro médico. El sujeto puede recibir tratamiento antes de que presente cualquier síntoma, antes de que se diagnostique que tiene una enfermedad (por ej. una enfermedad inflamatoria avascular), tras la indicación de que el sujeto tiene un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad (por ej. una enfermedad inflamatoria avascular), en una fase intermedia de la enfermedad (por ej. tras el diagnóstico o tras la presentación de uno o más síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular), en una fase tardía de la enfermedad (por ej. tras la presentación de uno o más síntomas graves de una enfermedad inflamatoria vascular que requieren el ingreso en un centro de atención sanitaria), tras el diagnóstico de una infección bacteriana o tras la sospecha de que el sujeto presenta una infección bacteriana. El tratamiento puede ser realizado por un profesional de la salud (por ej. un médico, un enfermero o un asistente) o por el sujeto.

Un profesional de la salud puede valorar el efecto del tratamiento observando o midiendo uno o más (por ej. dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de una enfermedad (por ej. una enfermedad inflamatoria vascular) en un sujeto. Algunos ejemplos de síntomas de enfermedades inflamatorias vasculares se describen en el presente documento y se pueden medir mediante un examen físico. Otros métodos moleculares para determinar la gravedad de una enfermedad (por ej. una enfermedad inflamatoria vascular) son conocidos en la técnica y también pueden ser utilizados para valorar la eficacia del tratamiento en un sujeto (por ej. niveles en suero de proteína C-reactiva y citoquinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-1). Por otra parte, la eficacia del tratamiento se puede valorar determinando si se produce: una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) de la adhesión leucocitaria en el endotelio del sujeto, una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) de la extravasación leucocitaria del endotelio del sujeto, una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) de la expresión génica inducida por NF-PB, una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) de los niveles de expresión (proteína o ARNm) de importina- α 3, una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) de los niveles de expresión (proteína o ARNm) de uno o más de ICAM-1, VCAM-1, y E-selectina, o una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) de la expresión (proteína o ARNm) de uno o más de los genes enumerados en la Figura 9A, en comparación con un sujeto de control que no ha recibido el ácido nucleico (por ej. un sujeto al que no se le ha diagnosticado o que no presenta uno o más síntomas de una enfermedad inflamatoria vascular o el mismo sujeto antes de la administración del ácido nucleico). El profesional de la salud puede ajustar la frecuencia, dosis o duración del tratamiento basándose en la valoración y en la medición de uno o más (por ej. dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de una enfermedad (por ej. una enfermedad inflamatoria vascular) en un sujeto durante el tratamiento.

Cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento se puede administrar en estos métodos,

que no forman parte de la invención. Por otra parte, cualquiera de los programas de dosificación y administración descritos en el presente documento puede ser utilizados en estos métodos que no forman parte de la invención. Tal y como se describe en el presente documento, además de administrar uno o más de los ácidos nucleicos aquí descritos, también se puede administrar uno o más agentes antiinflamatorios al sujeto. Cualquiera de las formulaciones, composiciones, programas de administración y dosificación descritos en el presente pueden ser utilizados en estos métodos, entre otros, que no forman parte de la invención.

Célula in vitro y ex vivo

Tal y como se ha indicado anteriormente, la célula (por ej. una célula endotelial) a la que se administra un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de miR-181b maduro (ID SEC. Nº: 1) puede estar presente *in vivo* o puede haber sido extraída previamente de un sujeto y tratada con el ácido nucleico en un cultivo de tejido (*ex vivo*). Una célula (por ej. una célula endotelial) extraída del sujeto y a la que se le administra el ácido nucleico en un cultivo de tejido puede ser implantada en un sujeto tras dicha administración. Por ejemplo, la célula extraída (por ej. una célula endotelial) puede ser cultivada en presencia de ácido nucleico durante al menos 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 1 semana, antes de volver a implantar la célula en el sujeto. La célula extraída del sujeto también puede ser sometida a transfección con otro ácido nucleico para inducir la expresión de una proteína terapéutica (por ej. una proteína que reduce la inflamación en un sujeto).

Un experto en la técnica podrá determinar fácilmente la cantidad de ácido nucleico necesaria para conseguir una reducción de la señal de NF-PB en la célula (por ej. célula endotelial). En la memoria se describen algunos ejemplos de métodos que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede observar una reducción de la señal de NF-PB por: una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) de la expresión génica inducida por NF-PB, una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) de la translocación nuclear de NF-PB, y una reducción (por ej. una reducción significativa, como una reducción de al menos el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%,

35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) de la unión de NF-PB a sus elementos promotores en comparación con células de control (por ej. células de control tratadas con un agente que estimula la actividad de señal de NF-PB, como TNF- α).

5 Cualquiera de los ácidos nucleicos o composiciones descritos en el presente documento se puede administrar en estos métodos.

Ejemplos

La invención se describe también en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones. Todos los ejemplos que no entran en el alcance de las reivindicaciones se facilitan solo con fines comparativos.

10 **Ejemplo 1. MiR-181b es un regulador crítico de la activación de la célula endotelial mediada por NF-PB y de la inflamación vascular *in vivo*.**

La expresión de MiR-181b en células endoteliales está regulada por el TNF- α .

15 En un intento de identificar cómo los estímulos proinflamatorios regulan la función endotelial, se realizaron estudios de caracterización de miR por microarray utilizando ARN de HUVEC expuestas al vehículo solamente o al TNF- α durante 24 h. Se observó un aumento de la expresión de miR-181b asociado al tratamiento con TNF- α de las HUVEC. Utilizando el análisis de PCR en tiempo real, se verificó la inducción de miR-181b en HUVEC en respuesta a la exposición al TNF- α : un aumento en la expresión de aproximadamente 1,3 veces a las 24 h (Figura 1A). Sorprendentemente, los puntos temporales anteriores (a 1 y 4 h) revelaron que el TNF- α inhibía la expresión de miR-181b en un 31% y 24%, respectivamente (Figura 1A).

20 El miR-181b pertenece a la familia de miR-181, que se compone de cuatro miARN maduros: miR-181a, miR-181b, miR-181c, y miR-181d. Estas secuencias maduras están codificadas por seis secuencias de miARN primarias ubicadas en tres cromosomas diferentes. Se determinó que la expresión de miR-181b era aproximadamente 12 veces más elevada que la de miR-181a y 274 veces más elevada que la de miR-181c (Figura 1B). Dado que el nivel de (pri)-miR-181d primario era muy bajo, el nivel de este miR-181d maduro no se examinó. Colectivamente, estos datos sugieren que miR-181b es el miembro de la familia de miR-181 que se expresa predominantemente en las HUVEC y que tiene un patrón de expresión bimodal en respuesta a la estimulación por la citoquina inflamatoria TNF- α .

MiR-181b inhibe la expresión inducida por TNF- α de las moléculas de adhesión e inhibe la adhesión leucocitaria a monocapas de EC activadas.

30 Para valorar el potencial papel de miR-181b en la activación endotelial, se examinó el efecto de miR-181b en la expresión génica inducida por TNF- α utilizando experimentos de ganancia y pérdida de función. La sobreexpresión de miR-181b inhibió la expresión de proteína VCAM-1, E-selectina e ICAM-1 inducida por TNF- α en un 89%, 52% y 36%, respectivamente, mientras que los inhibidores de miR-181b (antagonista complementario) aumentaron su expresión en un 138%, 53% y 31%, respectivamente (Figura C). En coherencia con estos resultados, los niveles de ARNm de VCAM-1, E-selectina e ICAM-1 fueron inferiores en las células que sobreexpresan miR-181b que en las células que sobreexpresan el control negativo de miARN; además, estos niveles de ARNm eran superiores en presencia del inhibidor de miR-181b (Figura D). Tras 1 h de tratamiento con TNF- α , las células que sobreexpresan miR-181b presentaban unos niveles reducidos de ARNm de VCAM-1, E-selectina e ICAM-1 (en un 69%, 65% y 57%, respectivamente); tras 4 h de tratamiento con TNF- α , los niveles eran del 74%, 41% y 17%, respectivamente. Por el contrario, en las células sometidas a transfección con inhibidores de miR-181b, el ARNm de VCAM-1 inducido por TNF- α aumentó en un 62% tras 1 h de tratamiento con TNF- α , y tras 3 h de tratamiento con TNF- α , los niveles de ARNm de VCAM-1, E-selectina e ICAM-1 aumentaron en un 35%, 52% y 34%, respectivamente (Figura 1D). Los efectos de miR-181b sobre los niveles de VCAM-1, E-selectina e ICAM-1 soluble en el medio de cultivo, medido por ELISA, también fueron coherentes con sus efectos sobre la expresión de ARNm y de proteína de estas moléculas de adhesión (Figura 1E). Del mismo modo, miR-181b también redujo la expresión de VCAM-1 tanto en el nivel de proteína como de ARNm en las HUVEC en respuesta al tratamiento con LPS (Figura 2A-C) y la expresión de ARNm de E-selectina y ARNm de ICAM-1 (Figura 2C).

45 Teniendo en cuenta la conclusión de que la expresión de VCAM-1 era muy sensible a miR-181b, se realizaron experimentos para determinar si el gen de VCAM-1 podría ser una diana directa de miR. Sin embargo, la sobreexpresión de miR-181b no redujo la actividad de luciferasa de una estructura de 3'-UTR de VCAM-1, lo que sugiere que la región 3'-UTR de VCAM-1 no es una diana directa de miR-181b (Figura 2D). Dado que VCAM-1, E-selectina e ICAM-1 son moléculas proinflamatorias típicas inducidas por TNF- α , estos datos sugirieron que miR-181b puede participar en la regulación de la activación de la célula endotelial. Para investigar si miR-181a, el siguiente miembro de la familia miR-181 con unos niveles de expresión más elevados en HUVEC, era capaz de provocar el mismo efecto sobre la expresión génica inducida por TNF- α que miR-181b, las HUVEC se sometieron a transfección con un control negativo de mi ARN, miR-181a, o miR-181b a diferentes concentraciones en presencia o ausencia de TNF- α , y se recogieron para un análisis por transferencia western blot para determinar la expresión de VCAM-1. Como se muestra en la Figura 2E, miR-181a inhibió la expresión de VCAM-1 inducida por TNF- α en menor medida que miR-181b a todas las concentraciones examinadas.

En respuesta a la activación de las células endoteliales, las moléculas de adhesión, como VCAM-1, E-selectina e ICAM-1, actúan para iniciar, promover y sostener la adherencia leucocitaria al endotelio vascular. Para determinar la consecuencia funcional de los efectos de miR-181b sobre la expresión de la molécula de adhesión, se realizaron ensayos de adhesión celular *in vitro* para valorar las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales. Como se preveía, el tratamiento con TNF- α aumentó significativamente las capacidades de adhesión de las células THP-1 a HUVEC sometidas a transfección con miméticos de ARNm de control no específicos (NS). Sin embargo, la adhesión se redujo de forma significativa (en un 44%) con la sobreexpresión de miR-181b, mientras que la inhibición de miR-181b aumentó la adherencia en un 50% (Figura 1F). Conjuntamente, estas conclusiones demuestran que miR-181b es capaz de afectar negativamente a la expresión de moléculas de adhesión fundamentales inducidas por estímulos proinflamatorios y que miR-181b regula dinámicamente la adhesión de leucocitos a monocapas de EC estimuladas.

MiR-181b contiene la expresión inducida por TNF- α de las moléculas de adhesión *in vivo*.

Se realizaron experimentos para determinar si la administración sistémica de miR-181b podría inhibir la expresión génica *in vivo* inducida por TNF- α . Se utilizó con éxito un atelocolágeno, un colágeno tipo I de bovino altamente purificado, para trasladar el ADN plasmídico, siARN y miARN a las células *in vitro* e *in vivo* (Ochiya et al., *Nature Med.* 5:707-710, 1999; Sano et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:1651-1677, 2003; Takeshita et al., *Methods Mol. Biol.* 487:83-92, 2009; Takeshita et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:12177-12182, 2005; Takeshita et al., *Mol. Ther.* 18:181-187, 2010; Tazawa et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:15472-15477, 2007). Para valorar los efectos de los miméticos de miR-181b sobre la expresión de VCAM-1 inducida por TNF- α *in vivo*, se mezcló miR-181b o un mimético de control no específico con atelocolágeno y se inyectó en la vena de la cola 24 h antes del tratamiento con TNF- α . Primero se examinó la expresión de proteína VCAM-1 en los tejidos pulmonares. Cuatro horas después de la inyección de TNF- α i.p., se observó una inducción de VCAM-1 de unas 3,4 veces en los tejidos pulmonares en presencia de miméticos de control no específicos. Por el contrario, la administración de miR-181b redujo claramente la inducción de la expresión de la proteína VCAM-1 (hasta unas dos veces) (Figura 3A) y la expresión de ARNm de VCAM-1 en el pulmón, la aorta, el corazón, el hígado y el bazo (Figura 3B). La expresión de ARNm de E-selectina también se redujo de forma significativa en el pulmón, el hígado y el bazo (Figura 4A), mientras que el ARNm de ICAM-1 se redujo solo en el bazo (Figura 4B).

Para volver a verificar los efectos observados sobre la expresión de VCAM-1, se examinaron secciones del pulmón y la aorta descendente por técnicas inmunohistoquímicas. El endotelio del pulmón y la aorta de los ratones en el que se había inyectado un control negativo de miARN mostró una fuerte expresión de VCAM-1 en respuesta al TNF- α (Figuras 3C-E). Por el contrario, la administración sistémica de miméticos de miR-181b redujo la inducción de la expresión de VCAM-1 en el endotelio del pulmón y la aorta (aproximadamente en un 86% y un 80%, respectivamente (Figuras 3C-E). En particular, la expresión de miR-181b en la íntima de las aortas extirpadas de los ratones inyectados con miR-181b era unas 8 veces superior que en los ratones inyectados con control negativo de miARN, medido por qPCR en tiempo real (Figura 4C). No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de miR-181b en la media y la adventicia de los ratones inyectados con miR-181b o control negativo de miARN (Figura 4C). En resumen, estos datos demostraron que los miméticos de miR-181b administrados sistémicamente estaban eficazmente enriquecidos en las células endoteliales e inhibían la expresión de moléculas de adhesión inducidas por TNF- α *in vivo*.

MiR-181b inhibe la vía de señal de NF-PB en células endoteliales activadas.

En respuesta a estímulos proinflamatorios, tanto la vía de NF-PB como de la quinasa proteína activada por mitógenos (MAP) participan en las respuestas inflamatorias en células endoteliales (Hoefen et al., *Vascul. Pharmacol.* 38:271-273, 2002; Kempe et al., *Nucleic Acids Res.* 33:5308-5319, 2005). Para examinar si miR-181b afecta a la activación de NF-PB, se realizaron experimentos para comprobar si miR-181b tiene algún efecto sobre el concatémoro de NF-PB y el promotor-indicador de VCAM-1. Como se muestra en la Figura 3A, el tratamiento de HUVEC con TNF- α indujo la actividad tanto del concatémoro de NF-PB como del promotor-indicador de VCAM-1, y la transfección conjunta de miR-181b atenuó de forma significativa esta inducción. Por el contrario, la inhibición de miR-181b potenció la actividad inducida por TNF- α (Figura 5A). El efecto de miR-181b sobre la acumulación nuclear de NF-PB se determinó posteriormente por inmunotinción para p65. Se observó una reducción cercana al 40% en la tinción nuclear de p65 en las HUVEC sometidas a transfección con miR-181b, en comparación con las células sometidas a transfección con control negativo de miARN (Figura 5B). Tras su liberación del complejo de IPB, la translocación de NF-PB del citoplasma al núcleo es un paso esencial para la activación de los genes diana de NF-PB (Oeckinghaus et al., *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 1:a000034, 2009; Vallabhapurapu et al., *Annu. Rev. Immunol.* 27:693-733, 2009), un efecto que se puede revelar por la detección de los niveles de proteína de p50 y p65 en las fracciones citoplasmática y nuclear. Como se muestra en la Figura 5C, las HUVEC que sobreexpresan miR-181b presentaron una expresión reducida de P65 y p50 en la fracción nuclear, mientras que la fracción citoplasmática mostraba una expresión de p65 y p50 aumentada. Cabe señalar que no se observaron diferencias significativas entre miR-181b y el control negativo de miARN sobre la expresión de los componentes secuencia arriba de la vía de NF-PB, incluyendo el IPB α fosforilado: un efecto que sugiere que es poco probable que miR-181b afecte a los receptores de superficie celular o a la activación del complejo IKK. Dado que varias quinasas MAP estaban implicadas en la expresión de moléculas de adhesión inducida por TNF- α , se realizaron experimentos para comprobar si miR-181b tenía algún efecto sobre la activación de tres quinasas MAP (quinasa regulada por la señal extracelular (ERK), p38 y quinasa amino-terminal jun (JNK) en respuesta al TNF- α . Como se muestra en la Figura 6, la fosforilación de ERK, p38 y JNK fue fuertemente inducida y alcanzó su nivel máximo 15 min. después del tratamiento con TNF- α . Sin embargo, la sobreexpresión de miR-181b no tuvo ningún efecto sobre su fosforilación 5, 15 y 30 minutos después del tratamiento con el TNF- α . Estos datos

sugieren que el papel inhibitorio de miR-181b sobre la expresión génica inducida por el TNF- α se debe principalmente a sus efectos sobre la vía de señal de NF-PB, al contener la translocación nuclear de NF-PB.

MiR-181b se dirige directamente a la expresión de importina- α 3, una proteína crítica para la translocación nuclear de NF-PB.

5 Estudios previos han demostrado que los NF-PB son transportados al núcleo a través de un subconjunto de moléculas de importina-a (Fagerlund et al., *J. Biol. Chem.* 280:15942-15951, 2005; Fagerlund et al., *Cell Signal.* 20:1442-1451, 2008). Hay seis parálogos de importina-a en seres humanos (importina- α 1, - α 3, - α 4, - α 5, - α 6, y - α 7) que se caracterizan por distintas afinidades con sus sustratos (Kohler et al., *Mol. Cell. Biol.* 19:7782-7791, 1999). En las células que sobreexpresan miR-181b, la expresión de importina- α 3, pero no la de importina- α 1 o importina- α 5, se redujo en un 10 46% en presencia del TNF- α (Figura 7A). La sobreexpresión de miR-181b inhibió la actividad de una estructura indicadora de luciferasa que contenía la región 3'-UTR de importina- α 3 de forma dependiente de la dosis (Figura 7B). Por el contrario, la actividad de estructuras de luciferasa que contenían la región 3'-UTR de importina- α 1, - α 4 o - α 5 no fue inhibida por la sobreexpresión de miR-181b (Figura 7C).

15 La detección de la diana de miARN de rna22 y el algoritmo de predicción permite detectar errores de emparejamiento en el miARN maduro y dirigirse a la secuencia de ARNm diana (Miranda, et al., 2006) y se ha utilizado con éxito para identificar dianas directas no previstas por otros algoritmos (Lai et al., *Mol. Cell* 35:610-625, 2009). Para identificar sitios de unión adicionales de miR-181b que pueden existir en la región 3'-UTR de la importina- α 3, se aplicó el algoritmo de predicción ma22. Los resultados identificaron ocho potenciales sitios de unión de miR-181b en la región de interés (Figura 8A). La sobreexpresión de miR-181b redujo la actividad de luciferasa en un 31% y un 20%, respectivamente, 20 para las construcciones de luciferasa-indicador que contenían el sitio de unión 1 y el sitio 2, pero no para ninguno de los restantes potenciales sitios de unión (Figura 7D). Las mutaciones dirigidas a sitios del sitio de unión 1 y del sitio 2 rescataron los efectos inhibitorios mediados por miR-181b sobre estas dos construcciones (Figura 7D). Es interesante señalar que el nivel de ARNm de importina- α 3 no se vio alterado por la sobreexpresión de miR-181b (Figura 8B): un efecto indicando que la reducción de importina- α 3 a nivel de proteína se debe probablemente a la inhibición de la 25 traducción y no al deterioro del ARNm.

Para volver a verificar que miR-181b se dirige directamente a la importina- α 3, se realizaron estudios de inmunoprecipitación de microrribonucleoproteína (miRNP-IP) argonauta 2 (AGO2) para valorar si el ARNm de importina- α 3 se enriquecía en el complejo silenciador inducido por ARN tras la sobreexpresión de mi-181b. Se observó un enriquecimiento de unas 4 veces del ARNm de importina- α 3 tras la AGO2 IP en presencia de miR-181b, en 30 comparación con la del control negativo de miARN (Figura 7E). Por el contrario, AGO2 IP no enriqueció el ARNm de Smad1, un gen que no estaba previsto que fuera una diana de miR-181b (Figura 7E).

Por otra parte, la expresión de importina- α 3 que carece de su región 3'-UTR fue capaz de rescatar el efecto inhibitorio de miR-181b sobre la activación de NF-PB (Figura 7F). Colectivamente estos datos sugieren que miR-181b inhibe la 35 vía de señal de NF-PB al dirigirse directamente a la expresión de importina- α 3.

La sobreexpresión de miR-181b inhibió un conjunto enriquecido de genes regulados por NF-PB en células endoteliales.

Para identificar sistémicamente objetivos y procesos biológicos regulados por miR-181b, los perfiles de expresión génica de HUVEC sometidos a transfección con el control negativo de miARN o miR-181b se analizaron 40 comparativamente utilizando microarrays del genoma humano completo de Agilent.

Las HUVEC sometidas a transfección fueron tratadas con TNF- α durante 4 horas y el ARN total se aisló y procesó para el análisis de chips de genes. De los aproximadamente 44.000 transcritos analizados, 841 genes fueron regulados a la baja y 928 genes fueron regulados al alza al menos 1,5 veces en las células con sobreexpresión de miR-181b, en 45 comparación con las células de control. Se sabe que más de 200 de estos genes están regulados por NF-PB. Por otra parte, 29 de estos genes están asociados con la inflamación y todos fueron inhibidos por la sobreexpresión de miR-181b. Estos cambios de expresión génica reducida se verificaron por un análisis qPCR (Figuras 9A y 9B). PAI-1, COX-2, CX3CL-1, y VCAM-1 fueron seleccionados para un posterior análisis por transferencia western blot para verificar el cambio direccional concordante en los niveles de proteína (Figura 9C).

Entre los 29 genes regulados por NF-PB inhibidos por miR-181b, algunos representan potenciales dianas directas de 50 miR-181b; por ej. TIMP3 fue previsto como una diana directa por TargetScan5.1 (Lewis et al., *Cell* 120:15-20, 2005) y por algoritmos de PicTar (Krek et al., *Nature Genet.* 37:495-500, 2005), y EGR3 fue previsto por PicTar (Krek et al., 2005). Por tanto, la posibilidad de que la reducción observada de EGR3 y TIMP3 pueda ser una consecuencia del efecto inhibitorio de miR-181b sobre la activación de NF-PB y/o un efecto directo de miR-181b sobre los 3'UTR de estos genes no se puede descartar. Para identificar procesos biológicos altamente regulados en células que 55 sobreexpresan miR-181b, se realizó un análisis de enriquecimiento de un conjunto de genes (GSEA), un método computacional que determina si un conjunto definido de genes muestra diferencias significativas entre dos estados biológicos (Subramanian et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:15545-15550, 2005). Seis procesos biológicos enriquecidos fueron significativamente representados por los genes reducidos en las células que sobreexpresan miR-181b: respuesta al estímulo de citoquinas; regulación positiva de la migración celular; regulación de la respuesta 60 inflamatoria; respuesta inflamatoria; quimiotaxis; y cascada de IPB quinasa/NF-PB (Figura 9D). También se

observaron abundantes dianas que interconectaban con la vía de señal de NF-PB utilizando el programa de análisis de vías basado en la web Ingenuity. Conjuntamente estos datos sugieren que miR-181b contenía selectivamente un conjunto enriquecido de genes regulados por NF-PB y componentes de las vías de señal inflamatorias en respuesta al TNF- α en las células endoteliales.

5 **MiR-181b inhibe la activación de las células endoteliales inducida por LPS, la acumulación leucocitaria y la inflamación de las vías respiratorias pulmonares.**

La sepsis es un estado médico grave con una incidencia creciente en las últimas décadas. Los pacientes con sepsis también corren el riesgo de sufrir otras complicaciones potencialmente mortales, como un fallo multiorgánico. La endotoxina LPS es un componente de la membrana exterior de las bacterias gramnegativas, que desempeña un
 10 función importante en la patogénesis de aproximadamente el 25%-30% de las sepsis (Annane et al., *Lancet* 365:63-78, 2005). La LPS induce la liberación de citoquinas proinflamatorias críticas, incluyendo el TNF- α , y desencadena un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Durante la sepsis, la activación del endotelio vascular desempeña un papel crítico en la captación de neutrófilos y monocitos/macrófagos, y en el posterior agravamiento de la respuesta inflamatoria (Aird, *Blood* 101:3765-3777, 2003; Woodman et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279:H1338-1345,
 15 2000). Para comprobar si miR-181b contribuye a este proceso, se realizaron algunos experimentos para determinar si la sobreexpresión *in vivo* de miR-181b podría reducir la captación de leucocitos y la activación de la célula endotelial en un modelo de inflamación vascular sistémico inducido por LPs en ratones. La administración intravenosa *in vivo* de miméticos de miR-181b redujo la inducción de la expresión de VCAM-1 en respuesta a la LPS en un 60% (Figura 10A, 10E). El análisis de secciones de los pulmones tomadas de los ratones a los que se les había inyectado miR-181b reveló una reducción significativa de CD45 (antígeno leucocitario común) y leucocitos Gr-1 (predominantemente neutrófilo)-positivos (en un 54% y 58%, respectivamente) en respuesta al tratamiento con LPS (Figura 10A, 10C y 10D). Es importante señalar que el número de leucocitos Gr-1-positivos adherentes al endotelio vascular pulmonar se redujo en un 47% con la sobreexpresión de miR-181b (Figuras 11C y 11D). También se observó una reducción del edema intersticial en los pulmones de los ratones en los que se había sobreexpresado miR-181b (Figura 10A). Se calcularon las puntuaciones de lesiones pulmonares y los pulmones de los ratones a los que se les había inyectado
 20 miR-181b mostraban menos daños (Figura 10B).

La actividad de mileperoxidasa, que refleja la presencia de la enzima peroxidasa expresada sobre todo en neutrófilos, también se redujo por la sobreexpresión de miR-181b. Conjuntamente estos resultados demuestran un papel crítico de miR-181b en la activación endotelial inducida por endotoxinas y en la acumulación leucocitaria, y sugieren que la
 30 sobreexpresión de miR-181b podría representar una nueva clase de soluciones terapéuticas para limitar la inflamación vascular inducida por endotoxinas.

Para comprobar si miR-181b contribuye a este proceso, se realizaron diversos experimentos para determinar si el nivel de miR-181b del endotelio podría verse afectado en respuesta a la LPS y si la sobreexpresión *in vivo* de miR-181b podría reducir la captación de leucocitos y la activación de la EC en un modelo de inflamación vascular sistémico
 35 inducido por LPS en ratones. Cuatro horas después de la LPS, el nivel de miR-181b se redujo un 50% en la íntima aórtica recién aislada, mientras que el tratamiento con TNF- α causó una reducción del 47% (Figura 11A). El ARNm de VCAM-1 se indujo aproximadamente 5 veces y 7,2 veces con TNF- α y LPS en la íntima aórtica recién aislada (Figura 11B).

La activación celular endotelial sostenida contribuye negativamente a la patogénesis de las enfermedades inflamatorias tanto agudas como crónicas. Tal y como se ha demostrado en el presente documento, miR-181b se regula dinámicamente en respuesta a estímulos proinflamatorios y sirve para contener la expresión de un conjunto enriquecido de genes diana de NF-PB asociados con enfermedades inflamatorias, como moléculas de adhesión (por ej. VCAM-1 y E-selectina), quimioquinas y receptores de quimioquinas (por ej. CCL1, CCL7, CX3CL1, CXCL1, y CCR2), y otros mediadores inflamatorios clave (por ej. COX-2, PAI-1, EGR, y TRAF1). Por otra parte, los datos
 40 muestran que miR-181b se dirige directamente a la importina- α 3, un efecto que inhibe la acumulación nuclear de p50 y p65. Por último, la administración de miméticos de miR-181b también redujo la expresión de moléculas de adhesión, la acumulación leucocitaria y la inflamación vascular *in vivo*. Por tanto, estos estudios identifican el miR-181b como un regulador de la activación celular endotelial *in vitro* e *in vivo*.

miR-181b se identifica en el presente como un miARN sensible a citoquinas que regula la expresión de genes regulados por NF-PB claves, que participan en la respuesta endotelial a la inflamación *in vitro* e *in vivo*. Estas conclusiones también revelaron un papel mecanicista nuevo e inesperado de este miARN al dirigirse secuencia abajo a la señal de NF-PB dirigiéndose directamente a la importina- α 3. Estos estudios respaldan el uso de miR-181b como agente que puede controlar aspectos críticos de la homeostasis de la célula endotelial en condiciones fisiológicas o patológicas.

55 **Materiales y métodos**

Reactivos y anticuerpos

El control negativo Pre-miR teñido con Cy3 #1(AM17120), moléculas precursoras de miARN Pre-miR-control negativo #1 (AMI 7110), moléculas precursoras de mi ARN Pre-miR-miR-181b (PM12442), inhibidores de miARN Anti-miR - control negativo #1(AM17010), e inhibidor de miR-181b (AM12442) eran de Ambion. Para los estudios *in vivo*, los oligómeros con la misma secuencia de sintetizaron a mayor escala. Anti-p65 (sc-8008), anti-p50 (sc-8414), anti-IKK α (sc-7182), anti-IKK γ (sc-8330), VCAM-1 cabra anti-ratón (sc-1504), VCAM-1 ratón anti-humano (sc-13160), IgG-HRP
 60

5 cabra anti-ratón (sc-2005), IgG-HRP cabra anti-conejo (sc-2004), IgY- HRP cabra anti-pollo (sc-2901), IgG-HRP burro anti-cabra (sc-2020) eran de Santa Cruz Biotechnology. La IgG de cabra anti-ratón conjugada con Cy5 era de Jackson ImmunoResearch. Anti-fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (4511), anti-fosfo- SAPK/JNK (Thr1 83/Tyr1 85) (4668), anti-fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (4370), anti-p38 MAPK (9212), anti-SAPK/JNK (9258), anti-IPB α (4814), anti- β -actina (4970), anti-Histona H3 (9715), anti-IKK(3 (2370), anti-p44/42 (9107), anti-fosfo- IPB α (2859), anti-Cox-2 (4842) eran de Cell Signaling. Anti-importina- α 1 (D168-3), anti-importina- α 3 (D169-3), anti-importina- α 5/7 (D170-3) eran de MBL, Medical & Biological Laboratories. La E-selectiva monoclonal anti-humano (CD62E) (S9555) era de Sigma. El anticuerpo monoclonal de E-selectina anti-humano (BBA16), IgG-HRP anti-rata (HAF005), ICAM-1 anti-humano/CD54 Clon BBIG-I1 (BBA3), PAI-1 anti-humano (MAB1786) eran de R&D Systems. Anti-CX3CL-1 (14-7986) era de eBioscience. Anti-Ly-6G y Ly-6C/Gr-1 (550291), y anti-CD45 (550539) eran de BD Pharmingen.

Cultivo celular y transfección

15 Las células THP-1 eran de ATCC y se cultivaron en un medio RPMI-1640 formulado por ATCC (30-2001) suplementado con un 10% de suero bovino fetal y 0,05 mM de 2-mercaptoetanol. Las HUVEC se obtuvieron de Lonza (cc-2159) y se cultivaron en un medio de cultivo de células endoteliales EGM-2 (cc-3162). Para todos los experimentos se utilizaron células con menos de cinco pasajes. Para la transfección se utilizó el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se dejó que las células crecieran durante 36 h antes del tratamiento con 10 ng/ml de TNF- α humano recombinante de R&D Systems (210-TA/CF) varias veces, en función del experimento: transferencia western blot 8 h; qPCR en tiempo real, 1, 3, 4, o 16 h; o ELISA, 16 h.

Estructuras

20 El gen miR-181b humano, incluyendo las regiones flanqueantes 96 bp secuencia arriba y 241 bp secuencia abajo de su secuencia de tallo-bucle, fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico humano (Promega) utilizando la mezcla de enzimas Platinum PCR SuperMix High Fidelity Taq-based (Invitrogen). El fragmento resultante fue subclonado en el vector pcDNA3.1 (+) para generar el plásmido pcDNA3.1(+)-miR-181b. Se utilizaron los cebadores 5'-CCCAAGCTTTGATTGTAC CCTATGGCT-3' (en sentido directo; ID SEC. N°: 4) y 25 5'CGGGGTACCTGTACGTTTGATGGACAA-3' (en sentido inverso; ID SEC. N°: 5) para amplificar la secuencia que codifica miR-181b humano.

30 La región 3'-UTR de los genes para importina- α 1, importina- α 3, importina- α 4, importina- α 5, y VCAM-1 se amplificaron a partir de ADN genómico humano y se clonaron en el vector pMIR-REPORT Luciferase, entre los sitios de restricción SacI y MluI (importinas) o los sitios de restricción MluI y HindIII (VCAM-1). Los posibles sitios de unión de miR-181b de la región 3'-UTR del gen de importina- α 3 se previeron con el algoritmo ma22. Se generó la secuencia del sitio de unión mutante o silvestre individual alineando los oligonucleótidos directos e inversos que contenían extremos cohesivos SpeI y HindIII, seguida de una fosforilación T4 Polynucleotide Kinase (New England Biolabs). Los oligonucleótidos bicatenarios se ligaron en el vector pMIR-REPORT Luciferase, entre los sitios de restricción SpeI y HindIII, utilizando T4 DNAligase (New England Biolabs). La estructura que contenía ADNc de marco de lectura abierto de importina- α 3 se adquirió a OriGene. Los cebadores utilizados se enumeran en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1. Cebadores utilizados para los estudios

	Nombre	Secuencia (5' -> 3')
Para qPCR en tiempo real	VCAM-1 F de ratón:	GTTCCAGCGAGGGTCTACC (ID SEC. N°: 6)
	VCAM-1 R de ratón:	AACTCTTGCAACATTAGGTGT (ID SEC. N°: 7)
	E-selectina F de ratón:	ATGCCTCGCGCTTTCTCTC (ID SEC. N°: 8)
	E-selectina R de ratón:	GTAGTCCCCTGACAGTATGC (ID SEC. N°: 9)
	ICAM-1 F de ratón:	GTGATGCTCAGGTATCCATCCA (ID SEC. N°: 10)
	ICAM-1 R de ratón:	C AC AGTT CT C AAAGC AC AGCG (ID SEC. N°: 11)

ES 2 743 600 T3

	Actina F de ratón:	GAAATCGTGCGTGACATCAAAG (ID SEC. Nº: 12)
	Actina R de ratón:	TGTAGTTTCATGGATGCCACAG (ID SEC. Nº: 13)
	PAI-1 F humana:	CATCCCCATCCTACGTGG (ID SEC. Nº: 14)
	PAI-1 R humana:	CCCCATAGGGTGAGAAAACCA (ID SEC. Nº: 15)
	VCAM-1 humana:	FGCTGCTCAGATTGGAGACTCA (ID SEC. Nº: 16)
	VCAM-1 humana:	RCGCTCAGAGGGCTGTCTATC (ID SEC. Nº: 17)
	E-selectina humana:	FAATCCAGCCAATGGGTTTCG (ID SEC. Nº: 18)
	E-selectina humana:	RGCTCCCATTAGTTCAAATCCTTCT (ID SEC. Nº: 19)
	ICAM-1 humana:	FTCTGTGTCCCCCTCAAAGTC (ID. SEC. Nº: 20)
	ICAM-1 humana:	RGGGGTCTCTATGCCCAACAA (ID. SEC. Nº: 21)
	GAPDH humana:	FATGGGGAAGGTGAAGGTTCG (ID SEC. Nº: 22)
	GAPDH humana:	RGGGGTCATTGATGGCAACAATA (ID SEC. Nº: 23)
	Importina- α 3 de ratón:	FCCAGTGATCGAAATCCACCAA (ID SEC. Nº: 24)
	Importina- α 3 de ratón:	RCGTTTGTTTCAGACGTTCCAGAT (ID SEC. Nº: 25)
	Importina- α 3 humana:	FTCCAGTGATCGAAATCCACCA (ID. SEC. Nº: 26)
	Importina- α 3 humana:	RCATTGGACTGAACTACTGCTTGA (ID. SEC. Nº: 27)
	Smad1 humana:	FGATGCCAGGTAGGTTGGAATG (ID SEC. Nº: 28)

ES 2 743 600 T3

	Smad1 humana:	RCGTGACACTGTGATAAACTGT (ID. SEC. Nº: 29)
Oligonucleótidos	Sitio 1 en sentido directo:	CTAGTCTTGCTATGAAGCAGTGTGTGAAA (ID SEC. Nº: 30)
	Sitio 1 en sentido inverso:	AGCTTTTCACACACT GCTTCATAGCAAGA (ID. SEC. Nº: 31)
	Sitio 2 en sentido directo:	CTAGTATGGACAATGTTGAATGTCA (ID SEC. Nº: 32)
	Sitio 2 en sentido inverso:	AGCTTGACATTCATTCAACATTGTCCATA (ID SEC. Nº: 33)
	Sitio 3 en sentido directo:	CTAGTCTGTGTACGAGAGCGTGGTTGTGA (ID. SEC. Nº: 34)
	Sitio 3 en sentido inverso:	AGCTTCACAACCACGCTCTCGTACACAGA (ID SEC. Nº: 35)
	Sitio 4 en sentido directo:	CTAGTTGGTTTACTCTGCAGCCTGTGTTA (ID SEC. Nº: 36)
	Sitio 4 en sentido inverso:	AGCTT AACACAGGCTGCAGAGTAAACCA A (ID SEC. Nº: 37)
	Sitio 5 en sentido directo:	CTAGTTGCATTTGCACCAGATGAATGTTA (ID SEC. Nº: 38)
	Sitio 5 en sentido inverso:	AGCTTAACATTCATCTGGTGCAAATGCAA (ID SEC. Nº: 39)
	Sitio 6 en sentido directo:	CTAGTTTTCCCTCAAAATAGACTGTGTTA (ID SEC. Nº: 40)
	Sitio 6 en sentido inverso:	AGCTTAACACAGTCTATTTTGAGGGAAAA (ID SEC. Nº: 41)
	Sitio 7 en sentido directo:	CTAGTATACCGTGCTGTGTTTAAATGTTA (ID SEC. Nº: 42)
	Sitio 7 en sentido inverso:	AGCTT AACATTTAAACACAGCACGGTATA (ID SEC. Nº: 43)
	Sitio 8 en sentido directo:	CTAGTCTTCCCCTTTGAGCACAAGTGTTA (ID SEC. Nº: 44)
	Sitio 8 en sentido inverso:	AGCTTAACACTTGTGCTCAAAGGGGAAG A (ID SEC. Nº: 45)
	Sitelmut en sentido directo:	CTAGTCTTGCTATGATAAAGCTTCTGAAA (ID SEC. Nº: 46)
	Site1mut en sentido inverso:	AGCTTTTCAGAAGCTTTATCATAGCAAGA (ID SEC. Nº: 47)
	Site2mut en sentido directo:	CTAGTAGGCTGAATCTTGCCAACATCACA (ID SEC. Nº: 48)
	Site2mut en sentido inverso:	AGCTTGTGATGTTGGCAAGATTCAGCCTA (ID SEC. Nº: 49)
Para clonación de 3' UTR	Importina-α1 en sentido directo:	ACGAGCTC AT CAT GTAGCT GAGACATAAA TTTG (ID SEC. Nº: 50)

	Importina-α1 en sentido inverso:	ATAACGCGTAGAAAAGGGT GGAAGTTGAA TGT (ID SEC. Nº: 51)
	Importina-α3 en sentido directo:	ACGAGCTCAAAGATGTTGTGGAAGTTAG G (ID SEC. Nº: 52)
	Importina-α3 en sentido inverso:	ATAACGCGTCACAGCACGGTATTCTACCA C (ID SEC. Nº: 53)
	Importina-α4 en sentido directo:	ACGAGCTCATTGAGTTGAGTGCAGCATC (ID SEC. Nº: 54)
	Importina-α4 en sentido inverso:	ATAACGCGTCCTCTACACAGATCCCTGTC (ID SEC. Nº: 55)
	Importina-α5 en sentido directo:	ACGAGCTCAGCAATACTCTGCTTTTACAG (ID SEC. Nº: 56)
	Importina-α5 en sentido inverso:	ATAACGCGTGATTAGAATCGAGCTGCACC (ID SEC. Nº: 57)
	VCAM-1 en sentido directo:	TCGACGCGTGCAAATCCTTGATACTGC (ID SEC. Nº: 58)
	VCAM-1 en sentido inverso:	CCCAAGCTTATTGGGAAAGTTGCACAG (ID SEC. Nº: 59)

Ensayos de indicador de luciferasa

5 Las HUVEC se colocaron en placas (50.000/pocillo) por triplicado en una placa de 12 pocillos. Tras el cultivo hasta una confluencia del 70-80%, las células se sometieron a transfección con 200 ng de las estructuras indicadoras señaladas y 100 ng de plásmidos de expresión (3-galactosidasa (gal)). Los miméticos o inhibidores de miR-181b fueron sometidos a transfección conjunta a 10 o 50 nM de concentración final cuando se indicó; tras 36 h de incubación, las células se trataron con 10 ng/ml de TNF-α durante 8 h. En algunos experimentos, pcDNA3.1-miR-181b o el vector vacío se sometieron a transfección conjunta con 200 ng de estructuras indicadoras y 100 ng de plásmidos de expresión de β-gal. Para los estudios de rescate, el indicador de luciferasa del concatémero de NF-PB se sometió a transfección conjunta con pcDNA3.1 -miR-181b o el vector vacío en presencia o ausencia de ADNc de marco de lectura abierto de importina-α3 en las células 293T. Las células sometidas a transfección se recogieron en 200 μL de Reporter Lysis Buffer (Promega). Se midió la actividad de luciferasa y β-gal. Cada lectura de la actividad de luciferasa se normalizó frente a la actividad de β-gal leída para el mismo lisado.

Ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA)

15 Las HUVEC se sometieron a transfección con miARN de control, o miR-181b a una concentración final de 10 nM, inhibidores de miARN de control, o inhibidores de miR-181b a una concentración final de 50 nM, respectivamente. Después de 36 h, las células se expusieron a 10 ng/ml de TNF-α durante 16 h. A continuación, se recogieron los supernatantes para el análisis ELISA con un SearchLight Multiplex Immunoassay Kit (Aushon BioSystems, Inc).

Ensayos de adhesión celular

20 Las HUVEC cultivadas en placas de 12 pocillos se sometieron a transfección con miméticos o inhibidores de miARN. Veinticuatro horas más tarde, las células sometidas a transfección se volvieron a colocar en placas de fluorescencia de 96 pocillos (BD, cat# 353948) para cultivarlas hasta el día siguiente. Al día siguiente se añadieron 10 ng/ml de TNF-α durante 5 h. Las células THP-1 (ATCC) se lavaron con medio RPMI-1640 libre de suero y se suspendieron a 5×10^6 células/mL en un medio con 5 μM de Calcein AM (Invitrogen, cat# C3100MP). Las células se mantuvieron en una incubadora que contenía un 5% de CO₂ a 37 °C durante 30 min. La reacción de marcado se detuvo con la adición del medio de cultivo celular y las células se lavaron con el medio de cultivo dos veces, para después volver a suspenderlas en el medio de cultivo a 5×10^5 células/ml. Tras 5 h de tratamiento con TNF-α, las HUVEC se lavaron una vez con medio de cultivo de células THP-1. A continuación, se añadieron a cada pocillo 200 μL de Calcein AM-células THP-1 cargadas. Tras 1 h de incubación, las células no adherentes se retiraron cuidadosamente. Las células adherentes se lavaron con suavidad cuatro veces con medio RPMI-1640 previamente templado.

La fluorescencia se midió utilizando un lector de placas de fluorescencia a una excitación de 485 nm. El número de células THP-1 por vista se cuantificó a partir de imágenes capturadas aleatoriamente.

PCR cuantitativa en tiempo real

35 Las HUVEC se volvieron a suspender en reactivo Trizol (Invitrogen) y el ARN total se aisló de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizaron transcripciones inversas utilizando miScript Reverse Transcription Kit de Qiagen (218061). Se utilizó QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (204243) o miScript SYBR Green PCR Kit (218073)

de Qiagen para el análisis por qPCR en tiempo real con el sistema Mx3000P Real-time PCR (Stratagene), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron cebadores específicos de un gen y de una especie para detectar VCAM-1, E-selectina, PAI-1, e ICAM-1 humanas o de ratón. Para amplificar las secuencias de miARN maduro, se utilizaron hsa-miR-181a (PN4373117), hsa-miR-181b (PN4373116), hsa-miR-181c (PN4373115), hsa-miR-181d (PN4373180), RNU6B (PN4373381), TaqMan Micro RNA Reverse Transcription Kit (PN4366596), TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (PN4324018), o los ensayos de cebadores miScript para Hs_RN5S1_1 (MS00007574) y Hs_miR-181b_1 (MS00006699) de Qiagen.

Aislamiento de ARN de la íntima de la aorta

El aislamiento de ARN de la íntima de la aorta se modificó con respecto a un estudio previo (Nam et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297:H1535-1543, 2009). En resumen, la aorta entre el corazón y el diafragma quedó expuesta y se retiraron cuidadosamente los tejidos periadventiciales. La aorta limpia se extirpó y se transfirió a un plato de 35 mm que contenía una solución Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) enfriada con hielo. Se insertó la punta de una aguja de una jeringa de insulina cuidadosamente en un extremo de la aorta para facilitar un flujo rápido de 150 μ L de tampón de lisis QIAzol a través de ella y recoger el eluyente de la íntima en un tubo de 1,5 ml. La aorta sobrante (media + adventicia) se lavó una vez con HBSS y se congeló en nitrógeno líquido para su almacenamiento hasta la extracción de ARN total con TRIzol.

Inmunotinción

Las HUVEC cultivadas en cubreobjetos se fijaron con un 4% de paraformaldehído y se permeabilizaron con un 0,5% de Triton X-100 (Sigma). Tras bloquearlas con suero de cabra normal, las células se incubaron con un anticuerpo anti-p65, seguido de IgG de cabra anti-ratón conjugada con Cy5 y DAPI (Invitrogen). Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal Olympus Fluoview FV1000 equipado con un láser Multi-Ar, láser HeNe G, láser HeNe R, y un diodo láser LD405/440. Se utilizó la lente del objetivo UPLSAPO 20x NA:0.75. Se establecieron los siguientes parámetros: Zoom x2, tamaño de imagen [píxeles] 1024x1024, C.A. 150 μ m. La intensidad de la tinción nuclear de p65 se cuantificó utilizando el software Bitplane Imaris 6.4.2.

Inmunoprecipitación por MiRNP

La MiRNP-IP se realizó como se había descrito anteriormente (Fasanaro et al., *J. Biol. Chem.* 284:35134-35143, 2009; Huang et al., *Mol. Cell* 35:856-867, 2009). La Ago-2 marcada con Myc (de Cold Spring Harbor, NY) se sometió a transfección conjunta con miR-181b o control negativo de miARN en las HUVEC. Las células se lavaron en PBS enfriado con hielo, se liberaron por raspado y se sometieron a lisis en tampón (10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 10 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 0,5% de Triton X-100, 100 unidades/mL de RNasin Plus (Promega) suplementado con 1 x inhibidor de proteasa (Roche)). La solución de células lisadas se ajustó a una concentración de NaCl final de 150 mM antes de la centrifugación. Una vigésima parte del volumen del supernatante se recogió en TRIzol para el uso como control del extracto. La parte restante del supernatante se preseleccionó con Protein A/G UltraLink Resin (Pierce), al que se añadieron 2 μ g de anticuerpo anti-c-myc y se dejó incubar esta mezcla hasta el día siguiente a 4 °C; al día siguiente se añadió Protein A/G

UltraLink Resin. Tras 4 h de rotación mecánica a 4 °C, los gránulos de agarosa se peletizaron y se lavaron cuatro veces en tampón de lavado (50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl, 0,05% de Triton X-100). Por último, se añadió 1 mL de TRIzol a los gránulos y se aisló el ARN. El ARN total se sometió a transcripción inversa en ADNc para el análisis por qPCR en tiempo real.

Extracción de proteínas y análisis de transferencia de western blot

Las HUVEC sometidas a transfección se trataron con 10 ng/ml de TNF- α durante 1 h; a continuación, se aislaron los extractos citoplasmático y nuclear con reactivos de extracción nuclear y citoplasmático NE-PER (Thermo Fisher Scientific). Las células cultivadas se recogieron y se sometieron a lisis en tampón RIPA (50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1% de NP-40, 0,5% de desoxicolato de sodio, 0,1% de SDS) suplementado con tabletas de un cóctel inhibidor de la proteasa completa (Roche). Para extraer la proteína, los tejidos congelados se homogeneizaron en tampón RIPA suplementado con inhibidor de proteasa. Los restos de células o tejidos se retiraron por centrifugación a 12 000 rpm durante 10 min. Los lisados se separaron con un 8% o 10% de geles SDS-PAGE, se transfirieron a membranas PVDF (Bio-Rad), y se incubaron con los correspondientes anticuerpos como se indicó. Las proteínas se visualizaron por reactivos de detección de transferencia western blot ECL Plus Western (RPN2132; GE Healthcare). Se usó el análisis de densimetría de las transferencias con un software ImageJ para calcular la abundancia de proteína.

Análisis de chips de genes por microarray y bioinformática

Las HUVEC se sometieron a transfección con 10 nM de control negativo de miARN o miméticos de miR-181b durante 36 h, se y trataron con 10 ng/ml de TNF- α durante 4 h. Las células se recogieron en TRIzol y se enviaron a Two-Color, formato 4 x 44 K, Human Whole Genome Microarray Service (Miltenyi Biotec Inc.). Los genes expresados diferencialmente se identificaron utilizando el umbral de cambio de veces más bajo de 1,5. Se utilizó un análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (Subramanian et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:15545-15550, 2005) para comprobar si una vía/proceso biológico conocido o una función molecular eran suprimidos por la sobreexpresión de miR-181b. Los grupos de genes utilizados para el análisis de enriquecimiento se descargaron directamente del sitio

ES 2 743 600 T3

web de Broad Institute o del sitio web de Gene Ontology. Los conjuntos de genes para los que se descubrió una tasa de descubrimiento falsa (FDR) inferior al 25% se consideraron significativamente enriquecidos. Los cebadores utilizados para la validación de qPCR en tiempo real se enumeran en la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la validación de qPCR

Nombre	Secuencia (5' -> 3')
BCL2A1-F	TACAGGCTGGCTCAGGACTAT (ID SEC. Nº: 60)
BCL2A1-R	TTTTGTAGCACTCTGGACGTTT (ID SEC. Nº: 61)
C1QTNF1-F	CAAGGGAAATATGGCAAAACAGG (ID SEC. Nº: 62)
C1QTNF1-R	ATCACCGTCTGGTAGTAGTGG (ID SEC. Nº: 63)
CCL1-F	TCATTTGCGGAGCAAGAGATT (ID SEC. Nº: 64)
CCL1-R	CTGAACCCATCCAACCTGTGTC (ID SEC. Nº: 65)
CCL7-F	CCAATGCATCCACATGCTGC (ID SEC. Nº: 66)
CCL7-R	GCTTCCCAGGGACACCGAC (ID SEC. Nº: 67)
CCR2-F	GACCAGGAAAGAATGTGAAAGTGA (ID SEC. Nº: 68)
CCR2-R	GCTCTGCCAATTGACTTTCCTT (ID SEC. Nº: 69)
CFB-F	GCGGCCCTTGATAGTTCAC (ID SEC. Nº: 70)
CFB-R	CAGGGCAGCACTTGAAAGAG (ID SEC. Nº: 71)
CSF2-F	GGGAGCATGTGAATGCCATC (ID SEC. Nº: 72)
CSF2-R	GCAGTGTCTCTACTCAGGTT C AG (ID SEC. Nº: 73)
CX3CL1-F	ACCACGGTGTGACGAAATG (ID SEC. Nº: 74)
CX3CL1-R	CTCCAAGATGATTGCGCGTTT (ID SEC. Nº: 75)
CXCL1-F	AGGGAATTCACCCCAAGAAC (ID SEC. Nº: 76)
CXCL1-R	ACTATGGGGGATGCAGGATT (ID SEC. Nº: 77)
CXCL16-F	CAGCGTCACTGGAAGTTGTTA (ID SEC. Nº: 78)
CXCL16-R	CACCGATGGTAAGCTCTCAGG (ID SEC. Nº: 79)
CXCL3-F	CCAAACCGAAGTCATAGCCAC (ID SEC. Nº: 80)
CXCL3-R	TGCTCCCCTTGTTCAGTATCT (ID SEC. Nº: 81)
CXCL6-F	AGAGCTGCGTTGCACTTGTT (ID SEC. Nº: 82)
CXCL6-R	GCAGTTTACCAATCGTTTTGGGG (ID SEC. Nº: 83)
EGR1-F	ACCTGACCGCAGAGTCTTTTC (ID SEC. Nº: 84)
EGR1-R	GCCAGTATAGGTGATGGGGG (ID SEC. Nº: 85)
EGR2-F	ATCCAGTAACTCTCAGTGGTT (ID SEC. Nº: 86)
EGR2-R	CTCCACCGGGTAGATGTTGT (ID SEC. Nº: 87)
EGR3-F	GCGACCTCTACTCAGAGCC (ID SEC. Nº: 88)

ES 2 743 600 T3

EGR3-R	ATGGGGAAGAGATTGCTGTCC (ID SEC. Nº: 89)
EGR4-F	AGCGAGTTTTCCGAACCCG (ID SEC. Nº: 90)
EGR4-R	GAGTCGGCTAAGTCCCCACT (ID SEC. Nº: 91)
IL1R1-F	ACATTGTGCTTTGGTACAGGG (ID SEC. Nº: 92)
IL1R1-R	CCCCAACAGTCTTTGGATACAG (ID SEC. Nº: 93)
LIF-F	GTACCGCATAGTCGTGTACCT (ID SEC. Nº: 94)
LIF-R	CACAGCACGTTGCTAAGGAG (ID SEC. Nº: 95)
MMP11-F	GAGGCCCTAAAGGTATGGAGC (ID SEC. Nº: 96)
MMP11-R	CCCTTCTCGGTGAGTCTTGG (ID SEC. Nº: 97)
PLAU-F	GTGAGCGACTCCAAAGGCA (ID SEC. Nº: 98)
PLAU-R	GCAGTTGCACCAGTGAATGTT (ID SEC. Nº: 99)
PTGS2-F	GTGCAACACTTGAGTGGCTAT (ID SEC. Nº: 100)
PTGS2-R	AGCAATTTGCCTGGTGAATGAT (ID SEC. Nº: 101)
S1PR1-F	CTTGCTGACCATTTGGAAAACC (ID SEC. Nº: 102)
S1PR1-R	CTGTGTAGGCTACTCCTGCC (ID SEC. Nº: 103)
SDC4-F	GCTCTTCGTAGGCGGAGTC (ID SEC. Nº: 104)
SDC4-F	CCTCATCGTCTGGTAGGGCT (ID SEC. Nº: 105)
SELE-F	AATCCAGCCAATGGGTTTCG (ID SEC. Nº: 106)
SELE-R	GCTCCCATTAGTTCAAATCCTTCT (ID SEC. Nº: 107)
SERPINE1-F	CATCCCCATCCTACGTGG (ID SEC. Nº: 108)
SERPINE1-R	CCCCATAGGGTGAGAAAACCA (ID SEC. Nº: 109)
TIMP3-F	CATGTGC AGTACATCCACACG (ID SEC. Nº: 110)
TIMP3-R	ACATCTTGCCATCATAGACGC (ID SEC. Nº: 111)
TNFRSF11B-F	AAGGGCGCTACCTTGAGATAG (ID SEC. Nº: 112)
TNFRSF11B-R	GCAAACGTATTTGCTCTGGG (ID SEC. Nº: 113)
TRAF1-F	CCGGCCCCTGATGAGAATG (ID SEC. Nº: 114)
TRAF1-R	TTCTGGGCTTATAGACTGGAG (ID SEC. Nº: 115)
VCAM1-F	GCTGCTCAGATTGGAGACTCA (ID SEC. Nº: 116)
VCAM1-R	CGCTCAGAGGGCTGTCTATC (ID SEC. Nº: 117)
GAPDH-F	ATGGGGAAGGTGAAGGTTCG (ID SEC. Nº: 118)
GAPDH-R	GGGGTCATTGATGGCAACAATA (ID SEC. Nº: 119)

Sobreexpresión de miR-181b in vivo y experimentos con animales

Se compraron ratones macho C57BL/6 de 8-10 semanas de vida a Charles River. Se mezcló un volumen igual de atecolágeno (Koken, Tokyo, Japan) y miARN (Ambion) para formar complejos, de acuerdo con las directrices del fabricante. A cada ratón (n =3-6 por grupo) se le administraron 200 µL de mezclas que contenían 50 µg de control negativo o miméticos de miR-181b por inyección en la vena de la cola. Al día siguiente se inyectó TNF-α recombinante de ratón (2 viales/ratón) de R & D Systems (410-MT/CF) por vía intraperitoneal (i.p.). Cuatro horas más tarde, los ratones fueron sacrificados para recoger los tejidos y órganos para el análisis. Los pulmones fueron utilizados para el análisis de transferencia western blot, extracción de ARN total e inmunohistoquímica. Los arcos de la aorta se congelaron para la extracción del ARN total, mientras que la aorta descendente se fijó con un 4% de paraformaldehído y se sumergió en parafina para la inmunohistoquímica. Los corazones, bazo e hígados se utilizaron para el aislamiento de IARN total. Se prepararon secciones de 6 µm de aorta y pulmón sumergidos en parafina; a continuación, las secciones se desparafinaron con xileno y se rehidrataron en agua pasando por una serie de distintos grados de etanol, seguidor por la recuperación del antígeno durante 5 min en una olla a presión utilizando solución Tris-EDTA, pH 8.0. Las secciones fueron tratadas con tampón TBST y 3% de H₂O₂, se bloquearon con reactivo bloqueante, se incubaron secuencialmente con VCAM-1 de cabra anti-ratón, anticuerpo secundario y cromógeno DAB, y se sometieron a contratinción con hematoxilina. Las imágenes se capturaron con un sistema digital.

Para el modelo de endotoxemia murino, a los ratones se les administró un vehículo, un control negativo de miARN o miméticos de miR-181b por inyección en la vena de la cola. Al día siguiente, se inyectó a los ratones i.p. 40 mg/kg de LPS (*Escherichia coli* serotipo 026:B6 endotoxina; Sigma-Aldrich) o vehículo (suero salino). Los tejidos del pulmón se procesaron para la inmunohistoquímica 4 h después del tratamiento con LPS y se sometieron a tinción para detectar Gr-1 (BD Pharmingen), CD45 (BD Pharmingen), o VCAM-1. Se midió la actividad de mieloperoxidasa (MPO) en los homogeneizados de pulmón utilizando el Kit (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los animales se mantuvieron en instalaciones cerradas libres de patógenos y fueron controlados periódicamente por el personal veterinario.

Estadísticas

Las diferencias entre los dos grupos se examinaron utilizando el test t de Student (dos brazos) y se consideraron significativas a $P < 0,05$.

Ejemplo 2. Modelo animal de asma

El asma es un trastorno complejo y heterogéneo que implica la obstrucción del flujo de aire, una hiperreactividad de las vías aéreas (AHR) e inflamación. Los estudios acumulados ponen de manifiesto un papel crítico de la mejora de la activación de la vía de NF-PB en tejidos asmáticos. La activación de NF-PB provoca una expresión aumentada de las moléculas de adhesión y quimioquinas en varios tipos de células, incluyendo el endotelio pulmonar. Por tanto, contener la respuesta inflamatoria en el endotelio pulmonar puede representar una terapia a los pacientes con asma.

Se utilizará un modelo experimental de asma en ratones para estudiar el efecto de los ácidos nucleicos que contienen la totalidad o una parte de la secuencia de miR-181b (ID SEC. N°: 1) en el asma. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento, que contienen la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1, pueden suprimir el asma experimental. En estos estudios, a los ratones sensibilizados y sometidos a ovoalbúmina (OVA) se les inyectará uno de los ácidos nucleicos descritos aquí (antes o después del reto con OVA) y se determinarán los efectos mediados por el ácido nucleico miR-181b en la activación celular endotelial y la inflamación de las vías aéreas, la hiperreactividad de las vías aéreas al reto con metacolina, la expresión de genes regulados por NF-PB, la acumulación de eosinófilos y subconjuntos de leucocitos en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) y el tejido pulmonar, las respuestas de linfocitos CD4⁺ Th2 y la hipersecreción de moco. Un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 se administrará por inyección intravenosa (vena de la cola) o por aerosol (nebulización). El ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 se puede mezclar con moléculas catiónicas como colágeno (por ej. atelocolágeno o telocolágeno de tipo I), reactivos a base de lipofectina, lipoides, péptidos asimilables a elastina, pequeños péptidos (por ej. un péptido RGD, PEGilado con RGD, o un colágeno), o micropartículas poliméricas, o moléculas no catiónicas, como PGLA, o aptámeros específicos para células endoteliales para mejorar la administración sistémica intravenosa o por aerosol. Alternativamente, el ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 se puede conjugar con moléculas como partículas de glucano para la administración oral. Los efectos sobre la acción de la señal de NF-PB *in vivo* también se examinarán utilizando el ratón transgénico NF-PB-luciferasa-GFP retado con OVA y la captura de imágenes por bioluminiscencia.

Ejemplo 3. Modelos animales de aterosclerosis

La arterioesclerosis y sus complicaciones son la principal causa de morbilidad y mortalidad en las sociedades occidentales. Las lesiones de la aterosclerosis representan una serie de respuestas celulares y moleculares altamente específicas que se pueden considerar, en su conjunto, como un proceso de la enfermedad inflamatoria. Las observaciones experimentales, patológicas y clínicas defienden el papel crítico del endotelio activado en la aterogénesis. Las células endoteliales activadas han sido identificadas en todas las fases de desarrollo de la lesión aterosclerótica —desde la lesión más temprana denominada "estría grasa" hasta la placa madura y obstructiva—. La activación de NF-PB provoca la inducción de la expresión de la molécula de adhesión en las células endoteliales, un efecto que conduce a la acumulación de leucocitos en las paredes vasculares y a la formación de la lesión aterosclerótica.

Se utilizará un modelo experimental para estudiar el efecto de un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 en la iniciación y la progresión de la aterosclerosis *in vivo*. En los estudios propuestos, se inyectará a los ratones por vía intravenosa un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 y se realizarán controles, al menos semanalmente de: ratones de 8-10 semanas de vida ApoE-deficientes o LDL-R-deficientes tendentes a la aterosclerosis alimentados con una dieta altamente grasa durante 8 semanas (estudios de iniciación) o después de que los ratones ApoE-deficientes o LDL-R-deficientes tendentes a la aterosclerosis ya hayan sido alimentados con una dieta altamente grasa durante al menos 8 semanas (estudios de progresión). La gravedad de la formación de lesiones ateroscleróticas y la composición celular de las lesiones en el seno aórtico y la aorta descendente se determinarán utilizando técnicas inmunohistoquímicas estándar.

10 **Ejemplo 4. Modelos animales de obesidad.**

La obesidad representa una importante epidemia y es un importante factor de riesgo para las enfermedades de las arterias coronarias y la diabetes, así como otras enfermedades inflamatorias crónicas, como enfermedades neurológicas degenerativas, enfermedades de las vías aéreas pulmonares, retinopatías diabéticas y cáncer. En efecto, casi dos tercios de los adultos estadounidenses tienen sobrepeso. La obesidad está asociada con vías de señal inflamatorias crónicas, como NF-PB. Los estudios clínicos y experimentales indican que la activación de la vía de señal de NF-PB puede aumentar la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo 2. Por tanto, establecer la vía de señal de NF-PB como objetivo puede representar una estrategia para tratar la obesidad y reducir la inflamación celular.

El efecto de un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 sobre la obesidad y la resistencia a la insulina se estudiará utilizando modelos animales. En estos experimentos, un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 se inyectará por vía intravenosa al menos semanalmente en uno o más de cuatro modelos de obesidad durante un total de cuatro semanas: ratas Zucker obesas, ratones ob/ob, ratones db/db, y ratones C57BL/6 alimentados con una dieta altamente grasa. Se medirán las concentraciones de insulina y glucosa en sangre durante las pruebas de tolerancia a la glucosa. La sensibilidad a la insulina se medirá utilizando pruebas de tolerancia a la insulina. Los perfiles de lípidos (colesterol, LDL, triglicéridos y HDL) y niveles de ácidos grasos libres también se medirán. Por último, se analizará la composición corporal, incluyendo los perfiles de grasa visceral y subcutánea. La actividad de NF-PB (por ej. la expresión de genes diana de NF-PB) se examinará en la grasa, el hígado y los músculos esqueléticos. Por último, se analizarán los pesos corporales, el consumo de energía y el consumo de calorías. Un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 puede mejorar la sensibilidad a la insulina, reducir los niveles de glucosa, reducir los niveles de ácidos grasos libres, y mejorar la composición y el peso corporal.

30 **Ejemplo 5. Modelos animales de artritis reumatoide (RA).**

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria sistémica que ataca principalmente a las articulaciones sinoviales, un efecto que conduce a la destrucción del cartílago articular y de las articulaciones causando una discapacidad considerable y morbilidad acompañada de dolor. En efecto, aproximadamente el 1% de la población mundial padece RA. Los estudios clínicos y experimentales indican que la activación de la vía de señal de NF-PB es uno de los principales objetivos en la RA. NF-PB promueve la acumulación de leucocitos, un crecimiento anómalo de células sinoviales asimilables a fibroblastos, y participa en la diferenciación y activación de la actividad de reabsorción ósea de los osteoclastos. Las terapias con fármacos actuales, como antagonistas del TNF- α , como etanercept, infliximab, o adalimumab, o antagonistas de la IL-1, como anakinra, bloquea la activación de la señal de NF-PB y la progresión de la RA. Sin embargo, estos fármacos pueden tener efectos secundarios asociados. Por otra parte, centrarse secuencia abajo del TNF- α o la IL-1 puede proporcionar un método más potente y específico de reducir la activación de NF-PB. Por tanto, centrarse en la vía de señal de NF-PB puede ofrecer nuevas estrategias para limitar la progresión de la RA.

El efecto de un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC.

N°: 1 en la artritis reumatoide se está estudiando en un modelo animal. En estos experimentos, un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 se inyecta intravenosamente al menos con una periodicidad semanal en tres modelos de RA: artritis adyuvante en rata, artritis de colágeno tipo II en rata, o artritis de colágeno tipo II en ratón. Para el modelo adyuvante, el tratamiento se administra en el día 0 (modelo profiláctico) o en el día 8 (modelo terapéutico). El estudio termina el día 15. La articulación tibiotarsal y las garras se examinan para determinar los parámetros de inflamación y artríticos. En el caso del modelo de artritis de colágeno de tipo II en rata, se administra a las ratas un colágeno de tipo II (2 mg/mL en adyuvante de Freund incompleto) el día 0 y el día 7. La aparición de la artritis ocurre los días 10-13. Las ratas son sacrificadas para la evaluación histopatológica al completar el tratamiento. En el caso del modelo de colágeno de tipo II en ratón, a los ratones DBA/1 lac J se les inmuniza contra colágeno de tipo II bovino el día 0 y el día 21, con o sin refuerzo concurrente de endotoxina o IL-1 recombinante. La enfermedad ocurre en las garras/articulaciones y las mediciones de la enfermedad se determinan clínicamente y con una puntuación histológica. La actividad de NF-PB (por ej. la expresión de genes diana de NF-PB) se examina en los tejidos. Este modelo ha sido utilizado para evaluar los efectos de los antagonistas del receptor de TNF- α soluble e IL-1. Tanto los estudios profilácticos como de tratamiento se realizan utilizando un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1. Un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 puede inhibir la actividad de NF-PB en tejidos y puede reducir la RA.

Ejemplo 6. Modelos animales de la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa son enfermedades inflamatorias del intestino habituales que pueden afectar a partes del tracto gastrointestinal y pueden causar importantes síntomas y morbilidad. Se calcula que hay aproximadamente un millón de personas en EE. UU. afectadas por una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD).

5 Las opciones de tratamiento son bastante limitadas para mantener la remisión, evitar la recaída y controlar los síntomas. Los estudios clínicos y experimentales indican unos niveles superiores de expresión de la vía de señal de NF-PB en muestras de biopsia de pacientes con IBD. Los agentes inmunomoduladores, como corticosteroides, que reducen la activación de NF-PB, resultan útiles en los pacientes, pero tienen numerosos efectos secundarios. Por tanto, centrarse en la vía de señal de NF-PB puede ofrecer nuevas estrategias para limitar la progresión de la IBD.

10 El efecto de un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 en IBD se está estudiando en un modelo animal. En estos experimentos, un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 se inyecta intravenosamente al menos con una periodicidad semanal en tres modelos de IBD en ratones: IBD químicamente inducida, ratones IL-10 deficientes genéticamente modificados o TNF delta ARE, o cepas de ratones con IBD espontánea (SAMP1/Yit). Para el modelo químicamente inducido, se usa sulfato de dextrano sódico (DSS), que está bien caracterizado para inducir la disrupción epitelial que resulta en una infiltración bacteriana y neutrófila, y representa un modelo de la fase aguda de la lesión. Los ratones IL-10-deficientes tienen una colitis transmural y son útiles para valorar el papel de las vías de señal de la citoquina específicas. Los ratones TNF delta ARE representan un modelo de enfermedad similar al Crohn con afectación ileal. Este es un modelo importante, dado que el TNF- α contribuye a la patogénesis de la enfermedad de Crohn y hasta el 70% de los pacientes con enfermedad de Crohn refractaria responde al tratamiento bloqueante del TNF- α . El modelo SAMP1/Yit de ileitis también proporciona un modelo estable de IBD y ha determinado la importancia de las moléculas de adhesión vascular, como VCAM-1, para el tráfico y acumulación de leucocitos en el desarrollo de la IBD. En efecto, los anticuerpos bloqueantes de VCAM-1 e ICAM-1 provocan una mejora del 70% de la gravedad de la inflamación. Para cada uno de estos modelos, un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 se inyecta por vía intravenosa al menos semanalmente en: estudios profilácticos (fase temprana de la enfermedad, por ejemplo 4-6 semanas) o estudios de tratamiento (cuando se observa una IBD establecida (varía entre 8-20 semanas dependiendo del modelo)). La gravedad de la IBD y la composición celular del tracto gastrointestinal se determina utilizando técnicas inmunohistoquímicas estándar. Un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1 puede inhibir la progresión de IBD.

30 También se divulgan las siguientes cláusulas, que no definen la presente invención:

1. Un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria vascular en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un ácido nucleico que comprende la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1.
2. El método de la cláusula 1, donde dicho ácido nucleico comprende la secuencia de ID SEC. N°: 2 o ID SEC. N°: 3.
- 35 3. El método de la cláusula 1, donde dicha enfermedad inflamatoria vascular es una enfermedad inflamatoria vascular aguda.
4. El método de la cláusula 1, donde dicha enfermedad inflamatoria vascular es una enfermedad inflamatoria vascular crónica.
5. El método de la cláusula 1 donde dicha enfermedad inflamatoria vascular se selecciona del grupo de: inflamación pulmonar, asma, aterosclerosis, artritis, accidente cerebrovascular, síndrome del intestino irritable, enfermedad cardiovascular, infarto de miocardio, enfermedad de las arterias coronarias, fallo cardíaco, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y enfermedad arterial periférica.
- 40 6. El método de la cláusula 5, donde dicha inflamación pulmonar es una lesión pulmonar aguda.
7. El método de la cláusula 6, donde dicha lesión pulmonar aguda es una lesión pulmonar aguda inducida por sepsis.
- 45 8. El método de la cláusula 1, donde dicho ácido nucleico se conjuga con uno o más polímeros, péptidos o polisacáridos.
9. El método de la cláusula 1, donde dicha administración provoca una reducción de la adhesión leucocitaria al endotelio del sujeto o una reducción de la extravasación leucocitaria del endotelio del sujeto en comparación con un sujeto de control al que no se le ha administrado el ácido nucleico.
- 50 10. El método de la cláusula 1, donde dicha administración provoca una reducción de la expresión de la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), de E-selectina o de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) en el endotelio del sujeto en comparación con un sujeto de control al que no se le ha administrado el ácido nucleico.
11. Un método para reducir la señal del factor nuclear-P β (NF-P β) en una célula endotelial, que comprende la administración a una célula endotelial de un ácido nucleico que contiene la totalidad o una parte de la secuencia de ID SEC. N°: 1.
- 55 12. El método de la cláusula 11, donde dicho ácido nucleico comprende la secuencia de ID SEC. N°: 2 o ID SEC. N°: 3.

13. El método de la cláusula 11, donde dicha administración provoca una reducción de la expresión de importina- $\alpha 3$ en la célula endotelial en comparación con una célula endotelial a la que no se le ha administrado el ácido nucleico.

5 14. El método de la cláusula 11, donde dicha administración provoca una reducción de la importación nuclear de la subunidad p65 o p50 de NF- κ B en el núcleo de la célula endotelial en comparación con una célula endotelial a la que no se le ha administrado el ácido nucleico.

15. El método de la cláusula 11, donde dicha administración provoca una reducción de la expresión de la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), de E-selectina o de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) en la célula endotelial en comparación con una célula endotelial a la que no se le ha administrado el ácido nucleico.

16. El método de la cláusula 11, donde dicha célula endotelial se encuentra en un sujeto.

10 17. El método de la cláusula 16, donde dicho ácido nucleico se administra al sujeto por vía oral, intramuscular, subcutánea, arterial, intravenosa o por inhalación.

18. El método de la cláusula 16, donde dicho ácido nucleico se conjuga con uno o más polímeros, péptidos o polisacáridos.

19. El método de la cláusula 11, donde dicha célula endotelial es una célula endotelial *in vitro*.

15

20 LISTA DE SECUENCIAS

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc. et al.

<120> MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS VASCULARES

25

<130> 29618-0009WO1

<140> PCT/US2011/027772

<141> 2011-03-09

30

<150> 61/313.274

<151> 12/03/2010

<160> 130

35

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 23

<212> ARN

40

<213> Homo sapiens

<220>

<223> miR-181b humano maduro

<400> 1
aacauucauu gcugucggug ggu 23
 <210> 2
 <211> 110
 <212> ARN
 5 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> miR-181b-1 humano precursor

<400> 2
ccugugcaga gauuauuuuu uaaaaggguca caaucaacau ucauugcugu cgguggguug 60
aacugugugg acaagcucac ugaacaauga augcaacugu ggccccgcuu 110
 10 <210> 3
 <211> 89
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <223> miR-181b-2 humano precursor

<400> 3
cugauggcug cacucaacau ucauugcugu cgguggguuu gagucugaau caacucacug 60
aucaaugaa gcaaacugcg gaccaaaca 89
 <210> 4
 20 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Cebador directo de miR-181b

<400> 4
cccaagcttt gattgtaccc tatggct 27
 <210> 5
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso de miR-181b
 35

	<400> 5	
	cggggtacct gtacgtttga tggacaa	27
	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de VCAM-1 de ratón	
	<400> 6	
10	gttccagcga gggctctacc	19
	<210> 7	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador inverso de VCAM-1 de ratón	
	<400> 7	
20	aactcttggc aaacattagg tgt	23
	<210> 8	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador directo de E-selectina de ratón	
	<400> 8	
30	atgcctcgcg ctttctctc	19
	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador inverso de E-selectina de ratón	

	<400> 9	
	gtagtccccg tgacagtatg c	21
	<210> 10	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de ICAM-1 de ratón	
	<400> 10	
10	gtgatgctca ggtatccatc ca	22
	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador inverso de ICAM-1 de ratón	
	<400> 11	
	cacagttctc aaagcacagc g	21
	<210> 12	
20	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador directo de actina de ratón	
	<400> 12	
	gaaatcgtgc gtgacatcaa ag	22
	<210> 13	
	<211> 22	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de actina de ratón	
35	 	
	<400> 13	
	tgtagtttca tggatgccac ag	22
	<210> 14	

	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador directo de PAI-1 humano	
	<400> 14	
	catccccat cctacgtgg	19
	<210> 15	
10	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador inverso de PAI-1 humano	
	<400> 15	
	ccccataggg tgagaaaacc a	21
	<210> 16	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de VCAM-1 humano	
25		
	<400> 16	
	gctgctcaga ttggagactc a	21
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de VCAM-1 humano	
	<400> 17	
	cgctcagagg gctgtctatc	20
35	<210> 18	
	<211> 19	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de E-selectina humano	
5		
	<400> 18	
	aatccagcca atgggttcg	19
	<210> 19	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de E-selectina humano	
	<400> 19	
	gctcccatta gttcaaatcc ttct	24
15	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20		
	<220>	
	<223> Cebador directo de ICAM-1 humano	
	<400> 20	
	tctgtgtccc cctcaaaagt c	21
25	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador inverso de ICAM-1 humano	
	<400> 21	
	ggggtctcta tgcccaacaa	20
	<210> 22	
35	<211> 19	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de GAPDH humano	
5		
	<400> 22	
	atggggaagg tgaaggtcg	19
	<210> 23	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de GAPDH humano	
	<400> 23	
	ggggtcattg atggcaaca ta	22
15		
	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20		
	<220>	
	<223> Cebador directo de importina-alfa 3 de ratón	
	<400> 24	
	ccagtgatcg aaatccacca a	21
25		
	<210> 25	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30		
	<220>	
	<223> Cebador inverso de importina-alfa 3 de ratón	
	<400> 25	
	cgtttgttca gacgttccag at	22
	<210> 26	
35	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Cebador directo de importina-alfa 3 humano	
	<400> 26	
	tccagtgatc gaaatccacc a	21
5	<210> 27	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador inverso de importina-alfa 3 humano	
	<400> 27	
	cattggactg aactactgct tga	23
15	<210> 28	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador directo de Smad1 humano	
	<400> 28	
	gatgccaggt aggttggaat g	21
	<210> 29	
25	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador inverso de Smad1 humano	
	<400> 29	
	cgtgacactg tgataaacact gt	22
	<210> 30	
	<211> 29	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>

<223> Cebador directo de importina-alfa 3 sitio 1 humano

<400> 30

ctagtcttgc tatgaagcag tgtgtgaaa

29

5

<210> 31

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador inverso de importina-alfa 3 sitio 1 humano

<400> 31

agcttttcac aactgcttc atagcaaga

29

15

<210> 32

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador directo de importina-alfa 3 sitio 2 humano

<400> 32

ctagtatgga caatggtgaa tgaatgtca

29

25

<210> 33

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de importina-alfa 3 sitio 2 humano

30

<400> 33

agcttgacat tcattcaaca ttgtccata

29

<210> 34

<211> 29

<212> ADN

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de importina-alfa 3 sitio 3 humano

<400> 34

ctagtcctgtg tacgagagcg tggttgtga

29

<210> 35

5 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador inverso de importina-alfa 3 sitio 3 humano

<400> 35

agcttcacaa ccacgctctc gtacacaga

29

<210> 36

<211> 29

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador directo de importina-alfa 3 sitio 4 humano

<400> 36

ctagttggtt tactctgcag cctgtgtta

29

<210> 37

<211> 29

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de importina-alfa 3 sitio 4 humano

<400> 37

agcttaacac aggctgcaga gtaaaccac

29

30 <210> 38

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Cebador directo de importina-alfa 3 sitio 5 humano

	<400> 38	
	ctagttgcat ttgcaccaga tgaatgta	29
	<210> 39	
	<211> 29	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sitio de importina-alfa 3 humano	
10		
	<400> 39	
	agcttaacat tcctctggtg caaatgcaa	29
	<210> 40	
	<211> 29	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sitio de importina-alfa 3 humano	
20		
	<400> 40	
	ctagttttcc ctcaaaatag actgtgta	29
	<210> 41	
	<211> 29	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sitio de importina-alfa 3 humano	
	<400> 41	
30	agcttaacac agtctatattt gagggaaaa	29
	<210> 42	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35		
	<220>	
	<223> Sitio de importina-alfa 3 humano	

	<400> 42	
	ctagtataacc gtgctgtggt taaatgta	29
	<210> 43	
	<211> 29	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sitio de importina-alfa 3 humano	
10		
	<400> 43	
	agcttaacat ttaaacacag cacggtata	29
	<210> 44	
	<211> 29	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sitio de importina-alfa 3 humano	
20	<400> 44	
	ctagtcttcc cctttgagca caagtgta	29
	<210> 45	
	<211> 29	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de importina-alfa 3 sitio 8 humano	
	<400> 45	
	agcttaacac ttgtgctcaa aggggaaga	29
30	<210> 46	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador directo de importina-alfa 3 sitio 1 mutante humano	

	<400> 46	
	ctagtcttgc tatgataaag cttctgaaa	29
	<210> 47	
	<211> 29	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de importina-alfa 3 sitio 1 mutante humano	
	<400> 47	
10	agcttttcag aagctttatc atagcaaga	29
	<210> 48	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador directo de importina-alfa 3 sitio 2 mutante humano	
	<400> 48	
20	ctagtaggct gaatcttgcc aacatcaca	29
	<210> 49	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador inverso de importina-alfa 3 sitio 2 mutante humano	
	<400> 49	
30	agcttgtgat gttggcaaga ttcagccta	29
	<210> 50	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador directo de 3'-UTR de importina-alfa 1 humano	

	<400> 50	
	acgagctcat catgtagctg agacataaat ttg	33
	<210> 51	
	<211> 31	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de 3'-UTR de importina-alfa 1 humano	
	<400> 51	
10	ataacgcgta gaaaagggtg gacttgaatg t	31
	<210> 52	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador directo de 3'-UTR de importina-alfa 3 humano	
	<400> 52	
	acgagctcaa agatggtgtg gaagttagg	29
20	<210> 53	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador inverso de 3'-UTR de importina-alfa 3 humano	
	<400> 53	
	ataacgcgctc acagcacggt attctaccac	30
	<210> 54	
30	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador directo de 4'-UTR de importina-alfa 3 humano	

	<400> 54	
	acgagctcat tcagttgagt gcagcatc	28
	<210> 55	
	<211> 29	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de 4'-UTR de importina-alfa 3 humano	
	<400> 55	
10	ataacgcgctc ctctacacag atccctgtc	29
	<210> 56	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador directo de 5'-UTR de importina-alfa 3 humano	
	<400> 56	
	acgagctcag caatactctg ctttcacg	28
	<210> 57	
20	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador inverso de 5'-UTR de importina-alfa 3 humano	
	<400> 57	
	ataacgcgctg attagaatcg agctgcacc	29
	<210> 58	
	<211> 27	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de 3'-UTR de VCAM-1 humano	
35	<400> 58	
	tcgacgcgctg caaatccttg atactgc	27

	<210> 59	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador inverso de 3'-UTR de VCAM-1 humano	
	<400> 59	
	cccaagctta ttgggaaagt tgcacag	27
10	<210> 60	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador directo de BCL2A1 humano	
	<400> 60	
	tacaggctgg ctcaggacta t	21
	<210> 61	
20	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador inverso de BCL2A1 humano	
	<400> 61	
	ttttgtagca ctctggacgt tt	22
	<210> 62	
	<211> 23	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de C1QTNF1 humano	
35	 	
	<400> 62	
	caagggaaat atggcaaaac agg	23

	<210> 63	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador inverso de C1QTNF1 humano	
	<400> 63	
	atcacccgtct ggtagtagtg g	21
10	<210> 64	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador directo de CCL1 humano	
	<400> 64	
	tcatttgcgg agcaagagat t	21
	<210> 65	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de CCL1 humano	
25	<400> 65	
	ctgaacccat ccaactgtgt c	21
	<210> 66	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de CCL7 humano	
	<400> 66	
	ccaatgcatc cacatgctgc	20
35	<210> 67	
	<211> 19	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador inverso de CCL7 humano	
	<400> 67	
	gcttcccagg gacaccgac	19
	<210> 68	
	<211> 24	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de CCR2 humano	
15		
	<400> 68	
	gaccaggaaa gaatgtgaaa gtga	24
	<210> 69	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de CCR2 humano	
	<400> 69	
	gctctgccaa ttgactttcc tt	22
25		
	<210> 70	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30		
	<220>	
	<223> Cebador directo de CFB humano	
	<400> 70	
	gcggcccctt gatagttcac	20
35		
	<210> 71	
	<211> 20	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador inverso de CFB humano	
	<400> 71	
	cagggcagca cttgaaagag	20
	<210> 72	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de CSF2 humano	
15		
	<400> 72	
	gggagcatgt gaatgccatc	20
	<210> 73	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de CSF2 humano	
	<400> 73	
	gcagtgtctc tactcaggtt cag	23
25	<210> 74	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30		
	<220>	
	<223> Cebador directo de CX3CL1 humano	
	<400> 74	
	accacgggtgt gacgaaatg	19
35	<210> 75	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Cebador inverso de CX3CL1 humano		
	<400> 75		
	ctccaagatg attgcgcggtt t		21
5	<210> 76		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Cebador directo de CXCL1 humano		
	<400> 76		
	aggaattca cccaagaac		20
	<210> 77		
15	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	<223> Cebador inverso de CXCL1 humano		
	<400> 77		
	actatggggg atgcaggatt		20
	<210> 78		
	<211> 21		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo de CXCL16 humano		
30	<400> 78		
	cagcgtcact ggaagttggtt a		21
	<210> 79		
	<211> 21		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Cebador inverso de CXCL16 humano		
	<400> 79		
	caccgatggt aagctctcag g		21
5	<210> 80		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Cebador directo de CXCL3 humano		
	<400> 80		
	ccaaaccgaa gtcatagcca c		21
	<210> 81		
15	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	<223> Cebador inverso de CXCL3 humano		
	<400> 81		
	tgctcccctt gttcagtatc t		21
	<210> 82		
	<211> 20		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo de CXCL6 humano		
30			
	<400> 82		
	agagctgcgt tgcaacttgtt		20
	<210> 83		
	<211> 23		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		

<223> Cebador inverso de CXCL6 humano

<400> 83

gcagtttacc aatcgttttg ggg

23

5 <210> 84

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador directo de EGR1 humano

<400> 84

acctgaccgc agagtctttt c

21

<210> 85

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador inverso de EGR1 humano

<400> 85

gccagtatag gtgatggggg

20

<210> 86

<211> 22

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de EGR2 humano

30

<400> 86

atcccagtaa ctctcagtgg tt

22

<210> 87

<211> 20

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

	<223> Cebador inverso de EGR2 humano	
	<400> 87 ctccaccggg tagatgttgt	20
	<210> 88	
5	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador directo de EGR3 humano	
	<400> 88 gcgacctcta ctcagagcc	19
	<210> 89	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de EGR3 humano	
20	<400> 89 atggggaaga gattgctgtc c	21
	<210> 90	
	<211> 19	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de EGR4 humano	
	<400> 90 agcgagtttt ccgaacccg	19
30	<210> 91	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador inverso de EGR4 humano	

	<400> 91	
	gagtcggcta agtccccact	20
	<210> 92	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de IL1R1 humano	
	<400> 92	
10	acattgtgct ttggtacagg g	21
	<210> 93	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador inverso de IL1R1 humano	
	<400> 93	
	ccccaacagt ctttggatac ag	22
20	<210> 94	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador directo de LIF humano	
	<400> 94	
	gtaccgcata gtcgtgtacc t	21
	<210> 95	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador inverso de LIF humano	

	<400> 95	
	cacagcacgt tgctaaggag	20
	<210> 96	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de MMP11 humano	
	<400> 96	
10	gaggccctaa aggtatggag c	21
	<210> 97	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador inverso de MMP11 humano	
	<400> 97	
	cccttctcgg tgagtcttgg	20
20	<210> 98	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador directo de PLAU humano	
	<400> 98	
	gtgagcgact ccaaaggca	19
	<210> 99	
30	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador inverso de PLAU humano	

	<400> 99 gcagttgcac cagtgaatgt t	21
	<210> 100 <211> 21 <212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de PTGS2 humano	
10	<400> 100 gtgcaacact tgagtggcta t	21
	<210> 101 <211> 22 <212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso de PTGS2 humano	
20	<400> 101 agcaatttgc ctggtgaatg at	22
	<210> 102 <211> 22 <212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de S1PR1 humano	
30	<400> 102 cttgctgacc atttggaaaa cc	22
	<210> 103 <211> 20 <212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso de S1PR1 humano	

	<400> 103	
	ctgtgtaggc tactcctgcc	20
	<210> 104	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de SDC4 humano	
	<400> 104	
10	gctcttcgta ggcggagtc	19
	<210> 105	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador inverso de SDC4 humano	
	<400> 105	
	cctcatcgtc tggtagggct	20
	<210> 106	
20	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador directo de SELE humano	
	<400> 106	
	aatccagcca atgggttcg	19
	<210> 107	
	<211> 24	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de SELE humano	
	<400> 107	
35	gctccatta gttcaaatcc ttct	24

	<210> 108	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador directo de SERPINE1 humano	
	<400> 108	
	catcccccat cctacgtgg	19
10	<210> 109	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador inverso de SERPINE1 humano	
	<400> 109	
	ccccataggg tgagaaaacc a	21
20	<210> 110	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador directo de TIMP3 humano	
	<400> 110	
	catgtgcagt acatccacac g	21
30	<210> 111	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador inverso de TIMP3 humano	
	<400> 111	
	acatccttgcc atcatagacg c	21
	<210> 112	

	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador directo de TNFRSF11B humano	
	<400> 112	
	aagggcgcta ccttgagata g	21
	<210> 113	
10	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador inverso de TNFRSF11B humano	
	<400> 113	
	gcaaactgta tttcgctctg gg	22
	<210> 114	
	<211> 19	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de TRAF1 humano	
25		
	<400> 114	
	ccggcccctg atgagaatg	19
	<210> 115	
	<211> 22	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de TRAF1 humano	
	<400> 115	
35	ttcctgggct tatagactgg ag	22
	<210> 116	
	<211> 21	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador directo de VCAM1 humano	
	<400> 116	
	gctgctcaga ttggagactc a	21
	<210> 117	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de VCAM1 humano	
	<400> 117	
15	cgctcagagg gctgtctatc	20
	<210> 118	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador directo de GAPDH humano	
	<400> 118	
	atggggaagg tgaaggtcg	19
25	<210> 119	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador inverso de GAPDH humano	
	<400> 119	
	ggggtcattg atggcaaca ta	22
	<210> 120	
35	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>

<223> Región 3'-UTR sitio 1 de importina-alfa 3 humano

<400> 120

cuugcuauga agcagugugu gaa

23

5 <210> 121

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Región 3'-UTR sitio 2 de importina-alfa 3 humano

<400> 121

auggacaaug uugaaugaau guc

23

<210> 122

15 <211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Región 3'-UTR sitio 3 de importina-alfa 3 humano

<400> 122

cuguguacga gagcgugguu gug

23

<210> 123

<211> 23

25 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región 3'-UTR sitio 4 de importina-alfa 3 humano

<400> 123

ugguuuacuc ugcagccugu guu

23

30 <210> 124

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Región 3'-UTR sitio 5 de importina-alfa 3 humano

<400> 124

ugcauuugca ccagaugaau guu

23

<210> 125

5 <211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Región 3'-UTR sitio 6 de importina-alfa 3 humano

<400> 125

uuucccucaa aaagacugu guu

23

<210> 126

15 <211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Región 3'-UTR sitio 6 de importina-alfa 3 humano

<400> 126

uuucccucaa aaagacugu guu

<210> 127

<211> 23

25 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Región 3'-UTR sitio 7 de importina-alfa 3 humano

<400> 127

auaccgugcu guguuuaau guu

23

<210> 128

<211> 23

35 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región 3'-UTR sitio 8 de importina-alfa 3 humano

<400> 128

cuuccccuuu gagcacaagu guu

23

<210> 129

5 <211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Región 3'-UTR sitio 1 mutado de importina-alfa 3 humano

<400> 129

cuugcuauga uaaagcuucu gaa

23

<210> 130

<211> 23

15 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Región 3'-UTR sitio 2 mutado de importina-alfa 3 humano

<400> 130

aggcugaauc uugccaacau cac

23

25

30

35

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico para el uso en un método de tratamiento de la aterosclerosis en un sujeto, donde el método comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho ácido nucleico; y donde el ácido nucleico comprende la secuencia de ID SEC. N°: 1.
- 5 2. El ácido nucleico para el uso en un método de la reivindicación 1, donde dicho ácido nucleico comprende la secuencia de ID SEC. N°: 2 o ID SEC. N°: 3.
3. El ácido nucleico para el uso en un método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho ácido nucleico se conjuga con uno o más polímeros, péptidos y polisacáridos.
- 10 4. El ácido nucleico para el uso en un método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha administración provoca una reducción de la adhesión leucocitaria al endotelio del sujeto o una reducción de la extravasación leucocitaria del endotelio del sujeto en comparación con un sujeto de control al que no se le ha administrado el ácido nucleico.
- 15 5. El ácido nucleico para el uso en un método de la reivindicación 1, donde dicha administración provoca una reducción de la expresión de la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), de E-selectina o de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) en el endotelio del sujeto en comparación con un sujeto de control al que no se le ha administrado el ácido nucleico.
6. El ácido nucleico para el uso en un método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho ácido nucleico se administra al sujeto por vía oral, intramuscular, subcutánea, arterial, intravenosa o por inhalación.

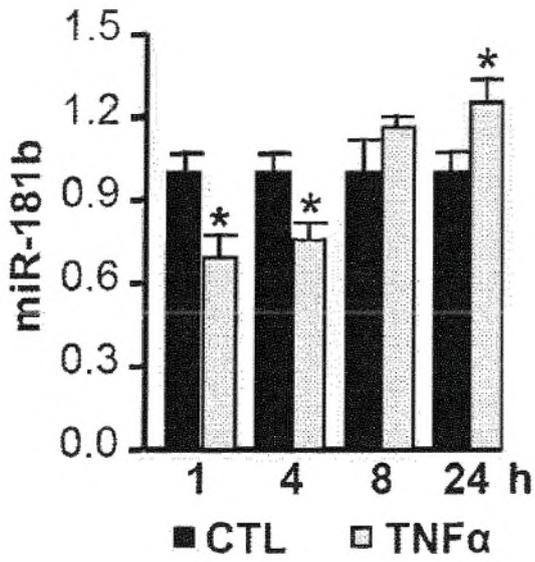


FIG. 1A

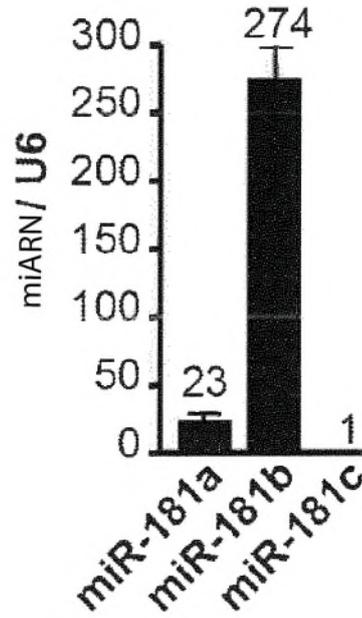


FIG. 1B

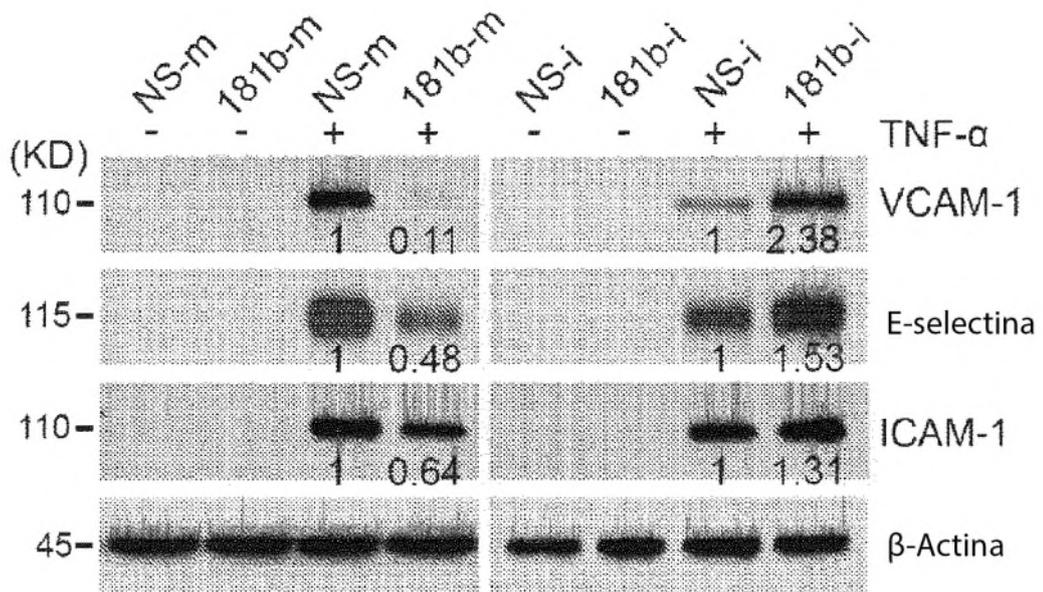


FIG. 1C

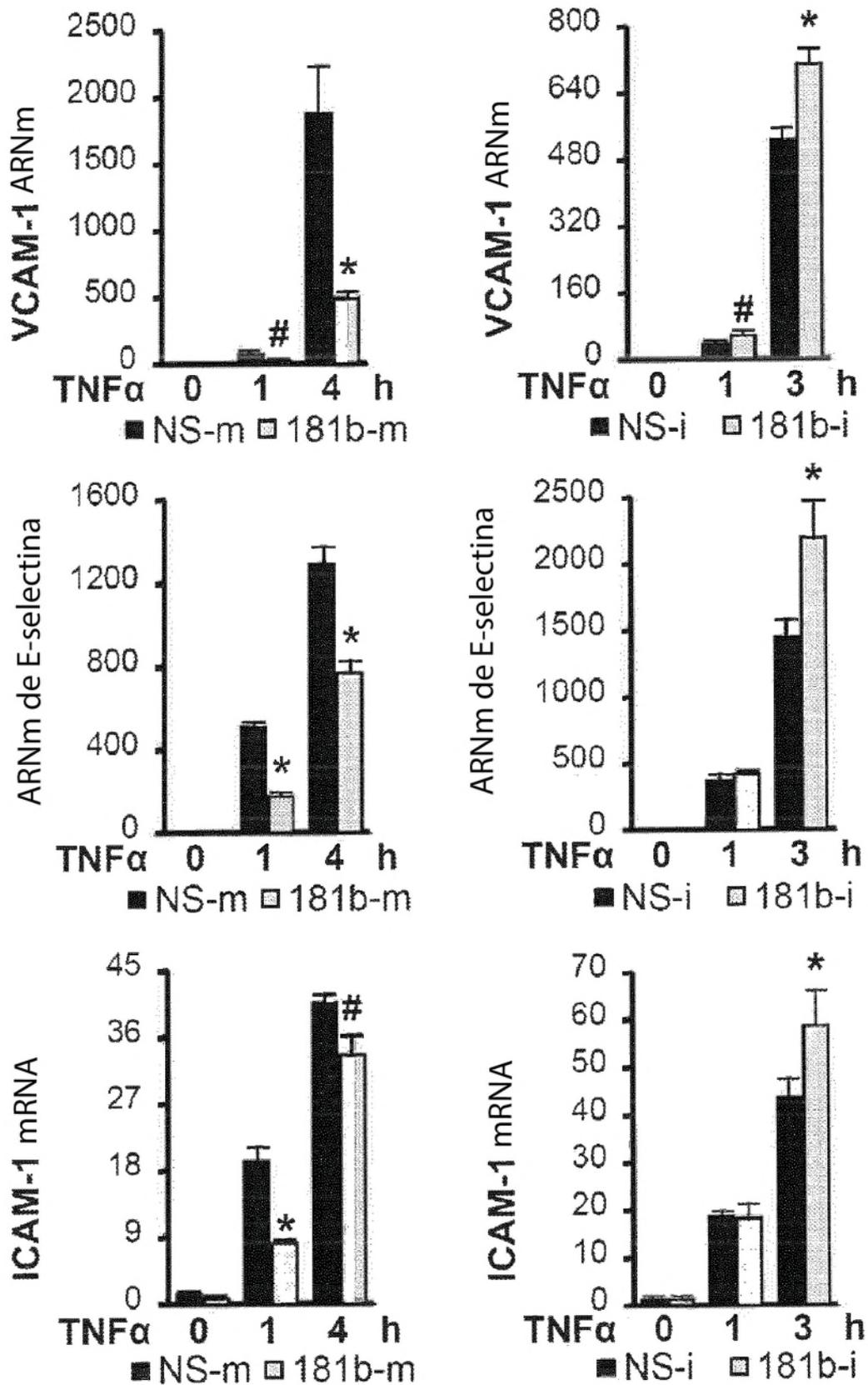


FIG. 1D

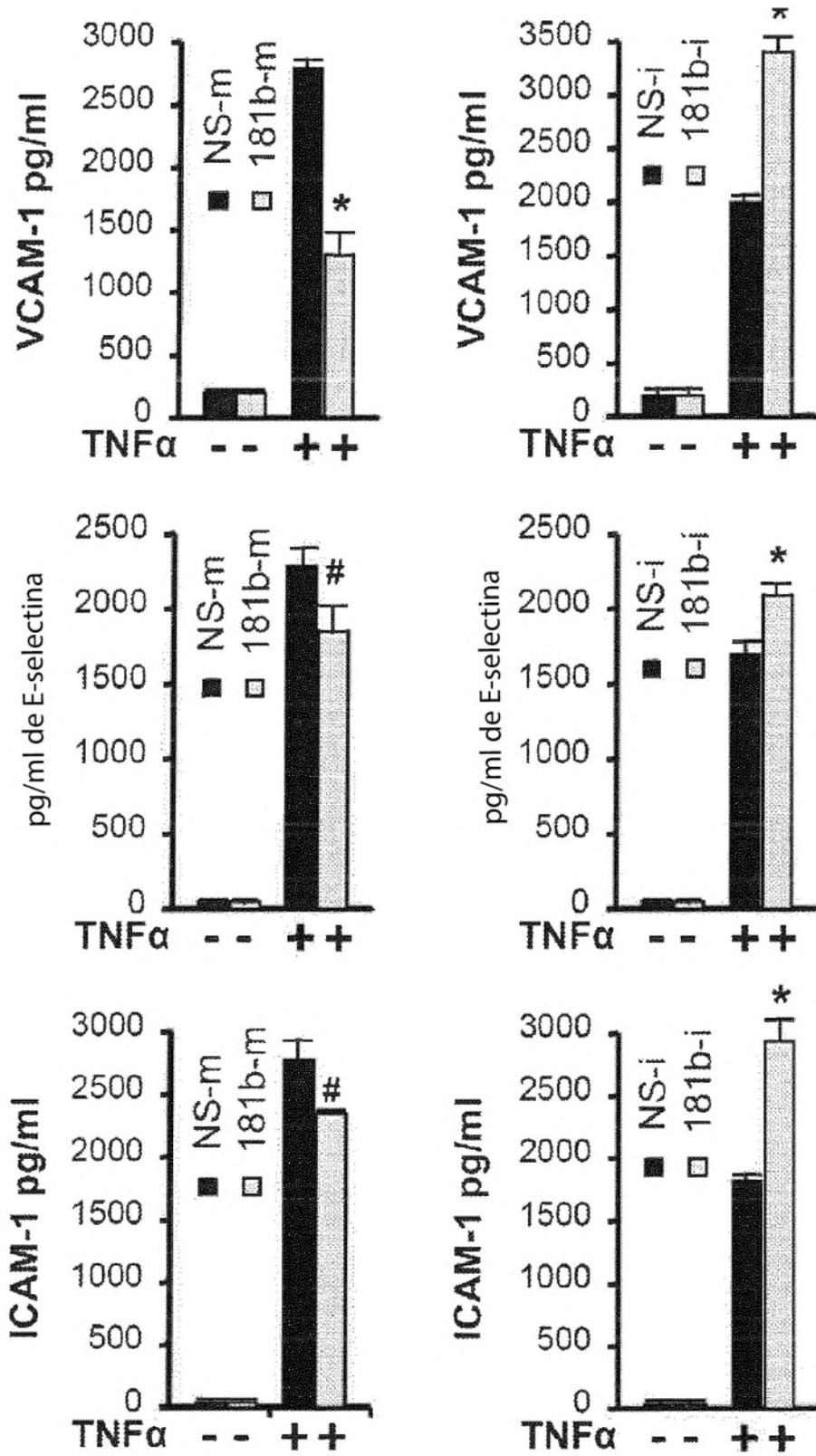


FIG. 1E

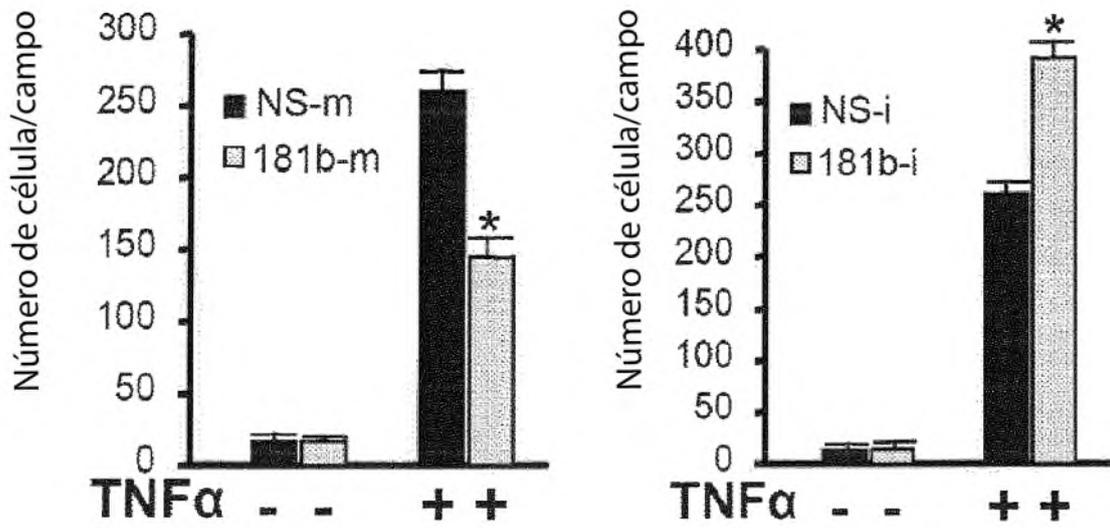
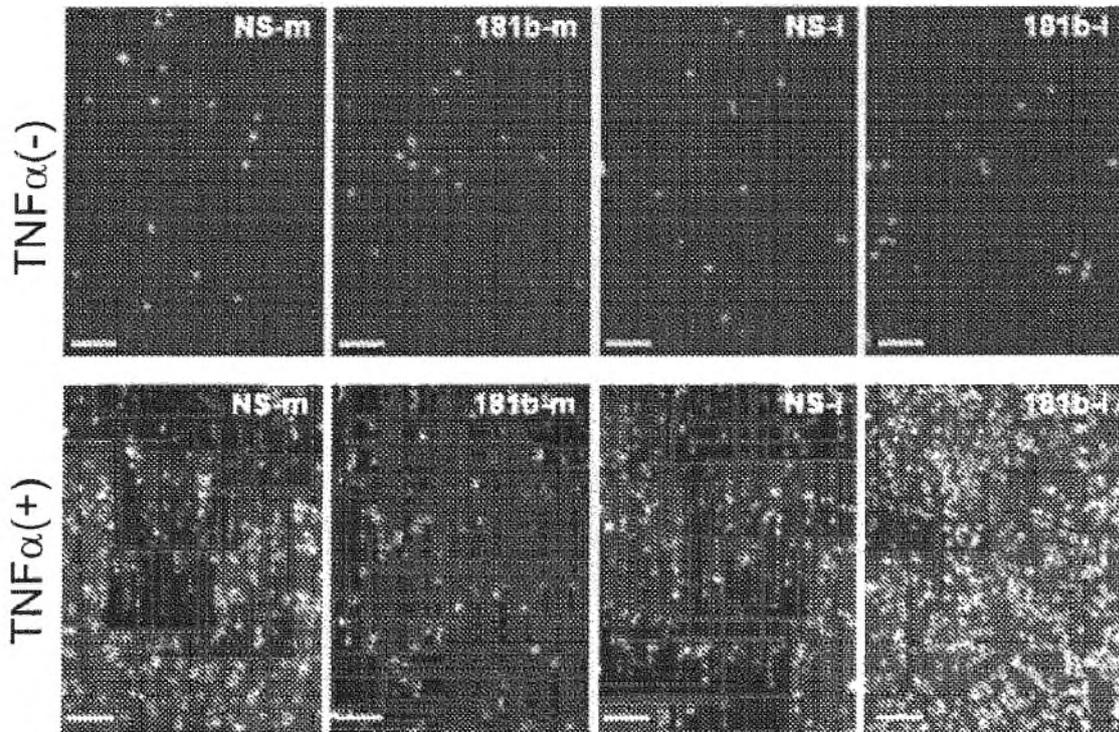


FIG. 1F

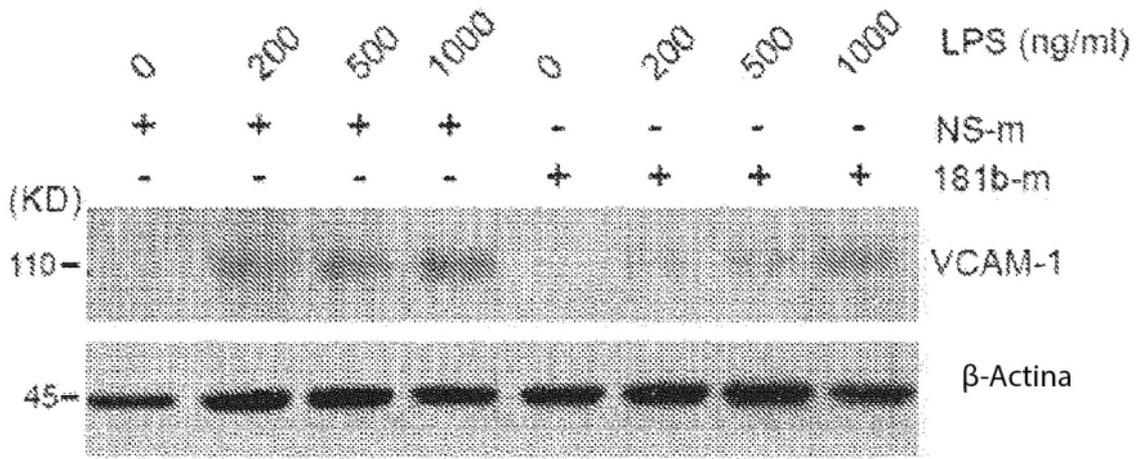


FIG. 2A

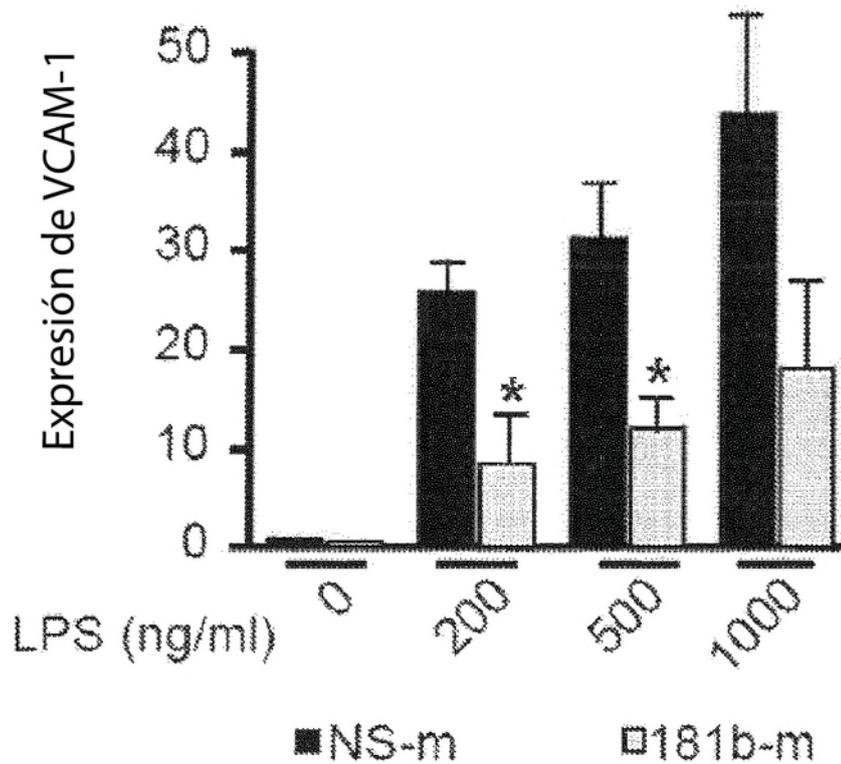


FIG. 2B

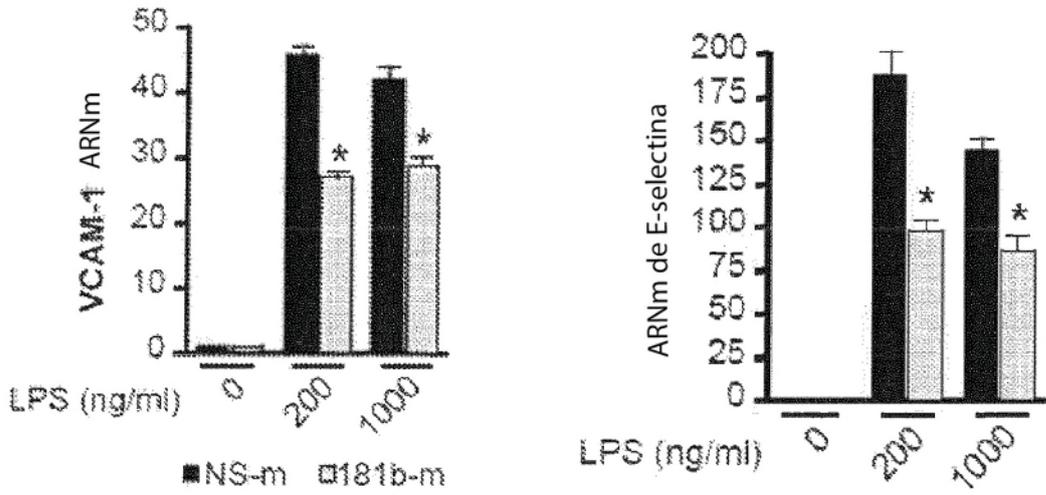


FIG. 2C

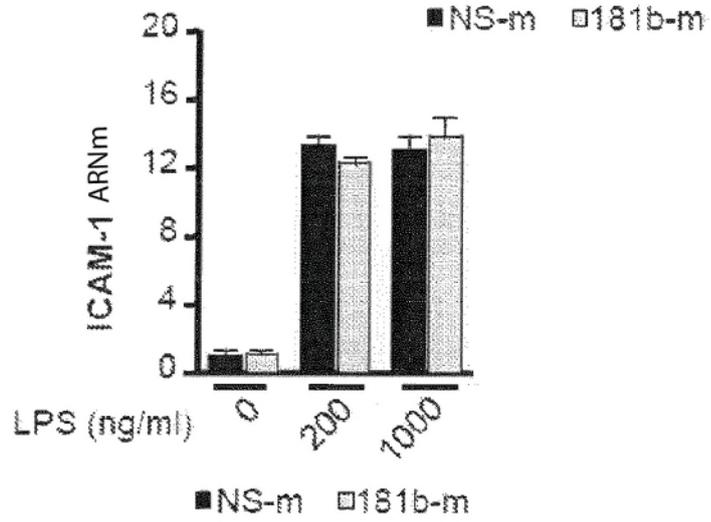
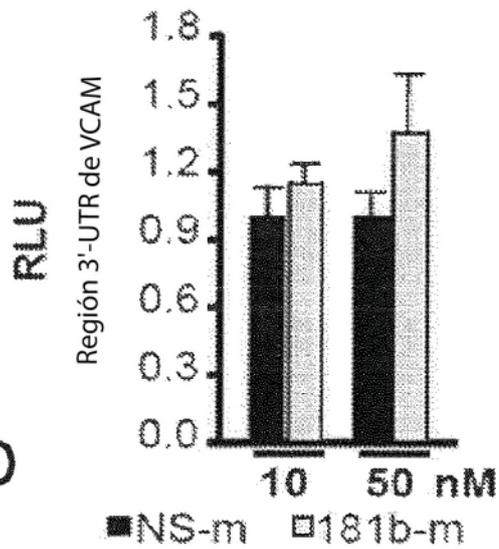


FIG. 2D



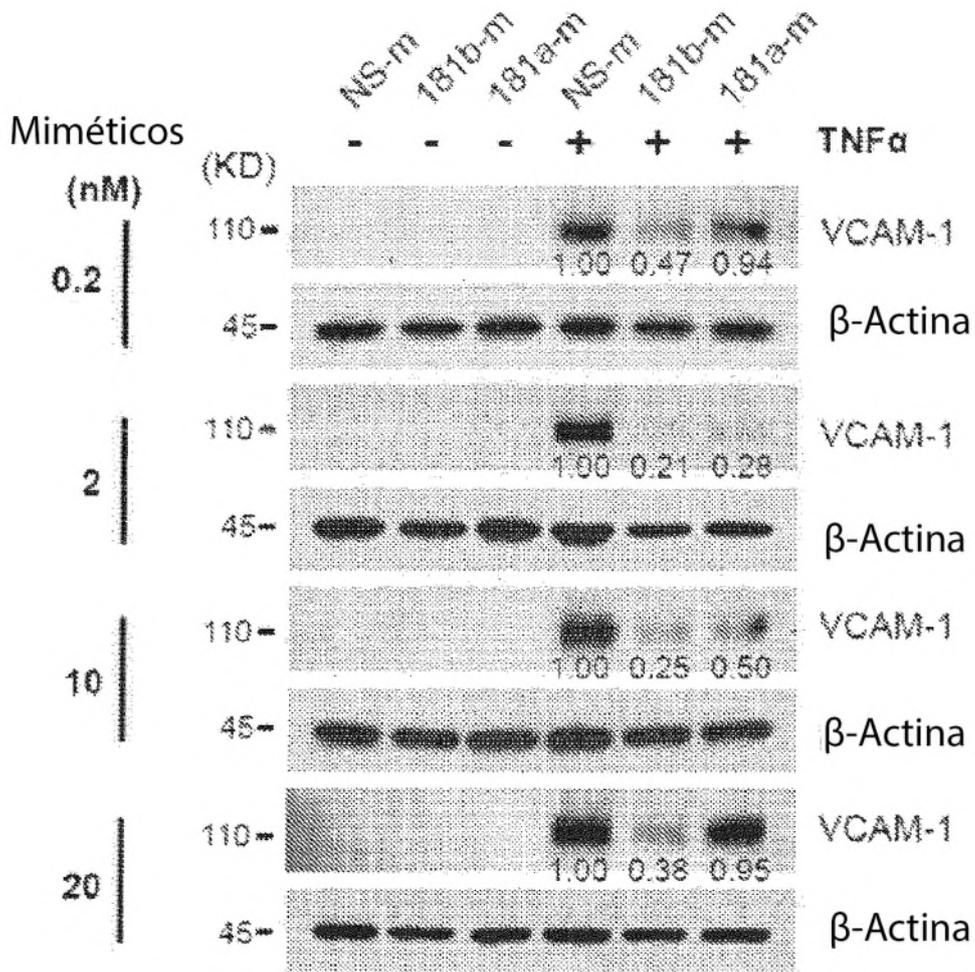


FIG. 2E

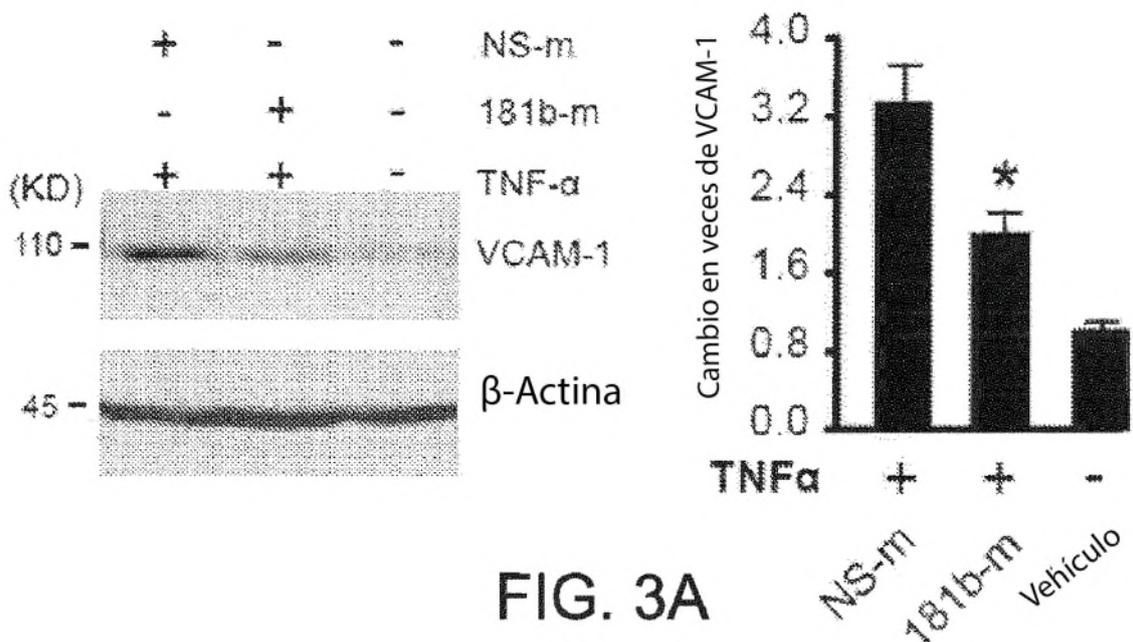


FIG. 3A

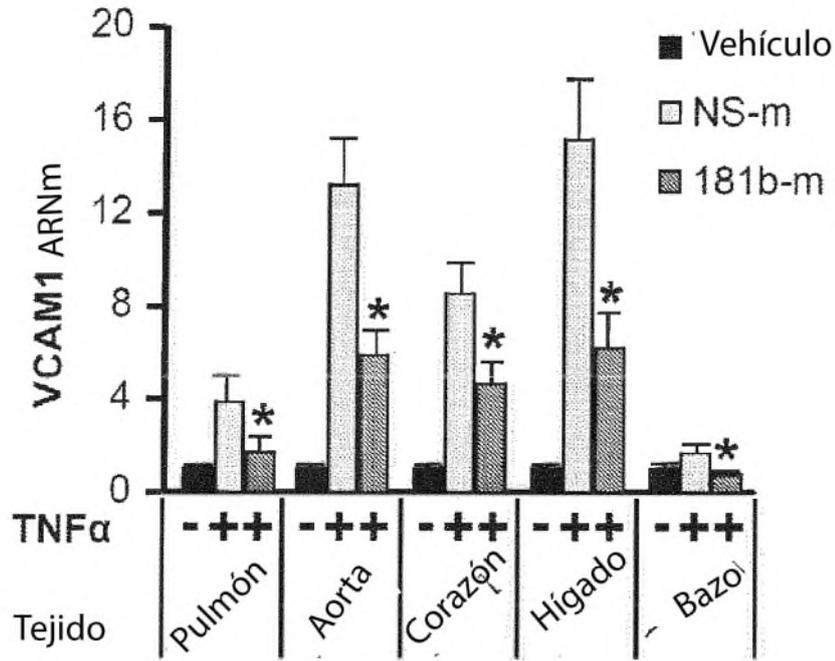


FIG. 3B

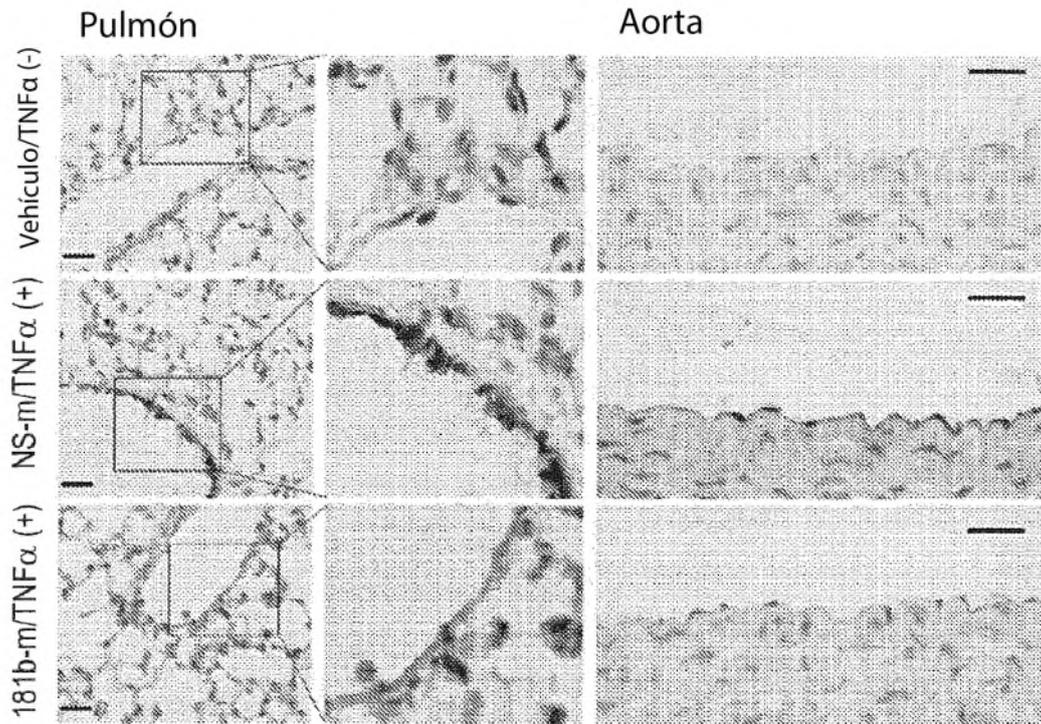


FIG. 3C

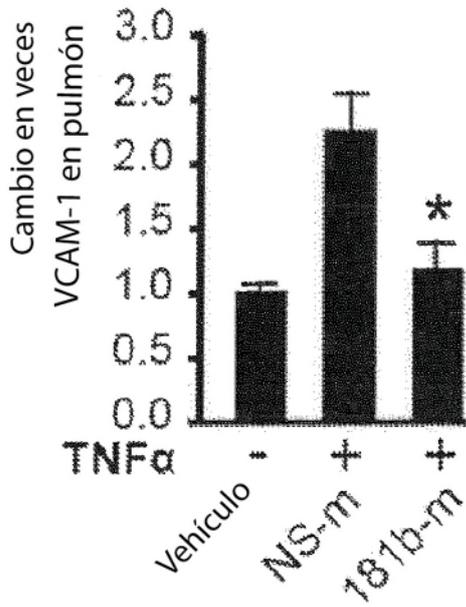


FIG. 3D

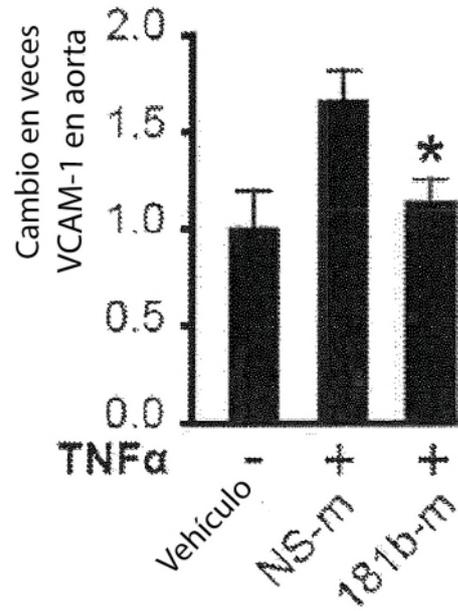


FIG. 3E

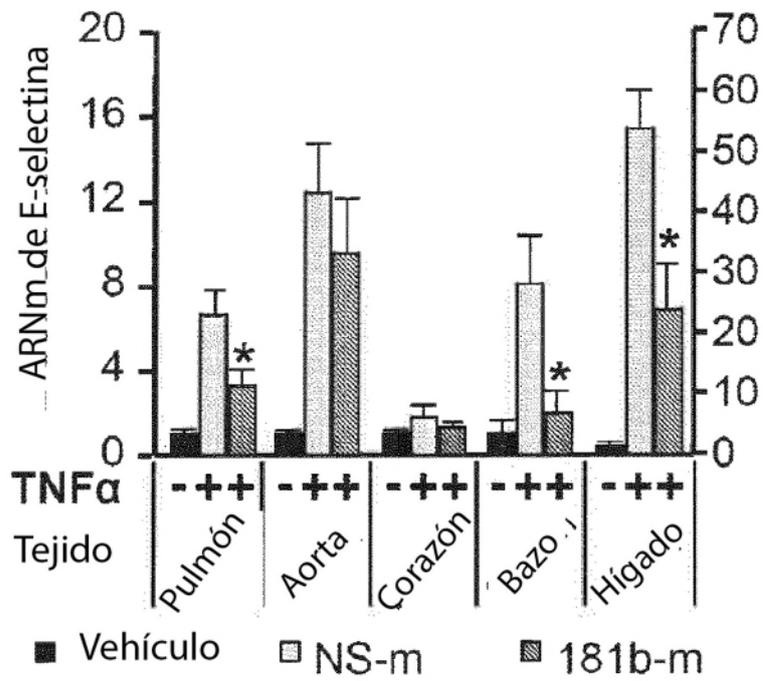


FIG. 4A

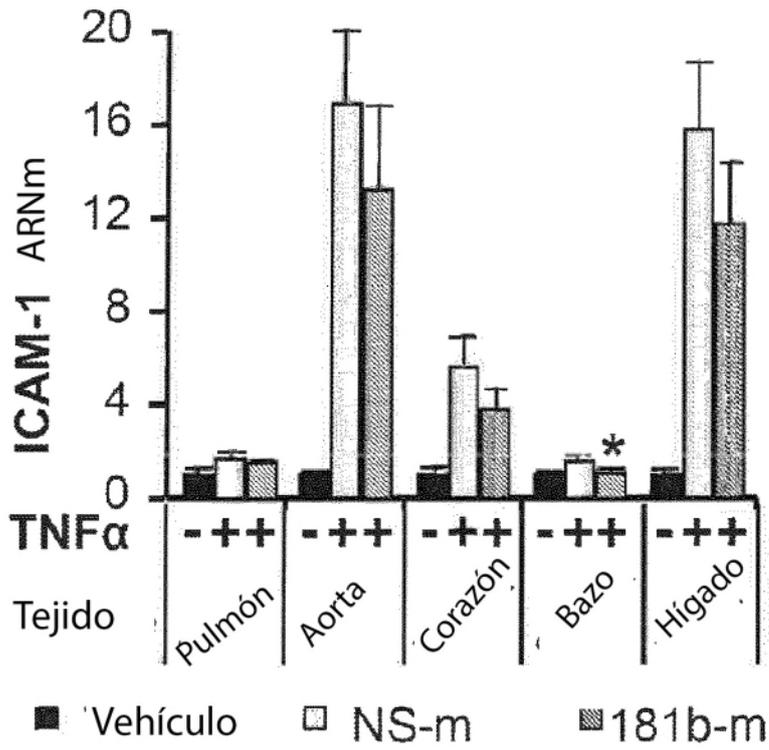


FIG. 4B

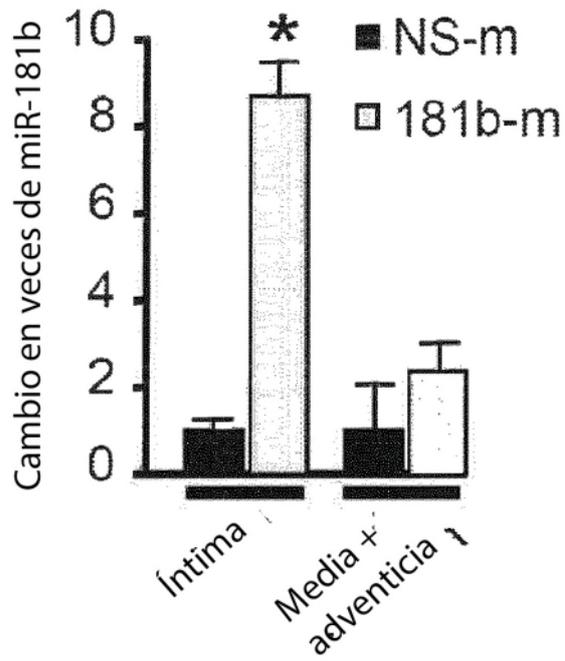


FIG. 4C

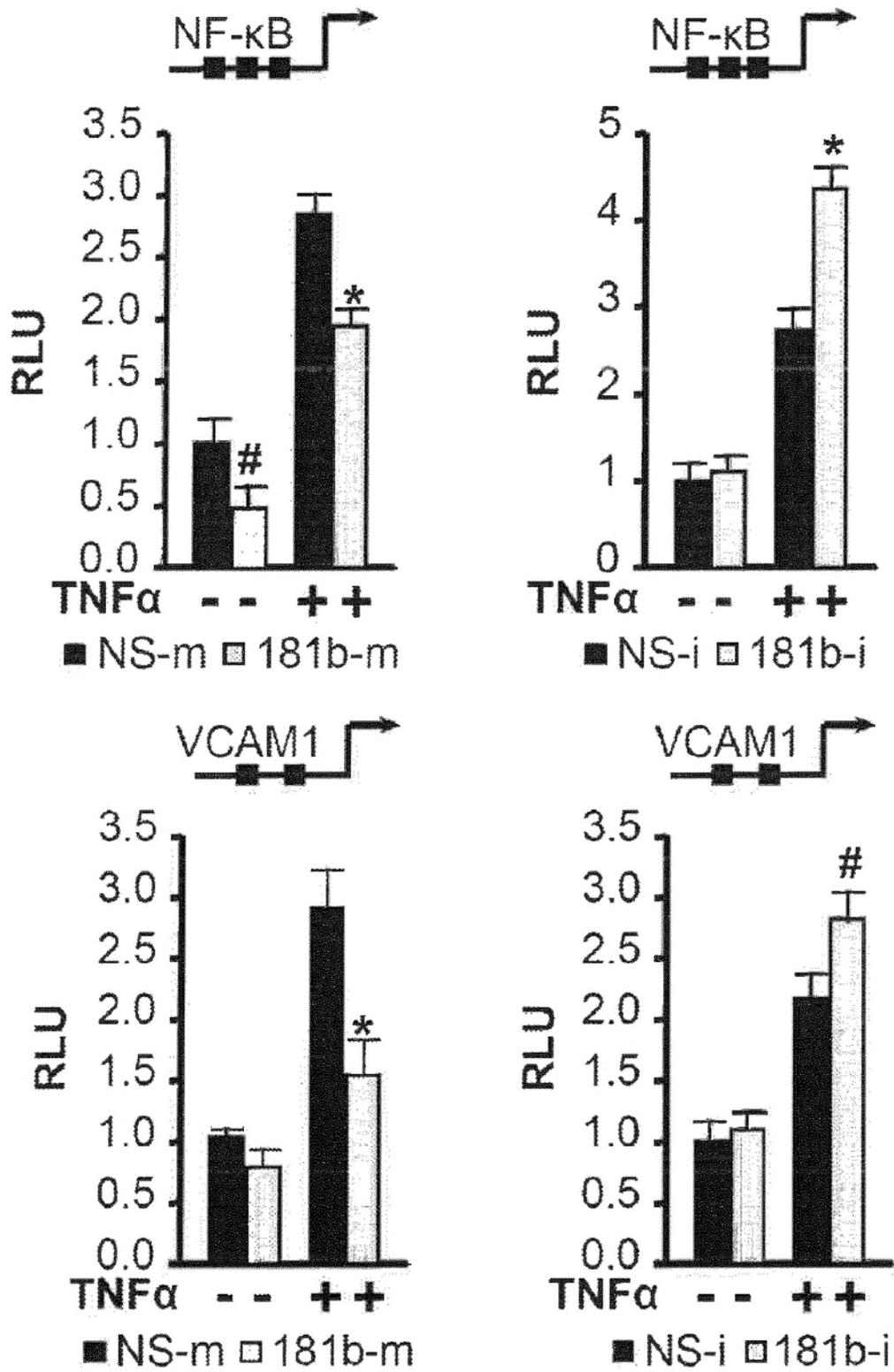


FIG. 5A

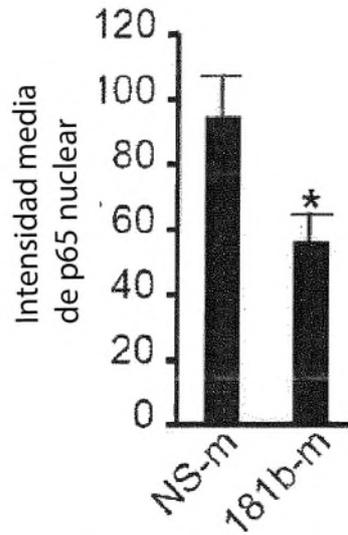


FIG. 5B

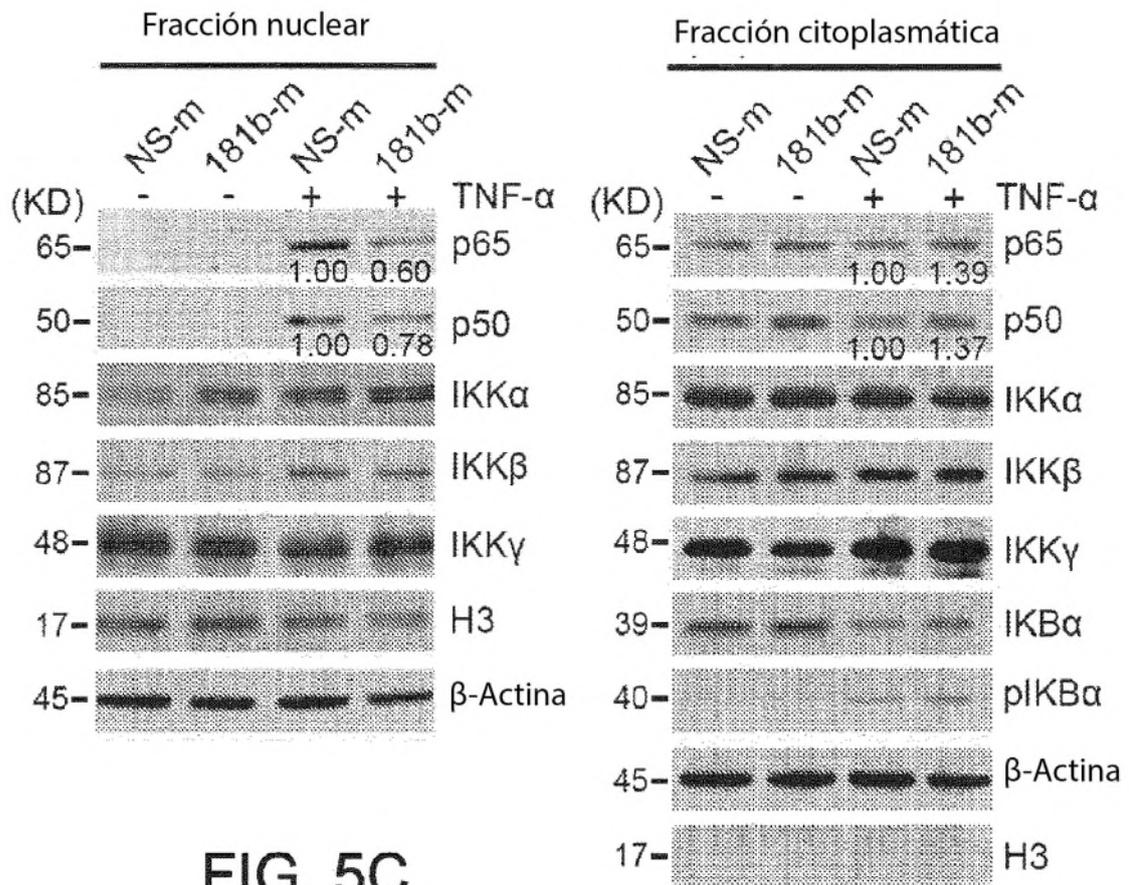


FIG. 5C

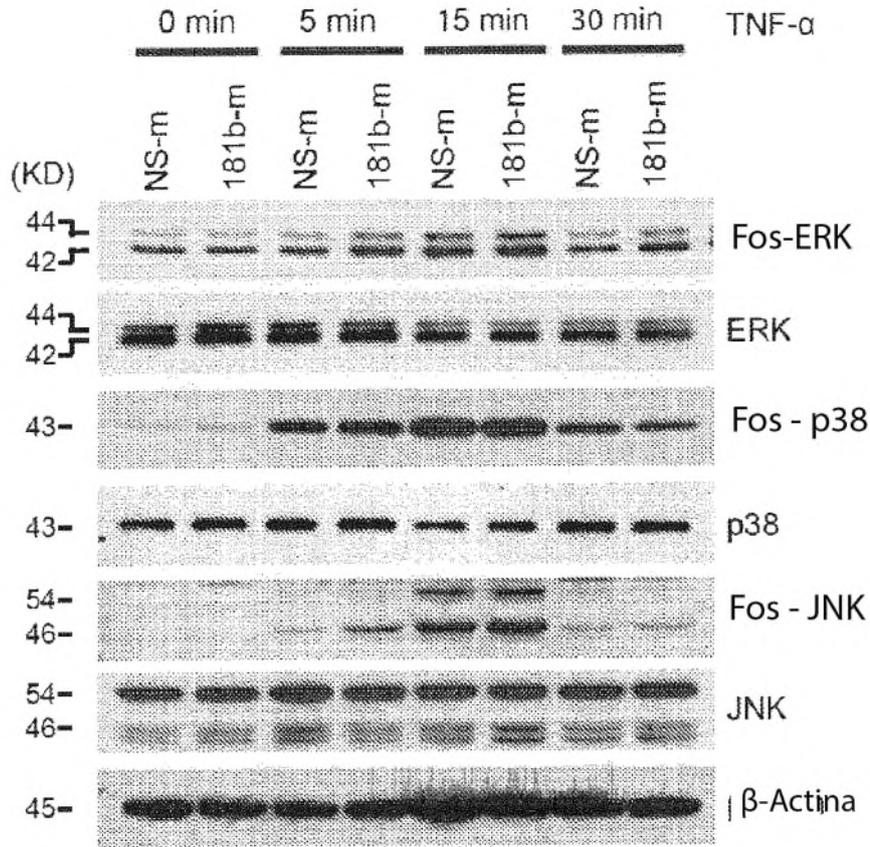


FIG. 6

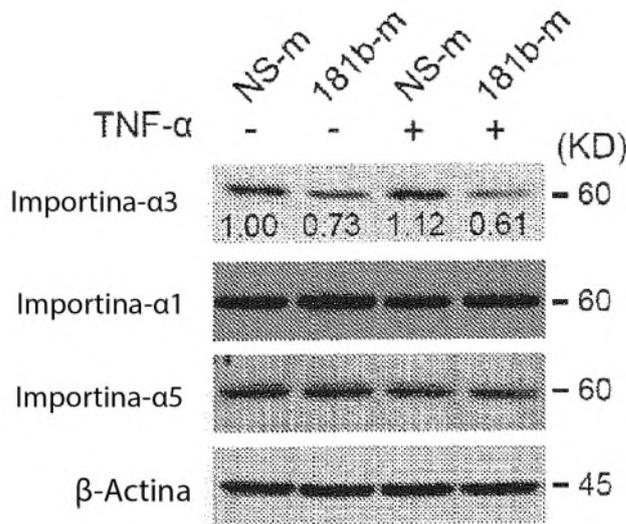


FIG. 7A

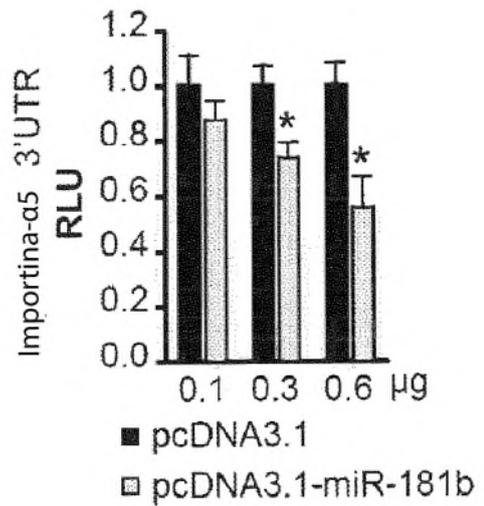


FIG. 7B

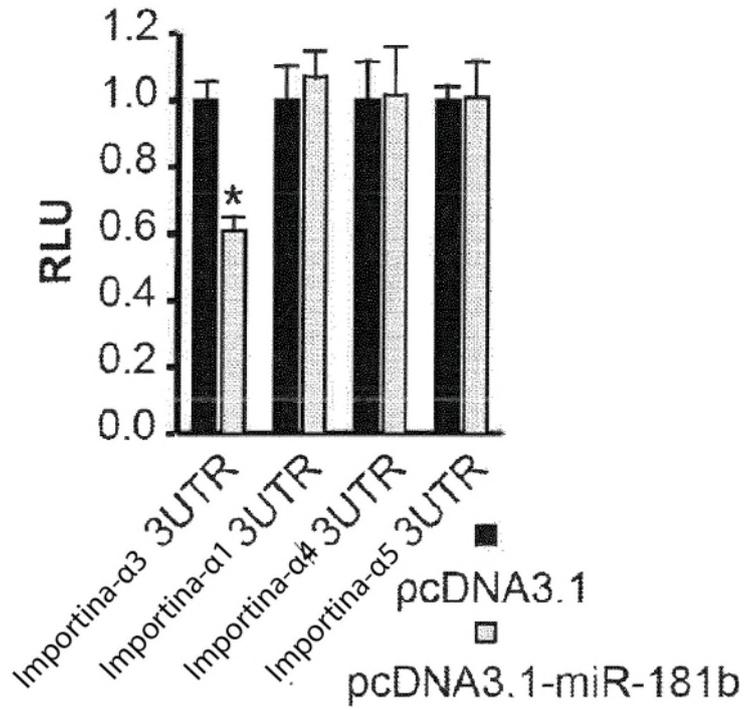


FIG. 7C

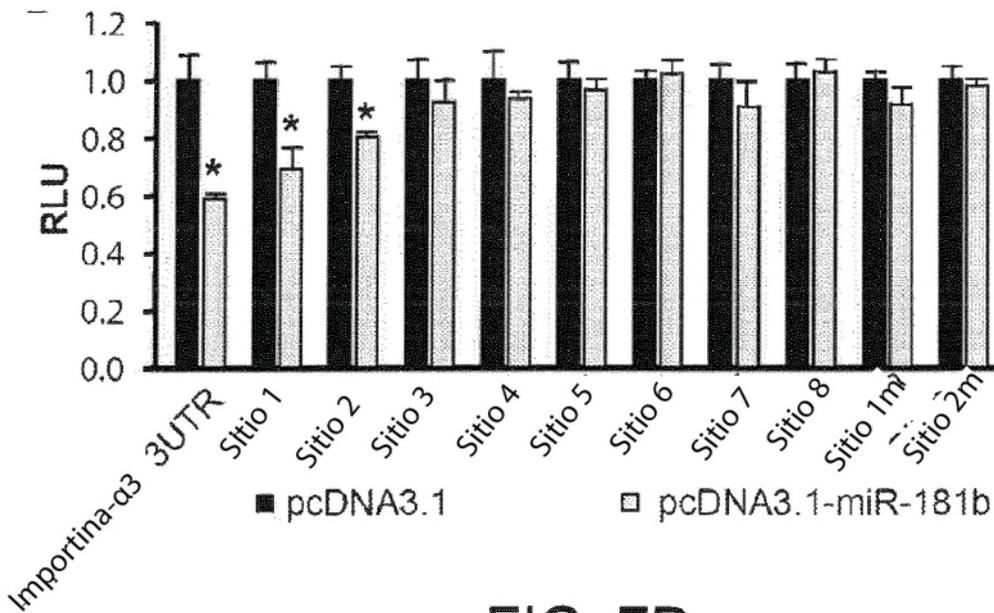
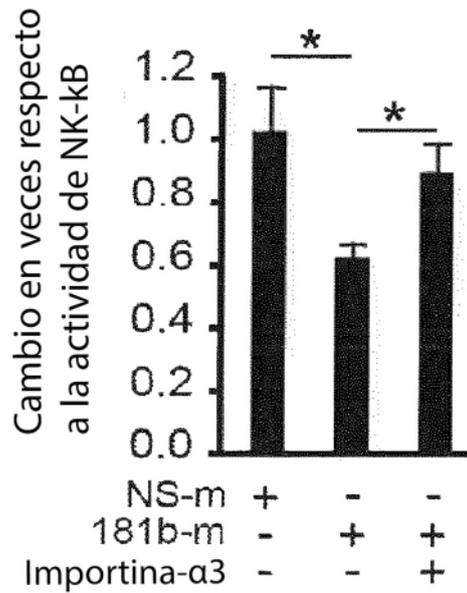
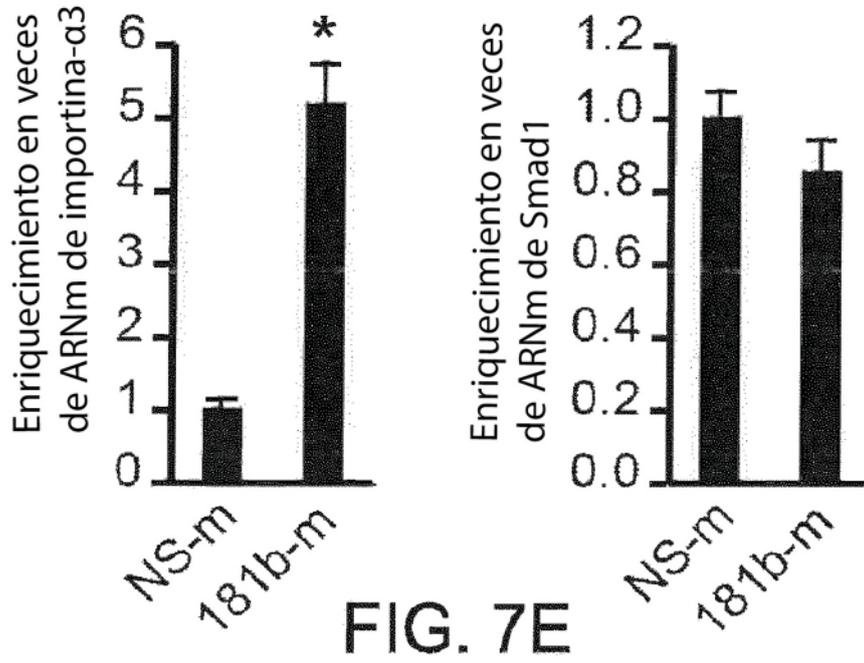


FIG. 7D



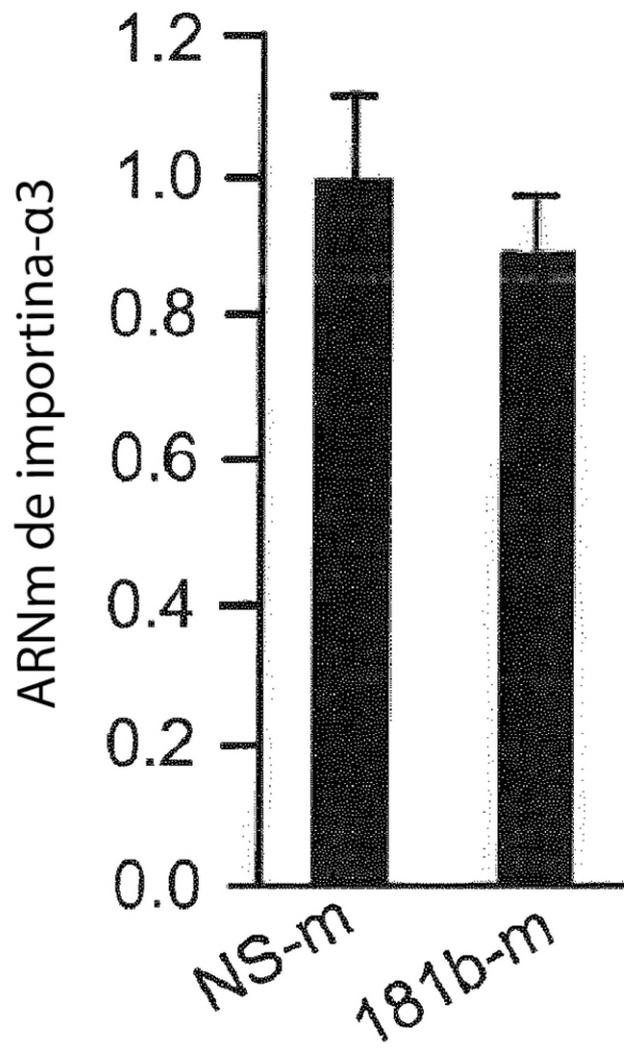


FIG. 8B

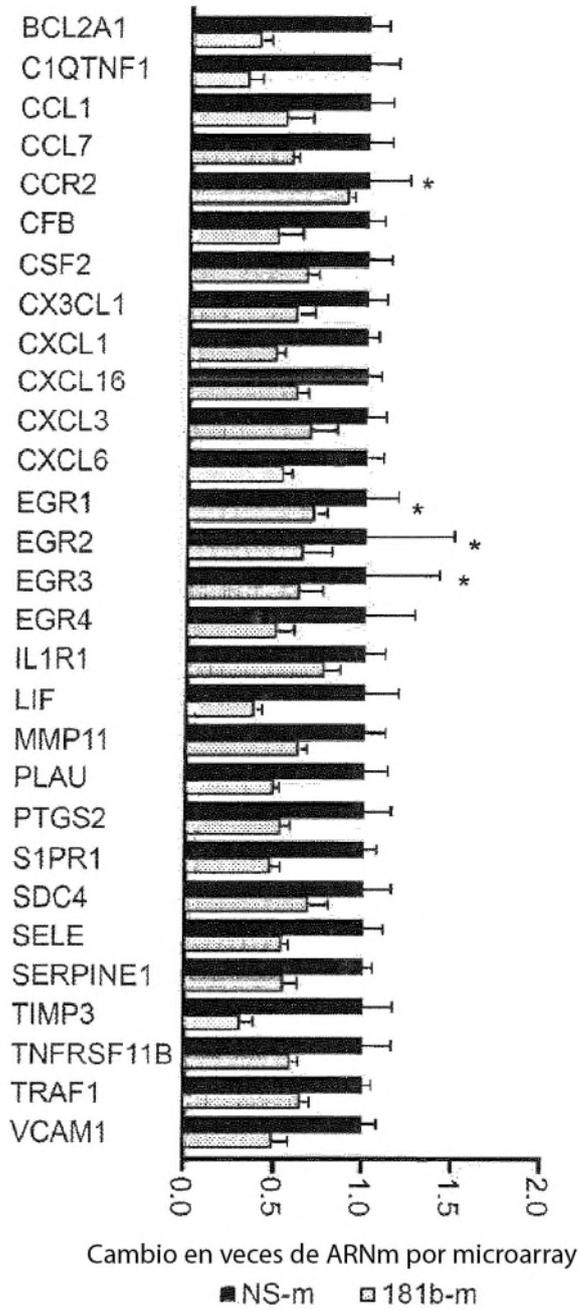


FIG. 9A

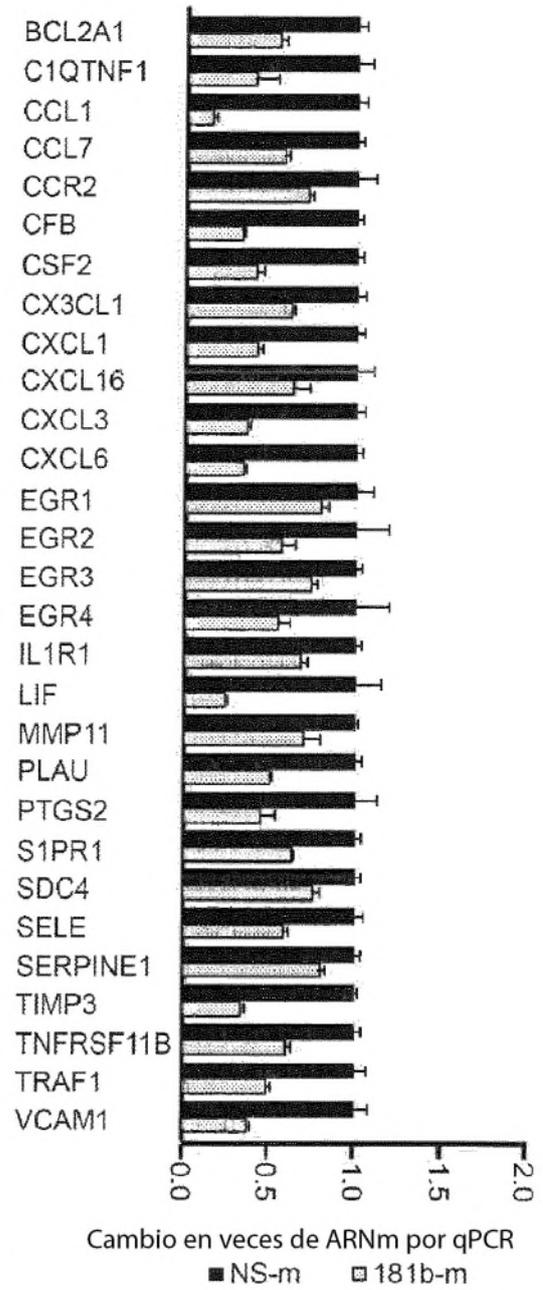


FIG. 9B

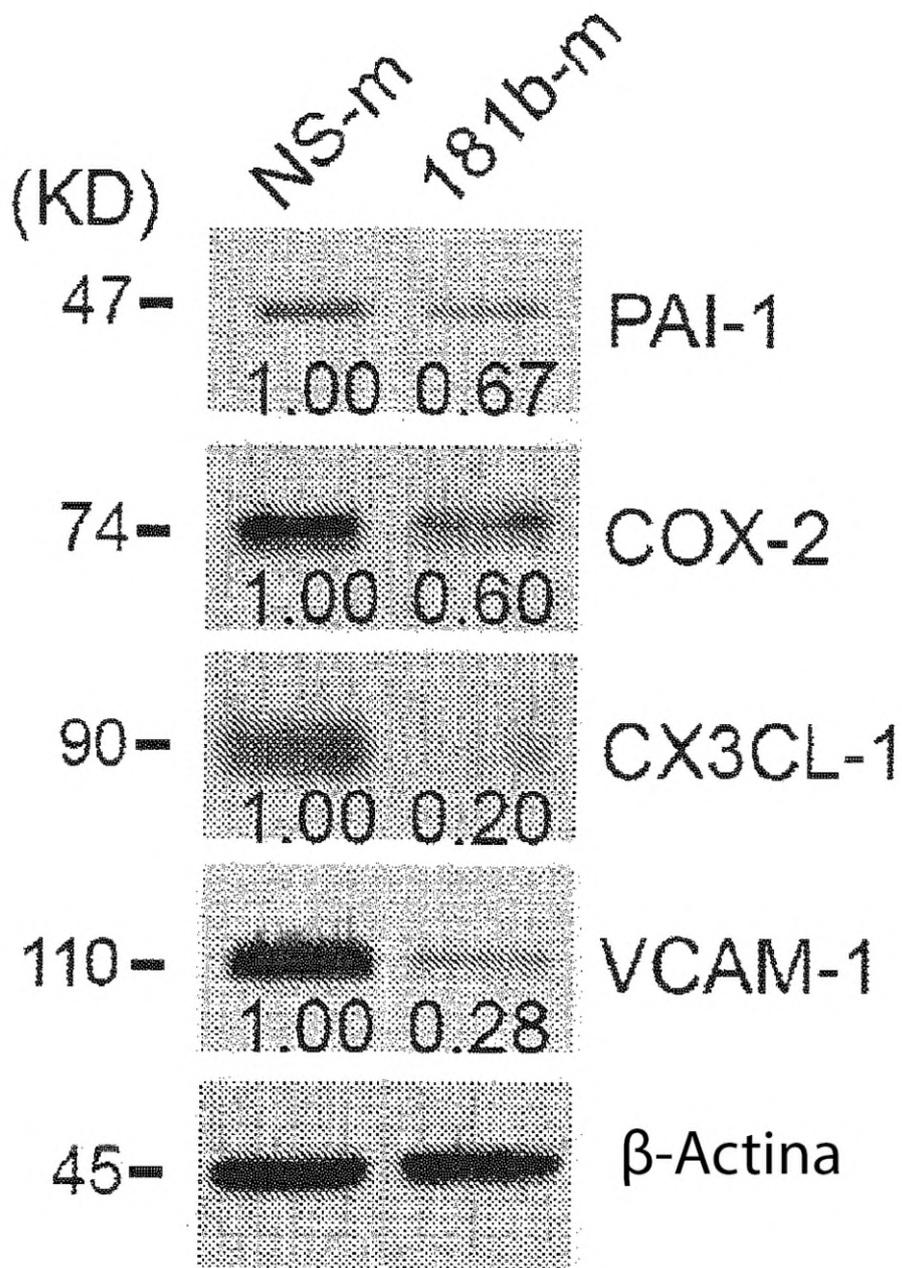


FIG. 9C

Procesos biológicos GO enriquecidos regulados a la baja en las células de sobreexpresión de miR-181b, identificados por GSEA con una tasa de descubrimiento falso (FDR) del 25%.

Procesos biológicos GO	Descripción del grupo de genes	FDR
GO:0034097	Respuesta al estímulo de citoquinas	0.013
GO:0030335	Regulación positiva de la migración celular	0.171
GO:0050727	Regulación de la respuesta inflamatoria	0.178
GO:0006954	Respuesta inflamatoria	0.194
GO:0006935	Quimiotaxis	0.195
GO:0007249	Cascada I-kappaB kinase/NF-kappaB	0.224

FIG. 9D

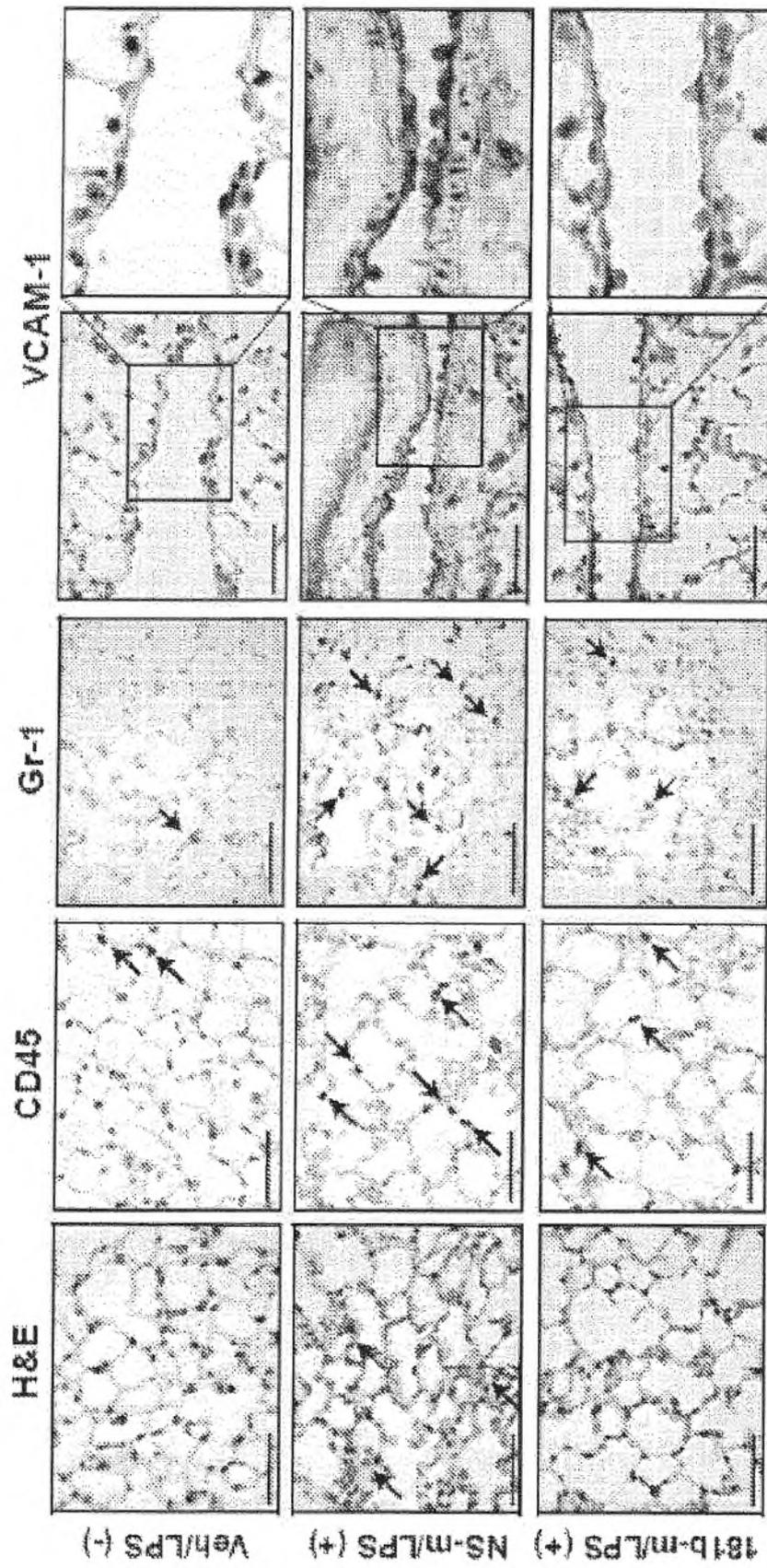


FIG. 10A

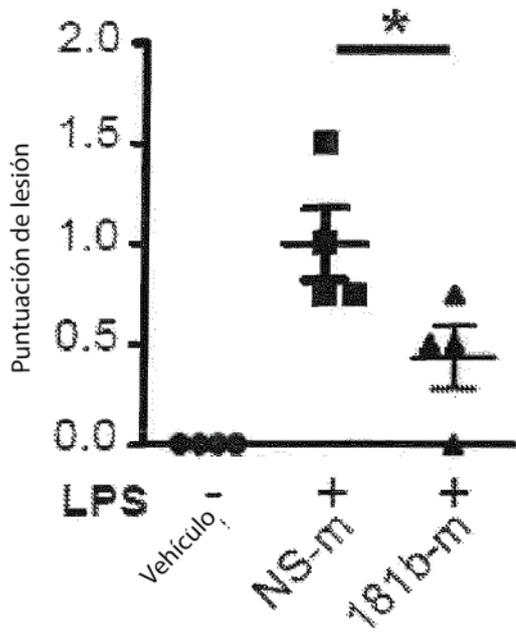


FIG. 10B

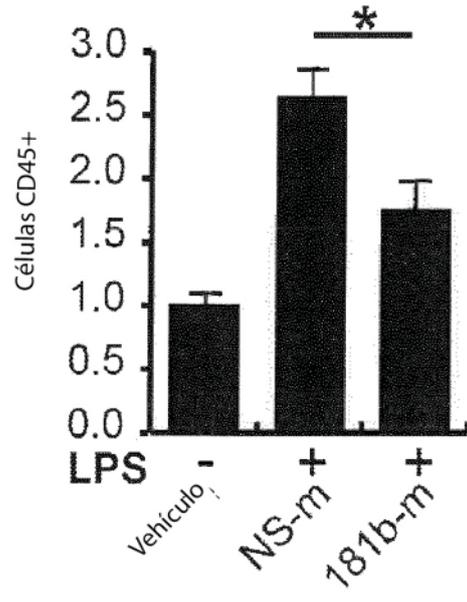


FIG. 10C

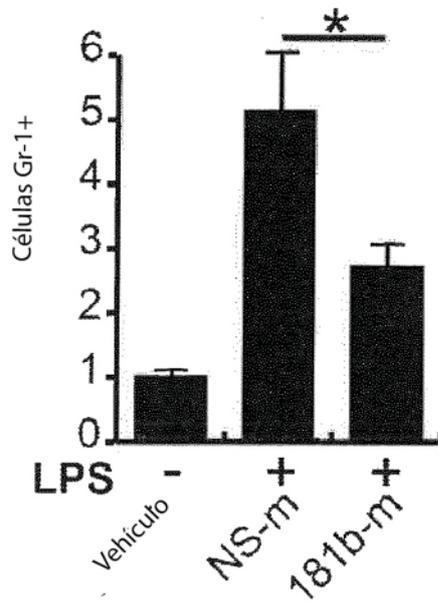


FIG. 10D

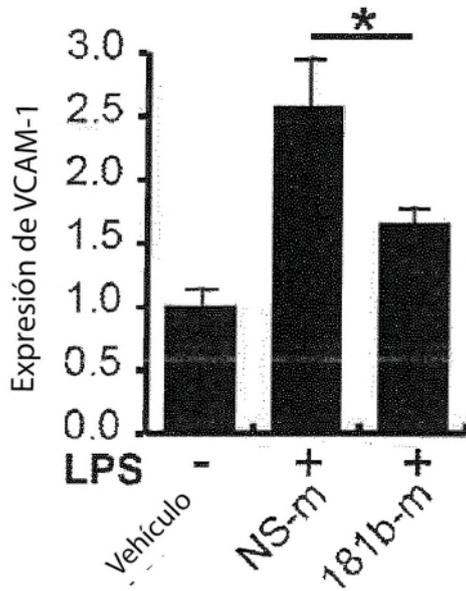


FIG. 10E

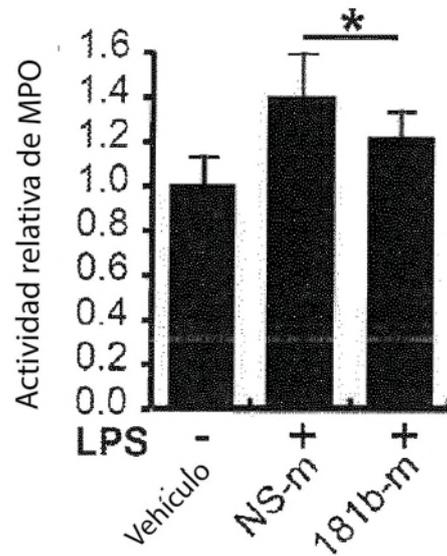


FIG. 10F

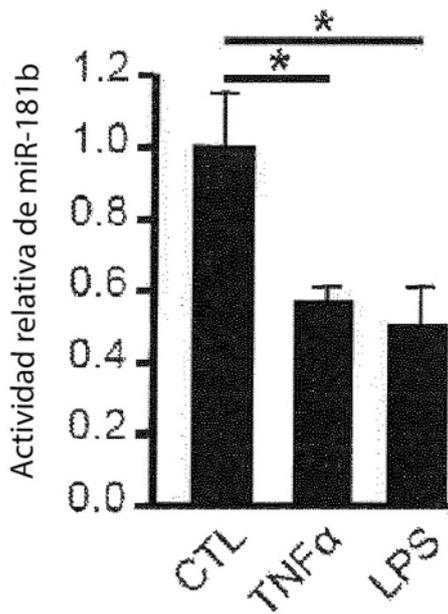


FIG. 11A

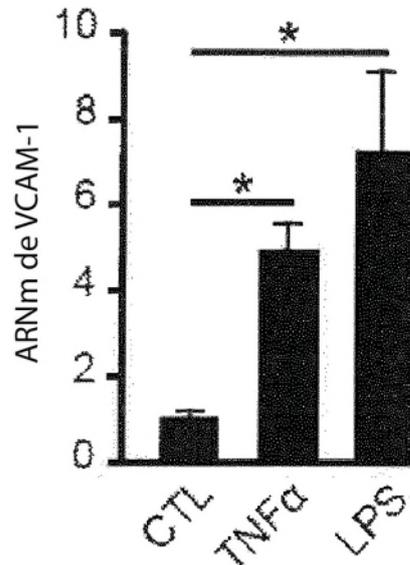


FIG. 11B

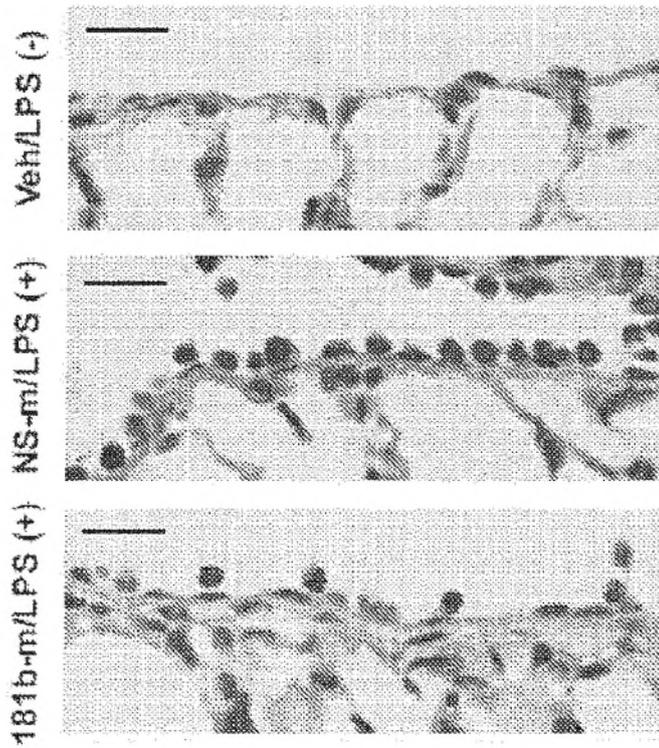


FIG. 11C

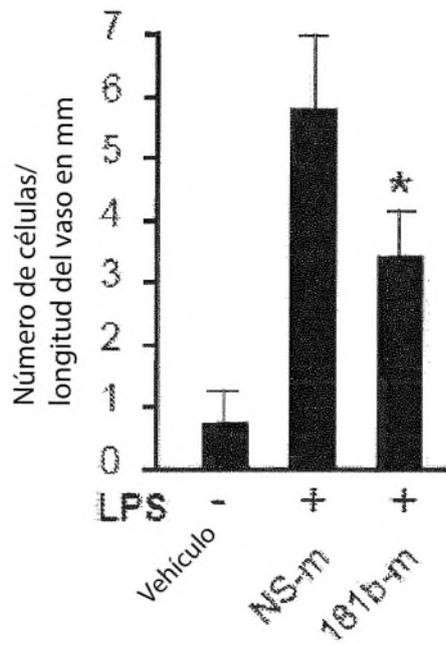


FIG. 11D