

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 561**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2014 PCT/EP2014/073115**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15063081**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2014 E 14793065 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3063276**

54 Título: **MicroARN que modulan el efecto de la señalización de glucocorticoides**

30 Prioridad:

29.10.2013 EP 13190740

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2021

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM,
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (50.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE y
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BERRIEL DIAZ, MAURICIO;
DE GUIA, ROLDAN y
HERZIG, STEPHAN**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 812 561 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

MicroARN que modulan el efecto de la señalización de glucocorticoides

5 La presente invención se define por el conjunto de reivindicaciones adjuntas y describe microARN (miR) involucrados en la regulación del metabolismo de los lípidos y la glucosa. Se encontraron varias moléculas de miR conservadas como dianas directas del eje de señalización de hormonas glucocorticoides/receptor de glucocorticoides. Por lo tanto, la presente invención se refiere a inhibidores de miR-379, tales como antimir y bloqueadores de miR, así como también a moléculas de miR aisladas o construcciones de expresión de miR de miR-379 para su uso en el tratamiento o prevención de trastornos metabólicos causados por la pérdida de la regulación de la señalización de glucocorticoides, tales como la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico, la obesidad y/o la diabetes tipo II.

Descripción

15 El síndrome metabólico (una constelación de trastornos metabólicos que son el resultado de, o están asociados a, un trastorno primario de resistencia a la insulina) se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólicos que incluyen obesidad abdominal, niveles elevados de triglicéridos, disminución de los niveles de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL), presión arterial alta y glucosa en sangre en ayunas alterada (una medida de la disminución de la sensibilidad a la insulina y el incremento del riesgo de desarrollar diabetes). Los pacientes que padecen el síndrome metabólico tienen un mayor riesgo de enfermedad coronaria y otras afecciones ateroscleróticas, tales como accidente cerebrovascular y enfermedad vascular periférica y diabetes tipo 2. Recientemente, el número de pacientes que padecen el síndrome metabólico aumentó particularmente en países desarrollados como Estados Unidos y Europa.

25 La patogénesis del síndrome metabólico es multifactorial y poligénica; se ha atribuido a una larga lista de parámetros genéticos y de estilo de vida que finalmente conducen a los trastornos metabólicos descritos anteriormente. Estos incluyen un estilo de vida sedentario, falta de ejercicio físico, consumo excesivo de grasa en la dieta y su composición, así como también varios genes que afectan el metabolismo de la glucosa y las lipoproteínas. Varios estudios de heredabilidad indicaron un papel importante de la susceptibilidad genética para el síndrome metabólico, aunque las asociaciones fueron bastante débiles y la replicación de los resultados ha sido deficiente. Además, los datos recientes indican un efecto modulador de la interacción genes-nutrientes sobre el riesgo de aparición del síndrome metabólico y las intervenciones dietéticas terapéuticas.

35 El eje endocrino hipotálamo-pituitaria-suprarrenal (HPA) es un circuito de estrés fisiológico crítico para mantener la homeostasis del cuerpo durante diversas situaciones, tales como trauma, ejercicio o privación de nutrientes (Rose y otros, 2010). En el control metabólico, la señalización de GC actúa como un sistema de contrarregulación principal contra la acción de la insulina, y una actividad de GC elevada de manera aberrante está estrechamente vinculada a los componentes principales del síndrome metabólico, que incluyen la obesidad, la resistencia a la insulina, la hiperglucemia y la dislipidemia sistémica. De hecho, se ha encontrado que los niveles de GC están elevados en pacientes resistentes a la insulina y están fuertemente asociados con un fenotipo hiperglucémico y de hígado graso, mediado a través del receptor de glucocorticoides (RG), un miembro de la familia de receptores nucleares tipo factores de transcripción (Opherky y otros, 2004) (Lemke y otros, 2008). En congruencia, la obesidad se caracteriza por una acción local de GC incrementada (Reynolds y otros, 2001, y estados de deficiencia o exceso de GC endógenos o exógenos, por ejemplo, la enfermedad de Addison, el síndrome de Cushing o la terapia con GC, respectivamente, se caracterizan por perturbaciones graves en el metabolismo energético sistémico que imita de cerca aspectos del síndrome metabólico (Rose, 2013).

50 Recientemente, una clase de ARN no codificantes pequeños (microARN) se ha convertido en una capa crítica pero aún en gran parte inexplorada del control metabólico. Los microARN (miARN) son una clase de ARN no codificantes pequeños (por ejemplo, 18-24 nucleótidos) que existen en una variedad de organismos, incluidos los mamíferos, y se conservan en la evolución. Los miARN se procesan a partir de precursores de horquilla de aproximadamente 70 nucleótidos que se derivan de transcritos primarios a través de la escisión secuencial por las enzimas RNasa III Drosha y Dicer. Muchos microARN pueden codificarse en regiones intergénicas, alojarse dentro de intrones de pre-ARNm o dentro de genes de ARN no codificantes. Muchos miARN también tienden a agruparse y transcribirse como policistrones y, a menudo, tienen patrones de expresión temporal y espacial similares. Se ha descubierto que los miR desempeñan funciones en una variedad de procesos biológicos, incluidos el tiempo de desarrollo, la diferenciación, la apoptosis, la proliferación celular, el desarrollo de órganos y el metabolismo. De hecho, se ha descubierto que miARN individuales regulan diversos aspectos de la homeostasis energética, incluida la secreción de insulina por células beta pancreáticas, el almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo y el manejo del colesterol y los lípidos por el hígado (Rottiers y Naar, 2012). Sin embargo, hasta la fecha no se han identificado dianas de miARN del eje GC/RG en el control metabólico.

65 El documento WO 2012/145374 A1 describe inhibidores de microARN para su uso en el tratamiento de trastornos metabólicos.

DIONYSIOS V. CHARTOUMPEKIS Y OTROS (PLOS ONE, (20120404), vol. 7, no. 4, doi: 10.1371/journal.pone.0034872) describen varios microARN que se regulan de manera diferencial en el tejido adiposo después de una dieta alta en grasas a largo plazo en ratones.

5 En vista de la técnica antecedente anteriormente descrita, el objetivo de la presente invención es proporcionar medios novedosos para tratar o prevenir trastornos metabólicos asociados con el eje de señalización de glucocorticoides.

10 El problema anterior fue resuelto por los inventores que desarrollaron un conjunto de miR diana que están directamente involucrados en la señalización de glucocorticoides (GC). Los inventores proporcionan en el presente documento miR regulados positivamente y negativamente en respuesta a la deficiencia del receptor de glucocorticoides en un modelo de ratón. Los inventores identificaron la inducción hepática del grupo conservado de micro (mi) ARN 379-410 como un componente molecular clave de la disfunción metabólica impulsada por GC en la obesidad y la diabetes ("diabesidad"). El silenciamiento de miARN379 específico de hepatocitos condujo a una reducción significativa de los niveles circulantes de triglicéridos asociados a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en ratones de tipo salvaje, mientras que la sobreexpresión de miARN379 a su vez desencadenó hipertrigliceridemia en animales sanos. Los efectos de miARN379 fueron mediados por el silenciamiento postranscripcional de los receptores clave en la reabsorción hepática de TG. Como la deficiencia hepática en miARN379 anuló la hipertrigliceridemia en diabéticos preferentemente, el grupo miARN379-410 representa una diana terapéutica atractiva en patologías dependientes de GC, incluida la dislipidemia relacionada con la diabesidad.

20 La presente invención se define por el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

25 La descripción proporciona dos conjuntos de miR que se indican en el presente documento para su uso en la medicina. Por lo tanto, se indica que la alteración de la función y/o expresión de un miR que se identifica en el presente documento como regulado negativamente en un contexto deficiente en glucocorticoides es útil en el tratamiento de un trastorno asociado con una mayor actividad del eje de señalización de glucocorticoides (exceso de glucocorticoides). Por otro lado, se indica que aumentar la función y/o la expresión de estos miR es beneficioso en un escenario médico caracterizado por una señalización de glucocorticoides alterada (déficit de glucocorticoides). Los miR comprendidos en este primer conjunto son miR-331-5p, miR-378*, miR-210, miR-152, miR-676*, miR-187, miR-1981, miR-203, miR-337-5p, miR-221, miR-222, miR-31*, miR-29b, miR-676, miR-34a, miR-383, miR-379, miR-301a, miR-1274a, miR-134, miR-409-5p, miR-431, miR-382, miR-127 y miR-54, así como también los miR del grupo miR-379-410 (ver más adelante).

35 El segundo grupo de miR identificado en el contexto de la presente descripción comprende miR que están regulados positivamente en un contexto deficiente en glucocorticoides. Por lo tanto, se indica que la alteración de la función y/o expresión de dicho miR que se identifica en el presente documento como regulado positivamente en un contexto deficiente en glucocorticoides es útil en el tratamiento de un trastorno caracterizado por una señalización de glucocorticoides alterada. Por otro lado, se indica que aumentar la función y/o la expresión de estos miR es beneficioso en un escenario médico asociado con una mayor actividad del eje de señalización de glucocorticoides. Los miR comprendidos en este segundo grupo son miR-719, miR-483, miR-669j, miR-146a, miR-1948, miR-342-3p, miR-24-2*, miR-132, miR-182, miR-677 y miR-18a.

45 Por lo tanto, en un primer aspecto de la presente invención, el objetivo anterior se resuelve proporcionando un inhibidor de un microARN (miR), o de un sitio diana de un miR, en donde el miR es miR-379, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en resistencia a la insulina, hiperglucemia, dislipidemia sistémica y el síndrome de Cushing.

50 "MicroARN" significa un ARN no codificante de entre 18 y 25 nucleobases de longitud, que es el producto de la escisión de un pre-miARN por la enzima Dicer. Se encuentran ejemplos de miARN maduros en la base de datos de miARN conocida como miRBase (<http://microma.sanger.ac.uk/>). En ciertas modalidades, microARN se abrevia como "miARN" o "miR". En el contexto de la presente invención, los miR descritos se refieren a mamíferos, tales como el ratón, específicamente miR humanos.

55 "Pre-miARN" o "pre-miR" significa un ARN no codificante que tiene una estructura de horquilla, que es el producto de la escisión de un pri-miR por la ribonucleasa específica de ARN bicatenario conocida como Drosha.

60 Se entenderá que el término "inhibidor de un miR" se refiere a cualquier compuesto adecuado para alterar la función y/o expresión de un miR dado. En modalidades preferidas de la invención, el término "inhibidor de un miR" se referirá a moléculas de ácido nucleico o compuestos oligonucleotídicos que inhiben la función y/o la expresión de un miR. Dichas moléculas de ácido nucleico o compuestos oligonucleotídicos se caracterizan preferentemente por comprender una secuencia que es complementaria a la secuencia del miR, las llamadas moléculas antisentido. Las moléculas antisentido comprenden preferentemente una secuencia complementaria a una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 1 o 2. Con la máxima preferencia, dicha molécula antisentido tiene la secuencia de SEQ ID NO: 13.

65

El término "molécula de miR aislada" se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia idéntica - al menos en un grado suficiente - a un miR descrito en el presente documento. La molécula de miR aislada imita la función biológica del miR respectivo.

- 5 El término "antimiR" significa un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleobases complementaria a un microARN. En ciertas modalidades, un antimiR es un oligonucleótido modificado. El término "bloqueador de miR" significa un oligonucleótido que se une a y bloquea el sitio diana del miR en el ARNm diana respectivo.

10 Los inhibidores de un miR en el contexto de esta invención son preferentemente ácidos nucleicos inhibidores dirigidos al miR descrito en el presente documento. Los ácidos nucleicos inhibidores útiles en los presentes métodos y composiciones incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (SGE), compuestos de ARNip, compuestos de interferencia por ARN (iARN) monocatenarios o bicatenarios tales como compuestos de ARNip, bases modificadas/ácidos nucleicos bloqueados (LNA), antagonistas de miR, ácidos nucleicos peptídicos (ANP) y otros compuestos oligoméricos o miméticos de oligonucleótidos que se hibridan al menos a una
15 porción del ácido nucleico diana y modulan su función. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos inhibidores incluyen ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia pequeño (ARNip); un micro ARN interferente (miARN); un ARN pequeño temporal (ARNpt); o un ARN en horquilla corto (ARNhc); activación de genes inducidos por ARN pequeños (ARNa); ARN activadores pequeños (ARNap) o combinaciones de los mismos. La
20 secuencia antisentido puede ser una secuencia antisentido bloqueadora de miR capaz de unirse a un sitio de unión del microARN en un ARN diana.

25 En algunas modalidades, los ácidos nucleicos inhibidores son de 10 a 50, de 13 a 50 o de 13 a 30 nucleótidos de longitud. Un experto en la técnica apreciará que esto incorpora 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, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud o cualquier rango dentro del mismo. En algunas modalidades, los oligonucleótidos son de 15 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, los compuestos antisentido u oligonucleotídicos tienen una longitud de 12 o 13 a 30 nucleótidos. Un experto en la técnica apreciará que esto incorpora ácidos nucleicos inhibidores que tienen porciones antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,
30 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud, o cualquier rango dentro de los mismos.

35 En modalidades preferidas de la invención, dicha enfermedad a tratar y/o prevenir con el uso de las moléculas de la invención es una patología dependiente de la señalización de glucocorticoides, tal como la disfunción metabólica impulsada por hormonas glucocorticoides, y la enfermedad se selecciona de resistencia a la insulina, hiperglucemia, dislipidemia sistémica y síndrome de Cushing.

40 "Disfunción metabólica" significa una afección caracterizada por una alteración o perturbación en uno o más procesos metabólicos en el cuerpo. Los trastornos metabólicos incluyen, pero no se limitan a, hiperglucemia, prediabetes, diabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, obesidad, dislipidemia diabética, síndrome metabólico, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. "Diabetes" o "diabetes mellitus" se refiere a una enfermedad en la cual el cuerpo no produce o usa la insulina adecuadamente, lo que resulta en niveles anormalmente altos de glucosa en la sangre. En ciertas modalidades, la diabetes es diabetes tipo 1. En ciertas modalidades, la diabetes es diabetes tipo 2.

45 "Resistencia a la insulina" significa una afección en la cual las cantidades normales de insulina son inadecuadas para producir una respuesta normal a la insulina de las células adiposas, musculares y hepáticas. La resistencia a la insulina en las células adiposas da como resultado la hidrólisis de los triglicéridos almacenados, lo que eleva los ácidos grasos libres en la sangre. La resistencia a la insulina en el músculo reduce la absorción de glucosa de la sangre por las células musculares. La resistencia a la insulina en el hígado reduce el almacenamiento de glucosa y provoca incapacidad de suprimir la producción de glucosa. Los ácidos grasos libres elevados, la absorción reducida de glucosa
50 y la producción elevada de glucosa contribuyen a niveles elevados de glucosa en sangre. Los altos niveles plasmáticos de insulina y glucosa debido a la resistencia a la insulina a menudo conducen al síndrome metabólico y a la diabetes tipo 2.

55 "Diabetes tipo 1" significa diabetes caracterizada por la pérdida de las células beta productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas que conduce a una deficiencia de insulina (también conocida como diabetes mellitus dependiente de insulina o DMDI). La diabetes tipo I puede afectar a niños o adultos, pero típicamente aparece entre las edades de 10 y 16 años.

60 "Diabetes tipo 2" significa diabetes caracterizada por la resistencia a la insulina y deficiencia relativa de insulina (también conocida como diabetes mellitus tipo 2, y anteriormente llamada diabetes mellitus tipo 2, diabetes no insulino dependiente (DMNID), diabetes relacionada con la obesidad o diabetes de aparición en edad adulta).

65 "Obesidad" significa una cantidad excesivamente alta de grasa corporal o tejido adiposo en relación con la masa corporal magra. La cantidad de grasa corporal (o adiposidad) incluye tanto la distribución de grasa en todo el cuerpo como el tamaño de los depósitos de tejido adiposo. La distribución de grasa corporal se puede estimar mediante medidas de pliegue cutáneo, relaciones de circunferencia cintura-cadera o técnicas como el ultrasonido, la tomografía

computarizada o la resonancia magnética. De acuerdo con el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, los individuos con un índice de masa corporal (IMC) de 30 o más se consideran obesos.

5 "Dislipidemia diabética" o "diabetes tipo 2 con dislipidemia" significa una afección caracterizada por diabetes tipo 2, HDL-C reducido, triglicéridos séricos elevados y partículas LDL pequeñas y densas elevadas.

10 "Síndrome metabólico" significa una afección caracterizada por una agrupación de factores de riesgo de origen metabólico lipídicos y no lipídicos. En ciertas modalidades, el síndrome metabólico se identifica por la presencia de cualquiera de los 3 factores siguientes: circunferencia de la cintura mayor de 102 cm en hombres o mayor de 88 cm en mujeres; triglicéridos séricos de al menos 150 mg/dL; HDL-C menor de 40 mg/dL en hombres o menos de 50 mg/dL en mujeres; presión arterial de al menos 130/85 mmHg; y glucosa en ayunas de al menos 110 mg/dL. Estos determinantes pueden medirse fácilmente en la práctica clínica (JAMA, 2001, 285: 2486-2497).

15 "Efecto secundario" significa una respuesta fisiológica, atribuible a un tratamiento, distinta a los efectos deseados. En ciertas modalidades, los efectos secundarios incluyen, sin limitación, reacciones en el sitio de inyección, anomalías en la prueba de función hepática, anomalías de función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías del sistema nervioso central y miopatías. Dichos efectos secundarios pueden detectarse directa o indirectamente. Por ejemplo, el aumento de los niveles de aminotransferasa en suero puede indicar toxicidad hepática o anomalía de la función hepática. Por ejemplo, el aumento de la bilirrubina puede indicar toxicidad hepática o anomalía de la función hepática.

20 "Efectos secundarios o efectos adversos del tratamiento con glucocorticoides o su exceso" en el contexto de la presente invención se refiere, entre otros, a la hiperglucemia debida al aumento de la gluconeogénesis, la resistencia a la insulina y la tolerancia alterada a la glucosa, el aumento de peso debido al aumento de la deposición de grasa visceral y troncal (obesidad central) y estimulación del apetito.

30 El término "exceso de glucocorticoides" se refiere a pacientes afectados por una afección asociada con exposición crónica a niveles de glucocorticoides superiores a lo normal. Como resultado, estos pacientes pueden caracterizarse por tener altos niveles de glucocorticoides en la sangre. Los ejemplos incluyen la secreción excesiva de hormonas adrenocorticales tales como el cortisol en la enfermedad de Cushing o la exposición crónica a glucocorticoides tales como la dexametasona o la prednisona que se usan como agentes antiinflamatorios en muchos escenarios clínicos, tales como los trasplantes renales.

35 **Tabla 1: secuencias de miR murinos y humanos**

MicroARN	Secuencia	Número de acceso de miRBase	SEQ ID NO:
mmu-miR-379-5p	UGGUAGACUAUGGAACGUAGG	MIMAT0000743	1
hsa-miR-379-5p	UGGUAGACUAUGGAACGUAGG	MIMAT0000733	2
mmu-miR-541-5p	AAGGGAUUCUGAUGUUGGUCACACU	MIMAT0003170	3
hsa-miR-541-5p	AAAGGAUUCUGCUGCGGUCCACU	MIMAT0004919	4
mmu-miR-127-3p	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	MIMAT0000139	5
hsa-miR-127-3p	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	MIMAT0000446	6
mmu-miR-134-5p	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG	MIMAT0000146	7
hsa-miR-134	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG	MIMAT0000447	8
mmu-miR-337-5p	GAACGGCGUCAUGCAGGAGUU	MIMAT0004644	9
hsa-miR-337-5p	GAACGGCUUCAUCAGGAGUU	MIMAT0004695	10
mmu-miR-382-5p	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG	MIMAT0000747	11
hsa-miR-382	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG	MIMAT0000737	12

50 Preferentemente, los diversos aspectos y las modalidades de la presente descripción se relacionan con un miR que comprende una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 1 o 2, con la máxima preferencia de acuerdo con una secuencia de SEQ ID NO: 2, así como también a análogos, derivados u homólogos de los mismos.

55 Cuando se hace referencia a una secuencia de un miR específico en el contexto de la presente invención, se comprenderán tanto la secuencia humana como la de ratón de dicho miR. En algunas modalidades, se prefieren las secuencias de miR humanas. El experto en la técnica conoce las secuencias homólogas de un miR dado, específicamente se conocen las secuencias humanas y de ratón correspondientes, que están bien conservadas.

60 El término "grupo miR-379-410", como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a un grupo de miR que consiste en miR-134, miR-136, miR-154, miR-300-3p, miR-300-5p, miR-323, miR-329, miR-369-3p, miR-369-5p, miR-376a, miR-376a*, miR-376b-3p, miR-376b-5p, miR-376c, miR-377, miR-379, miR-379*, miR-382, miR-382*, miR-409-5p, miR-410, miR-411, miR-434, miR-485, miR-487b, miR-494, miR-495, miR-539, miR-541, miR-543* y miR-758. Por lo tanto, el término anterior puede referirse a cualquiera de los miR mencionados anteriormente comprendidos en el grupo miR-379-410.

En el presente documento se describen secuencias que hibridan en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de miR-379. El término "hibridación en condiciones rigurosas" se usa en el presente documento como en Sambrook y otros (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.04). Una hibridación rigurosa de acuerdo con la invención está presente preferentemente cuando se observa una señal de hibridación positiva después de lavar durante 1 hora con \times SSC y SDS al 0,1 % a 50 °C, preferentemente a 55 °C, con mayor preferencia a 62 °C y con la máxima preferencia a 68 °C y con mayor preferencia durante 1 hora con SSC 0,2 \times y SDS (dodecilsulfato de sodio) al 0,1 % a 50 °C, preferentemente a 55 °C, con mayor preferencia a 62 °C y con la máxima preferencia a 68 °C.

En algunas modalidades, el ácido nucleico inhibidor comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, con la máxima preferencia un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-fluoro. En otras modalidades preferidas, las modificaciones de ARN incluyen modificaciones de 2'-fluoro, 2'-amino y 2' O-metilo en la ribosa de pirimidinas, residuos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Dichas modificaciones se incorporan habitualmente a los oligonucleótidos y se ha demostrado que estos oligonucleótidos tienen una Tm más alta (es decir, una mayor afinidad de unión a su diana) que; 2'-desoxi oligonucleótidos contra una diana dada.

Se prefiere para algunas modalidades que al menos una modificación química de la molécula de ácido nucleico u oligonucleótido (la molécula antisentido tal como un antimir o bloqueador de miR) se seleccione del grupo de análogos de ácido nucleico que consiste en ADN fosforotioato (PS), ARN 2'-O-metilo (OMe), ARN 2'-O-metoxi-etilo (MOE), ácido nucleico peptídico (ANP), N3'-P5' fosforoamidato (NP), ácido nucleico 2'-fluoro-arabino (FANA), ácido nucleico bloqueado (LNA), morfolino fosforoamidato (FM), ácido nucleico de ciclohexeno (ACH) o triciclo-ADN (tc-ADN).

En una modalidad preferida particularmente, se proporciona una molécula de ácido nucleico inhibidora, que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 13 (GTTCCATAGTCTACC), preferentemente que se proporciona como ANP.

Otros aspectos de la presente descripción se refieren a moléculas de miR, o medios para aumentar la expresión o aumentar la actividad de dichas moléculas de miR. Las moléculas de miR para su uso de acuerdo con la presente invención son preferentemente moléculas de ácido nucleico aisladas que tienen una secuencia al menos 80 % o más idéntica a las secuencias de miR-379.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de miR-379 aislada para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Addison.

En ciertas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico de la descripción es completamente complementaria a la secuencia de miR-379 como se enumera en el presente documento, o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, una molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleobases que tiene un error de apareamiento con respecto a la secuencia de nucleobases del miR-379 maduro, o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, una molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleobases que tiene dos errores de apareamiento con respecto a la secuencia de nucleobases del miR-379, o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, una molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleobases que no tiene más de dos errores de apareamiento con respecto a la secuencia de nucleobases del miR-379 maduro, o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, las nucleobases con error de apareamiento son contiguas. En ciertas modalidades, las nucleobases con error de apareamiento no son contiguas.

En el contexto de la presente descripción, cualquier molécula de ácido nucleico proporcionada que comprenda una secuencia que sea complementaria a la secuencia de miR-379 usualmente es para alterar la función y/o expresión del miR respectivo, trabajando, así como una molécula antisentido. Por otro lado, las moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia idéntica a la secuencia de miR-379 se usan para aumentar dicha función y/o expresión del miR. Otro aspecto de la invención se refiere a una construcción genética que comprende una secuencia expresable de miR-379 como se mencionó anteriormente, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad. La enfermedad se selecciona de una enfermedad como se mencionó anteriormente, y se selecciona dependiendo de si el miR respectivo está regulado positivamente o negativamente en respuesta a la deficiencia del receptor de glucocorticoides.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método in vitro para alterar la actividad glucocorticoide en una célula, el método comprende las etapas de:

- a. Proporcionar una célula;
- b. Para disminuir la actividad glucocorticoide en dicha célula: inhibir la actividad o expresión de miR-379; o
- c. Para aumentar la actividad glucocorticoide en dicha célula: aumentar la actividad o expresión de miR-379.

De acuerdo con la presente descripción en una modalidad, dicho método es para alterar la absorción de lípidos de una célula, en donde la absorción de lípidos disminuye cuando disminuye la actividad glucocorticoide y *viceversa*.

Las modalidades preferidas de la invención proporcionan el método anterior, donde la actividad de un miR-379 se inhibe mediante la introducción en dicha célula de una molécula antisentido (antimiR) dirigida a dicho miR o un bloqueador de miR dirigido al sitio diana de dicho miR; y/o en donde la actividad de dicho miR aumenta al introducir en dicha célula una construcción de expresión que comprende una secuencia expresable de dicho miR.

Dicha célula del método anterior en las modalidades preferidas es una célula de mamífero, con la máxima preferencia una célula humana. Preferentemente, dicha célula es una célula hepática o una célula adiposa, con la máxima preferencia dicha célula es un hepatocito primario. En algunas modalidades, dicha célula no es una célula madre embrionaria humana.

Además, la descripción proporciona un vehículo para el suministro de un inhibidor de miR-379, o un miR-379 aislado, o una construcción genética que comprende una secuencia expresable del miR-379 aislado. El vehículo es preferentemente para asegurar la absorción del compuesto de la descripción en el sitio diana previsto en un sujeto que requiere el tratamiento con dicho compuesto. Los vehículos de suministro ilustrativos para un agente oligonucleotídico presentado en el presente documento incluyen vehículos que contienen lípidos (por ejemplo, lípidos catiónicos) (por ejemplo, liposomas), vehículos que contienen virus (por ejemplo, vectores), vehículos que contienen polímeros (por ejemplo, polímeros o dendrímeros biodegradables) y vehículos que contienen péptidos (por ejemplo, un péptido de penetración), exosomas y minicélulas intactas derivadas de bacterias. En un ejemplo preferido, el vehículo de suministro incluye más de un componente. Por ejemplo, puede incluir uno o más restos lipídicos, uno o más péptidos, uno o más polímeros, uno o más vectores virales, o una combinación de los mismos. Las modalidades preferidas se refieren a un vehículo de suministro que es un complejo de asociación tal como un liposoma. Un liposoma generalmente incluye una pluralidad de componentes tales como uno o más de un lípido catiónico (por ejemplo, un lípido aminado), un resto de orientación, un lípido fusogénico, un lípido PEGilado. En algunas modalidades, el lípido-PEG es un lípido-PEG dirigido. Por ejemplo, un liposoma puede incluir un ácido nucleico y un aminolípido y un lípido PEGilado. En algunas modalidades, el lípido-PEG es un lípido-PEG dirigido. En algunas modalidades, la preparación también incluye un resto estructural tal como el colesterol. El más preferido en el contexto de la presente invención es un vehículo de suministro viral, en particular un virus dirigido específicamente a las células adiposas y/o hepáticas.

El suministro se realiza preferentemente mediante un vector viral. El vector viral puede ser un retrovirus, tal como un lentivirus o un adenovirus. Por lo tanto, la descripción proporciona un vector viral, que comprende un inhibidor de miR-379 o un miR-379 aislado. Estas secuencias pueden insertarse en una región no traducida de un gen, siendo el gen parte de una construcción o casete que luego se suministra mediante el vector. Cuando se transduce, una célula huésped expresará la secuencia de la invención y, por lo tanto, silenciará o expresará el miR-379. El vector es preferentemente la cápside viral y no comprende ningún polinucleótido viral o de otro tipo, que no sea el de la presente construcción.

La invención en otro aspecto proporciona una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones adjuntas, que comprende un inhibidor (antimiR o bloqueador de miR), una molécula de miR aislada, una construcción genética o un vehículo, tal como un vector viral, junto con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En el presente documento se proporciona, en congruencia con la presente descripción, una composición farmacéutica, que comprende moléculas de ácido nucleico (oligonucleótidos) de la descripción. En ciertas modalidades, tales composiciones farmacéuticas se usan para el tratamiento de trastornos dependientes de la señalización de glucocorticoides, en particular el exceso de glucocorticoides, tales como trastornos metabólicos y afecciones asociadas. En ciertas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende un compuesto que comprende un oligonucleótido que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobases complementaria a miR-379, o un precursor del mismo. En ciertas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende un compuesto que consiste en un oligonucleótido que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobases complementaria a miR-379, o un precursor del mismo.

Las vías de administración adecuadas incluyen, pero no se limitan a, oral, rectal, transmucosal, intestinal, enteral, tópica, supositorios, por inhalación, intratecal, intraventricular, intraperitoneal, intranasal, intraocular, intratumoral y parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intramedular y subcutánea). En ciertas modalidades, los productos farmacéuticos intratecales se administran para conseguir exposiciones locales en lugar de sistémicas. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden inyectarse directamente en el área del efecto deseado (por ejemplo, en el hígado).

Los glucocorticoides pueden usarse en dosis bajas en la insuficiencia suprarrenal. En dosis mucho más altas, los glucocorticoides orales o inhalados se usan para suprimir diversos trastornos alérgicos, inflamatorios y autoinmunitarios. Los glucocorticoides inhalados son el tratamiento de segunda línea para el asma. También se administran como inmunosupresores posteriores al trasplante para prevenir el rechazo agudo del trasplante y la enfermedad de injerto contra huésped. El tratamiento con glucocorticoides o su exceso se asocia con varios efectos adversos que incluyen, entre otros, hiperglucemia debido a un aumento de la gluconeogénesis, resistencia a la insulina

y tolerancia alterada a la glucosa, aumento de peso debido al aumento de la deposición de grasa visceral y troncal (obesidad central) y estimulación del apetito.

La presente invención se describirá ahora aún más en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras y secuencias adjuntas, sin embargo, sin limitarse a las mismas. En las figuras y secuencias:

Figura 1: El grupo miR-379/410 es una diana aguas abajo de la señalización de glucocorticoides. (A) Mapa térmico que muestra la expresión relativa de miARN entre ratones de tipo salvaje (wt) y db/db (n=4); y entre ratones tratados con control negativo (CN) y virus adenoasociado recombinante (rAAV) con miARN específico de RG (n=4). La expresión más alta y más baja se muestra en rojo y verde, respectivamente. Los miARN comúnmente regulados en el grupo miR-379/410 se muestran en negrita. Los miARN regulados diferencialmente se encuentran a ≥ 2 veces, $p < 0,05$. (B) Niveles cuantitativos de PCR de miR-379 en hígados de ratones db/db, obesos de Nueva Zelanda (NZO) y controles correspondientes: wt y negro de Nueva Zelanda (NZB) (n ≥ 4). (C) Niveles cuantitativos de miR-379 en hígados de ratones db/db tratados con control o adenovirus con ARNhc específico de RG (n=5). (D) Niveles hepáticos de miR-379 según lo determinado por análisis RT-qPCR en ratones wt y ratones con desactivación génica del RG específico de hepatocitos (GR-AlfpCre) (n=4). (E) qPCR de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para la validación de las regiones de unión a RG (GBR) aguas arriba de la horquilla de miR-379: 1 (-11197 a -111268), 2 (-21021 a -21135) y 3 (-26761 a -26793). Tasa de incremento de la ocupación del sitio de unión a RG con relación al control negativo, anti-HA. (n=4). (F) Niveles de miR-379 en hígado humano tratado ex vivo con o sin RU486 1 μM y DEX 0,1 μM (n=4). Se usó snoRNA-202 para la normalización de los niveles de miARN. Los gráficos de barras muestran la media \pm SEM; prueba t o ANOVA (con prueba post-hoc): *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ o * $p < 0,05$.

Figura 2: El microARN-379 controla los niveles de triglicéridos de VLDL sistémicos. (A) Niveles de RT-qPCR y transferencia Northern de miR-379 en ratones tratados con ácido nucleico bloqueado (LNA) anti-379 o control aleatorizado (n=5 por grupo). (B) Niveles séricos de triglicéridos y colesterol después de 1 y 2 semanas de tratamiento con LNA de animales en (A). (C) Contenido de triglicéridos de eluatos de suero fraccionado por FPLC de animales en (A). (D) Transferencia Northern de miR-379 en ratones tratados con solución salina isotónica, virus adenoasociado recombinante (rAAV) de control negativo (CN) o rAAV para la sobreexpresión de miR-379 (n=4 por grupo). (E) Triglicéridos séricos de animales en (D). (F) Contenido de triglicéridos de eluatos de suero fraccionado por FPLC de animales en (D). Para A, B & E, los datos son media \pm SEM, prueba t o ANOVA (con prueba post-hoc): *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ o * $p < 0,05$.

Figura 3: El microARN-379 controla los niveles de triglicéridos sistémicos a través del receptor de lipoproteína estimulada por lipólisis (Lsr). (A) Sitio de unión conservado en vertebrados de miR-379 en la secuencia codificante del ARNm de Lsr según lo predicho por RNA22. Los niveles de proteína Flag-Lsr en respuesta a miR-379 imitan los transfectados en células Hek293. (B) Niveles de proteína de Lsr en hígados de animales tratados con LNA anti-379 o control aleatorizado (n=5 por grupo), los mismos animales que en la Figura (2A). (C) Niveles de proteína de Lsr en hígados de ratones de tipo salvaje tratados con dexametasona (1 mg/kg de BW) o solución salina isotónica durante 28 días. (D) Transferencia Western de extractos de hígado de ratones wt o LDLRKO tratados con adenovirus de control o que contienen ARNhc de LSR y con LNA anti-miR-379 o de control aleatorizado (n=7). (E) Niveles de triglicéridos en suero de los mismos animales que en E en condiciones de alimentación. (F) Niveles de proteína Flag-LSR en células Hek293 tratadas con imitadores de miR-379. Se usó el cel-miR-293b a 100 nM como el imitador de control. [-]: sin transfectar. (G - H), validación de la diana de miR-379 en LSR (G) y LDLR (H) mediante el uso de un ensayo de gen indicador de luciferasa dual. El sitio de unión de miARN (MBS) predicho por RNA22 y MiRTiF y la secuencia mutada (mut) correspondiente se clonaron en el vector psiCHECK™-2. Los gráficos de barras y líneas muestran la media \pm SEM; ANOVA (con prueba post-hoc): *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ o * $p < 0,05$.

Figura 4: La inhibición de miR-379 contrarresta la hipertrigliceridemia en ratones diabéticos obesos. (A) Niveles de triglicéridos en suero de ratones db/db tratados con LNA anti-379 o control aleatorizado (n=7 por grupo). (B), Evaluación del modelo homeostático para la resistencia a la insulina (HOMA-IR) de animales en (A). (C) Contenido de triglicéridos de eluatos de suero fraccionado por FPLC de animales en (A). (D), Niveles de proteína de Lsr en hígados de animales en (A). Para (A) y (B), los datos son medias \pm SEM, prueba t: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ o * $p < 0,05$. (E) Perfiles de triglicéridos de suero fraccionado por FPLC de ratones NZO tratados con anti-miR-379 o LNA de control aleatorizado (n=7). Se indica el pico de VLDL. (F) Niveles de proteína de LSR y LDLR en hígados de los mismos animales que en E. (G) Niveles de proteína de LSR y LDLR en hígados de ratones db/db tratados con una construcción de señuelo resistente (TuD) anti-miR-379 o de control aleatorizado suministrada mediante rAAV 28 días después de la inyección (n=8). (H) Perfiles de triglicéridos de suero fraccionado por FPLC de los mismos animales de G en condiciones de alimentación. Se indica el pico de VLDL. (I) Perfiles de triglicéridos de suero fraccionado por FPLC de ratones C57B1/6J alimentados con dieta baja en grasas (10 %) o alta en grasas (60 %) durante 12 semanas y tratados con construcción de señuelo resistente (TuD) anti-miR-379 o de control aleatorizado suministrada mediante rAAV. Los ratones se sacrificaron cuatro semanas después de la inyección del virus a las 18 semanas de edad. Se indica el pico de VLDL.

Figura 5: (A), niveles hepáticos de miR-379 en ratones de tipo salvaje tratados con control negativo (CN) y AAV con miARN específico de RG (n=4 por grupo). (B), Niveles hepáticos de miR-379 en ratones de tipo salvaje y con desactivación génica del RG específico de hepatocitos (n=4 por grupo). (C), Niveles cuantitativos de PCR de miR-379 en hepatocitos primarios tratados con dexametasona 1~mM o vehículo (EtOH al 2 % en PBS) durante 9 h. Los datos son media \pm SEM, prueba t o ANOVA (con prueba post-hoc): ***p<0,001, **p<0,01 o *p<0,05.

Figura 6: (A), niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) en ratones tratados con ácido nucleico bloqueado (LNA) anti-379 o control aleatorizado (n=5 por grupo). (B - D), glucógeno hepático, triglicérido y colesterol de animales en (A). (E), Contenido de colesterol de eluatos de suero fraccionado por FPLC de animales en (A). (F - G), glucosa en sangre en ayunas y HOMA-IR de animales en (A). (H), niveles séricos de ALT en ratones tratados con virus adenoasociado recombinante (rAAV) de control negativo (CN) o rAAV para la sobreexpresión de miR-379 (n=4 por grupo). (I - J), colesterol sérico y colesterol en eluatos de suero fraccionado por FPLC de animales en (H). Excepto para FPLC, los datos son media \pm SEM, prueba t o ANOVA (con prueba post-hoc): ***p<0,001, **p<0,01 o *p<0,05.

Figura 7: (A) Tasa de consumo de oxígeno (OCR) normalizada de células Hepa1-6 tratadas con una construcción de señuelo resistente anti-miR-379 o de control aleatorizado (n=8 por grupo). Datos generados con el analizador de flujo extracelular XF96 (Seahorse). (B) Actividad de lipasa de lipoproteínas de tejido adiposo blanco abdominal (LPL) en ratones tratados con ácido nucleico bloqueado (LNA) anti-379 o control aleatorizado (n=5 por grupo). (C) Liberación de VLDL hepática en ratones tratados con ácido nucleico bloqueado (LNA) anti-379 o control aleatorizado (n=5 por grupo). Los datos son media \pm SEM, prueba t o ANOVA (con prueba post-hoc): *p<0,05.

Figura 8: (A) Niveles de glucosa en sangre en ayunas de ratones db/db tratados con LNA anti-379 o control aleatorizado (n=7 por grupo). Los datos son media \pm SEM, prueba t: **p<0,01. (B - C) Colesterol sérico y colesterol en eluatos de suero fraccionado por FPLC de animales en (A). (D) Secciones de hígado teñidas con aceite rojo O y hematoxilina de animales representativos en (A).

Figura 9: Los niveles de miR-379 se correlacionan con los niveles séricos de cortisol y triglicéridos en humanos. (A) Niveles hepáticos de miR-379 en pacientes obesos (n=64) y controles sanos (n=10). (B - C) Niveles séricos de triglicéridos (B) y cortisol (C) en individuos obesos y controles sanos. Los gráficos de barras muestran la media \pm SEM; prueba t: ***p<0,001, **p<0,01 o *p<0,05. (D - E) Análisis de correlación de miR-379 hepático humano y cortisol (D) o triglicéridos (E) séricos (n=74). Se muestran los coeficientes de rango de Spearman y los valores de p. La población de muestra se estratificó en obesos diabéticos, obesos no diabéticos y controles en función de los efectos de interacción estadísticamente significativos de los grupos y los parámetros séricos en un modelo de regresión lineal múltiple.

Ejemplos

Ejemplo 1: miR relevantes en la disfunción metabólica

Para definir las redes de miARN dependientes de GC/RG con relevancia inmediata en la disfunción metabólica, los inventores realizaron inicialmente perfiles de expresión de miARN a gran escala en hígados de ratones de tipo salvaje y db/db diabéticos como modelo para la hiperglucocorticoidemia relacionada con la diabetes (Lemke y otros, 2008). Se encontró que un total de 36 miARN estaban regulados positivamente o negativamente más de 2 veces entre estos animales, validando de esta manera nuestro diseño experimental (Fig. 1A). A continuación, los inventores cruzaron este conjunto de datos con una segunda firma de miARN, como resultado del perfil de expresión diferencial entre ratones que carecen del RG específicamente en hepatocitos y compañeros de camada de control (Rose y otros, 2011). La comparación cruzada de datos reveló un conjunto de 10 miARN que mostraron una regulación negativa significativa en respuesta a la deficiencia de RG y su inducción simultánea en la diabetes (Fig. 1A), lo que indica que estos miARN representan mediadores confiables de la disfunción metabólica impulsada por GC/RG. Curiosamente, 6 de cada 10 miARN dirigidos a GC/RG se encuentran en el grupo de miARN 379-410 que se conserva entre todas las especies de mamíferos (Benetatos y otros, 2013; Luky otros, 2011), y reside en los cromosomas 12 y 14 de ratones y humanos respectivamente. De hecho, el análisis de expresión selectiva verificó la inducción de los 5 miembros del grupo en ratones db/db mediante PCR cuantitativa (datos no mostrados).

La inducción más sustancial de 4 veces del miARN379 en ratones diabéticos (Figura 1B) llevó a los inventores a investigar la importancia general de esta regulación en otros modelos de acción elevada de GC. Con este fin, se analizaron extractos de hígado de ratones negros de Nueva Zelanda (NZB) sanos en comparación con ratones obesos de Nueva Zelanda (NZO), estos últimos representan un modelo de obesidad multigénica (Leiter y Reifsnnyder, 2004). En congruencia con la hiperglucocorticoidemia en este modelo, se encontró que la expresión de miR-379 era significativamente elevada en comparación con los controles correspondientes (Fig. 1B), de esta manera se correlacionaba con los niveles circulantes de corticosterona en estos ratones (no mostrados), apoyando la hipótesis de que particularmente miR-379 es una salida clave de la vía endocrina de GC/RG en condiciones de disfunción metabólica. En apoyo a esta posibilidad, se encontró que los niveles de miR-379 disminuían constantemente en los

modelos de deficiencia de RG, incluida la deficiencia de RG inducida por miARN y la genética específica de hepatocitos (Fig. 1C, 1D).

5 De hecho, la inmunoprecipitación de cromatina mediante el uso de un anticuerpo específico de RG verificó experimentalmente el reclutamiento del receptor a un sitio de unión dentro del promotor de miR-379 (Fig. 1E). Un resultado similar se había informado previamente en los datos de secuenciación de Chip de RG depositados en la base de datos del genoma humano, lo que sugiere que el grupo miR-379/410 representa una diana transcripcional directa del RG.

10 Para verificar la importancia funcional de la unión al ADN del RG al locus de miR-379 *in vivo*, se examinaron ratones que albergan un RG mutante con dimerización defectuosa (GRdim) que altera la unión al ADN del receptor a los GRE completos. Los ratones de tipo salvaje tratados crónicamente con DEX exhibieron niveles hepáticos más altos de miR-379 en comparación con los controles, mientras que la alteración genética de la capacidad de unión al ADN del RG en ratones GRdim anuló completamente este efecto, validando de esta manera una función reguladora dependiente de la unión al ADN de la vía GC/RG para la expresión de miR-379 en el hígado. Cabe destacar que el tratamiento con DEX de hepatocitos primarios aislados de ratón y cortes de hígado humano (Figura 1F) condujo a la inducción de miR-379 independientemente de los niveles de glucosa en cultivo (datos no mostrados), lo que demuestra la autonomía celular de los efectos observados. El tratamiento conjunto con el antagonista de RG RU-486 abolió completamente los efectos de DEX confirmando de esta manera la especificidad por RG (Fig. 1F).

20 Ejemplo 2: El microARN-379 controla los niveles de triglicéridos de VLDL sistémicos

Hasta ahora, estos resultados identificaron al miARN379 como una diana directa de la señalización de GC/RG con expresión hepática aberrante en la diabetes, lo que llevó a los inventores a explorar a continuación la importancia funcional del miARN379 para la homeostasis energética hepática y sistémica. Con este fin, los inventores silenciaron eficientemente el miARN379, predominantemente en el hígado, mediante la tecnología antisentido de ácido nucleico bloqueado (LNA) en animales de tipo salvaje (Fig. 2A). Aunque el suministro de LNA específico para miARN379 no tuvo influencia en los marcadores de toxicidad hepática (Fig. 6A), los niveles de glucógeno hepático (Fig. 6B), TG hepáticos (Fig. 6C) y colesterol (Fig. 6D), la deficiencia de miARN379 redujo significativamente los niveles totales de TG séricos (Fig. 2B). El colesterol sérico total no se vio afectado en gran medida (Fig. 2B), lo que indica en general que el miARN379 hepático controla específicamente el metabolismo de TG circulantes.

35 De hecho, los estudios de fraccionamiento mediado por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) revelaron que el silenciamiento hepático del miARN379 alteró de manera robusta los niveles de TG asociados a VLDL, mientras dejaba intacta la carga de colesterol en las lipoproteínas (Fig. 2C, 6E). De acuerdo con el papel de los TG-VLDL elevados como el principal factor de riesgo de complicaciones cardiovasculares en el síndrome metabólico y su estrecha asociación con la resistencia a la insulina (Chahil y Ginsberg, 2006), la disminución de TG-VLDL en ratones tratados con LNA contra miARN379 no tuvo ningún efecto sobre los niveles de glucosa en sangre (Fig. 6F) pero mejoró la resistencia a la insulina (Fig. 6G).

40 Para determinar a continuación si la elevación de la expresión hepática del miARN379 fue suficiente para causar dislipidemia sistémica en un entorno más crónico, los inventores emplearon un nuevo sistema de suministro de virus adenoasociado (AAV) que permite la expresión de miARN específicamente en células parenquimatosas hepáticas, pero no en otros tipos de células hepáticas durante un período de varios meses (Kulozik y otros, 2011). Ocho semanas después del suministro de AAV, los ratones con sobreexpresión de miARN379 específico de hepatocitos (Fig. 2D) que no afectaron sus marcadores de daño hepático (Fig. 6H) mostraron niveles significativamente más altos de TG séricos asociados con la fracción VLDL (Fig. 2E, 2F) pero mantuvieron la homeostasis del colesterol normal (Fig. 6I, 6J).

50 Ejemplo 3: El microARN-379 controla los niveles de triglicéridos sistémicos a través del receptor de lipoproteínas estimulado por lipólisis (Lsr).

La especificidad observada del miARN379 para la regulación de los TG-VLDL séricos llevó a los inventores a explorar la base mecanicista de este efecto. El metabolismo de TG sistémicos está determinado por el equilibrio relativo de la absorción y liberación de lípidos hepáticos y periféricos, que se correlaciona con la formación de TG de novo (lipogénesis) y la β -oxidación de ácidos grasos (AG) en el hígado (Kersten y otros, 1999). A este respecto, el tratamiento con LNA específico para miARN379 de hepatocitos de ratón no tuvo influencia en la oxidación de AG según lo determinado por el análisis de flujo metabólico (Fig. 7A), y los niveles circulantes de cuerpos cetónicos totales como una medida de salida para la vía de oxidación de AG permanecieron inalterados entre ratones tratados con LNA contra miARN379 y con LNA de control inespecífico (datos no mostrados). Además, la actividad de la lipasa de lipoproteínas adiposa periférica no se vio afectada por la deficiencia de miARN379 (Fig. 7B), mientras que la liberación hepática de VLDL hepática se redujo ligeramente en comparación con los compañeros de camada de control (Fig. 7C). Estos datos sugirieron que el control de los TG-VLDL circulantes por miARN379 hepático no se confiere por alteraciones en las vías hepáticas y periféricas de síntesis y degradación de lípidos.

65 Por el contrario, el tamizaje bioinformático de genes diana de miARN reveló de forma predictiva que miARN379 se uniría a genes involucrados en la (re)absorción de lípidos hepáticos, lo que incluye principalmente los principales

transportadores de reabsorción de lípidos hepáticos, el receptor de lipoproteínas estimulado por lipólisis (LSR) y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (Fig. 3A). Anteriormente, tanto la expresión de LSR como de LDLR se ha visto gravemente comprometida en ratones db/db hipertriglicéridémicos, y la inactivación específica de hígado de LSR desencadenó la elevación de TG-VLDL en animales sanos de tipo salvaje al prevenir específicamente la reabsorción hepática de TG asociados a apolipoproteína B de la circulación (Narvekar y otros, 2009).

En línea con las predicciones *in silico* y un efecto silenciador directo del miARN379 sobre un transcrito de LSR (Fig. 3A), el silenciamiento del miARN379 mediado por LNA condujo a la regulación positiva de la expresión de proteínas hepáticas de LSR y LDLR en animales de tipo salvaje (Fig. 3B), y el tratamiento con DEX inhibió los niveles de proteínas LSR y LDLR en comparación con los controles (Fig. 3C), lo que sugiere en general que el miARN379 puede, al menos en parte, regular los TG-VLDL sistémicos a través de su impacto inhibitorio en la vía de LSR-LDLR.

Para abordar este problema directamente, los inventores realizaron experimentos de rescate genético en ratones de tipo salvaje previniendo primero la inducción de la expresión de la proteína LSR dependiente del LNA contra miARN379 a través de la inhibición simultánea de LSR mediada por ARNhc mediante la administración conjunta de LNA/adenovirus con ARNhc. 10 días después del suministro conjunto de LNA/adenovirus en la vena de la cola de los ratones, el silenciamiento del miARN379 desencadenó hipotriglicéridemia, mientras que la inhibición de LSR sola causó una elevación de los TG-VLDL circulantes como se describe en comparación con los compañeros de camada de control (Fig.2). Cabe destacar que ambos tratamientos no afectaron los parámetros de colesterol. Curiosamente, en ausencia de LSR hepático funcional, el silenciamiento del miARN379 todavía ejercía un efecto sobre los niveles de TG séricos totales y asociados a VLDL, lo que sugiere que LSR solo no explica el impacto de miARN379 en el metabolismo de TG sistémicos. De acuerdo con esta suposición, los niveles de proteína LDLR aumentaron significativamente con la desactivación génica doble de miARN379/LSR.

Para evaluar la posible función compensatoria del LDLR en ausencia de LSR, a continuación, se emplearon animales de tipo salvaje y con desactivación génica de LDLR (KO) en experimentos de coinyección de LNA/adenovirus con ARNhc de LSR para obtener una doble deficiencia funcional de LSR/LDLR en el hígado (Fig. 3D). Mientras que el silenciamiento de miR-379 redujo los TG séricos tanto en ratones de tipo salvaje como LDLRKO (Fig. 3E), el efecto del suministro de LNA contra miR-379 se anuló completamente en ratones con doble deficiencia de LDLR/LSR (Fig. 3E), demostrando en general que miR-379 determina los niveles de TG circulantes a través de un doble impacto en dos componentes del aclaramiento hepático de TG, es decir, LSR y LDLR. De acuerdo con esta noción, el tratamiento de células cultivadas con imitadores de miR-379 inhibió tanto la expresión de proteínas (Fig. 3F) como los genes indicadores de luciferasa que transportan secuencias diana de miR-379 en LSR y LDLR de tipo salvaje, mientras que dejaban los sitios diana mutados sin afectar (Fig. 3G, 3H), validando de esta manera la especificidad de los efectos observados.

Ejemplo 4: La inhibición de miR-379 contrarresta la hipertriglicéridemia en ratones diabéticos obesos.

Las estrategias antisentido dirigidas a miARN específicos han surgido como opciones terapéuticas atractivas para varias patologías humanas, incluidas las complicaciones metabólicas y las enfermedades virales, lo que recientemente llevó a los primeros ensayos clínicos en esta dirección (Stenvang y otros, 2012). Dada la búsqueda actual de modalidades terapéuticas eficientes y específicas para superar la hipertriglicéridemia como el principal factor de riesgo cardiovascular en pacientes con el síndrome metabólico (Rosenson y Underberg, 2013), fue un objetivo abordar el potencial terapéutico de miARN379 en la hiperlipidemia asociada a la diabetes.

Con este fin, los inventores silenciaron la expresión hepática de miARN379 mediante el suministro de LNA a ratones db/db de 12 semanas de edad con hiperglucocorticoidemia, hiperlipidemia e hiperglucemia completamente establecidas. 7 días después del suministro de LNA, la deficiencia de miARN379 hepático condujo a una marcada reducción de TG-VLDL séricos y mejoró los niveles de glucosa en sangre junto con un índice de resistencia a la insulina reducido (Fig. 4A, 8A, 4B, 4C). En línea con los resultados de los animales de tipo salvaje, el tratamiento con LNA contra miARN379 no tuvo un efecto importante sobre los niveles de colesterol circulante (Fig. 8B, 8C), verificando nuevamente la especificidad de los efectos observados para el brazo TG de la homeostasis de los lípidos sistémicos. De hecho, en congruencia con las propiedades de aclaramiento de ApoB TG de LSR y LDLR hepáticos, la deficiencia de miARN379 promovió la retención de TG en el hígado (Fig. 8D), y causó una inducción significativa de la expresión de proteínas LSR y RLDL en comparación con animales tratados con LNA de control (Fig. 4D).

Para corroborar estos hallazgos en un modelo independiente de obesidad multigénica, se trataron ratones obesos de Nueva Zelanda (NZO) con LNA específico para miR-379 o de control. En línea con los resultados de los estudios en db/db, el silenciamiento de miR-379 hepático redujo significativamente los niveles séricos de TG-VLDL con un impacto menor en el colesterol sérico (Fig. 4E) y aumentó la expresión hepática de proteínas tanto de LDLR como de LSR (Fig. 4F).

Para validar estos hallazgos mediante un sistema experimental independiente, se diseñó y empleó un nuevo enfoque de señuelo resistente específico para miR-379 (TuD-Anti-miR-379) en animales db/db. El suministro hepático mediado por AAV de TuD-Anti-miR-379 bajo el control de un promotor específico de hepatocitos indujo la expresión de proteínas LSR y LDLR en el hígado (Fig. 4G) y disminuyó sustancialmente los niveles séricos de TG-VLDL de ratones db/db de

14 semanas de edad (Fig. 4H), mientras que solo alteró débilmente los niveles séricos de colesterol (no mostrado). Es importante destacar que el suministro de TuD-Anti-miR-379 en animales de tipo salvaje alimentados con una dieta alta en grasas durante 12 semanas también redujo los niveles circulantes de TG-VLDL y, aunque menos pronunciado, de colesterol, como lo demuestra la FPLC (Fig. 4I), lo que indica que miR-379 también controla la homeostasis de TG sistémicos en condiciones de exceso de energía en la dieta.

Ejemplo 5: Los niveles hepáticos de miR-379 se correlacionan con cortisol y TG séricos en pacientes obesos humanos

Juntos, estos estudios demuestran que la vía de miR-379 inducible por GC/RG representa un punto de control crítico en la dislipidemia sistémica en la diabetes, y que la intervención selectiva de miR-379 en el hígado puede usarse como una medida terapéutica contra la hipertrigliceridemia dependiente de GC. Para evaluar finalmente la validez de esta suposición en humanos, se investigó la expresión hepática de miR-379 en una cohorte clínicamente bien definida de más de 70 individuos. De acuerdo con los hallazgos experimentales en animales, los niveles hepáticos de miR-379 fueron más bajos en individuos delgados en comparación con sujetos obesos (Fig. 9A), y se correlacionaron positivamente con los niveles séricos de cortisol y TG en esta cohorte de pacientes, así como también en las subcohortes de individuos obesos, respectivamente (Fig. 9B-E), lo que indica que el control dependiente de GC/RG de la vía de miR-379 representa un mecanismo (pato) fisiológico conservado en la homeostasis de los lípidos dependiente de la obesidad.

Materiales y métodos

Virus recombinantes

Para la inactivación a largo plazo del RG, se establecieron virus adenoasociados (AAV) que codifican el miARN específico de RG como se describió previamente (Rose AJ y otros, 2011). Se produjeron virus recombinantes en células 293T a través de la cotransfección triple del vector de la estructura viral recombinante con los plásmidos auxiliares. Los virus se purificaron mediante el uso del método de iodoxanol, se dializaron y se titularon mediante RT-qPCR.

Para la sobreexpresión específica en hígado del miR-379, se usó el mismo vector de estructura viral recombinante anterior. La secuencia genómica de mir-379 ± 100 pb se amplificó por PCR con cebadores que albergan sitios de restricción BglII y Sall. El producto de PCR se digirió luego con las enzimas de restricción apropiadas y se clonó en pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR ("BLOCK-iT™ PolII miR RNAi Expression Vector Kit" (Invitrogen, Darmstadt, DEU)). La construcción se evaluó en la línea celular Hepa1-6 y en los hepatocitos primarios junto con el control correspondiente antes de la subclonación en el vector AAV.

Los adenovirus que expresan oligonucleótidos específicos de Lsr o inespecíficos de control se clonaron como se describió anteriormente (Herzig S y otros, 2003; Narvekar P y otros, 2009). Los virus se purificaron mediante el uso del método de CsCl y se dializaron contra solución salina tamponada con fosfato que contiene 10 % de glicerol antes de la inyección en animales.

Diseño y síntesis de oligonucleótidos de LNA

Los oligonucleótidos de LNA se sintetizaron como oligonucleótidos no conjugados y totalmente fosforotioados (Exiqon A/S, Vedbaek, Dinamarca). El oligonucleótido LNA-antimiR de 15-mer perfectamente coincidente (5'-GTTCCATAGTCTACC-3'; SEQ ID NO: 13) era complementario a los nucleótidos 2-16 en la secuencia de miR-379 madura. El oligonucleótido de LNA de control aleatorizado se sintetizó con la siguiente secuencia: 5'-ACGTCTATACGCCCA-3'(SEQ ID NO: 14).

Experimentos con animales

Se obtuvieron animales C57BL/6J machos de 8 a 12 semanas de edad, *db/db*, negros de Nueva Zelanda (NZB) y obesos de Nueva Zelanda (NZO) de Charles River Laboratories (Bruselas, Bélgica). $GR^{dim/dim}$, $GR^{AlfpCre}$, y los correspondientes compañeros de camada de tipo salvaje se obtuvieron y criaron como se describió previamente (Rose AJ y otros, 2011). Todos los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas con una dieta regular sin restricciones y tenían acceso libre al agua potable. En todos los casos, los ratones se aclimataron a las instalaciones de alojamiento y a la dieta controlada (% E: 70 carbohidratos, 20 proteínas, 10 grasas; New Brunswick, EE. UU.) durante al menos una semana antes de la experimentación. Para los experimentos de inanición, los animales se mantuvieron en ayunas durante 24 h con libre acceso al agua o se mantuvieron en ayunas y se alimentaron durante las 6 h restantes.

Para examinar los efectos a largo plazo de la desactivación génica del RG hepático sobre la expresión de microARN, se administró a los ratones 5x10¹¹ genomas virales de virus adenoasociado de control negativo inespecífico o portador de miARN específico de RG. Los ratones se mantuvieron con una dieta normal durante 6 semanas, después de lo cual se mantuvieron en ayunas durante la noche durante 14-16 h y luego se sacrificaron.

Para examinar los efectos de los glucocorticoides sobre los niveles de microARN hepáticos, los ratones C57L/J machos de 7-8 semanas de edad se trataron con 9 α -Fluoro-16 α -metilprednisolona (Dexametasona, Dex; 1 mg/kg, Sigma-Aldrich, Munich, Alemania) o vehículo (Veh, etanol al 2 % en solución salina isotónica) durante 14 días, después de lo cual se sacrificaron entre ZT1-4 en un estado de alimentación aleatoria.

5 Para examinar la importancia de la dimerización del RG y la actividad de unión al ADN, animales machos de 7-10 semanas de edad con deficiencia homocigótica en la dimerización de receptores de glucocorticoides (GR^{dim/dim}) (Reichardt HM y *otros*, 1998) y ratones de la misma camada de tipo salvaje se trataron diariamente con 9 α -Fluoro-16 α -metilprednisolona (dexametasona, Dex; 1 mg/kg, Sigma-Aldrich, Munich, Alemania) o vehículo (Veh, etanol al 2 % en solución salina isotónica) durante 14 días, después de lo cual se sacrificaron durante el estado de ayuno nocturno.

15 Para examinar los efectos de la desactivación génica del RG específico de hepatocitos en ratones, se tomaron en ayunas muestras de hígado de ratones GR^{AlfpCre} (Opherk C y *otros*, 2004) y ratones de la misma camada de tipo salvaje como se informó previamente (Lemke U y *otros*, 2008).

20 Para investigar los efectos metabólicos de la pérdida de miR-379 en el hígado, se inyectó a los ratones C57BL/6J y *db/db* 15 mg/kg de BW de LNA específico anti-379 o control aleatorizado (ambos reconstituidos en agua y diluidos con solución salina isotónica) durante dos días consecutivos. Los ratones se sacrificaron 7d o 14d después de la inyección en el estado de alimentación aleatoria.

25 Para evaluar si los efectos metabólicos de la inhibición de miR-379 todavía son observables tras la desactivación génica de la diana *Lsr*, se inyectaron adenovirus a ratones C57BL/6J, específicos de *Lsr* o inespecíficos, como se describió previamente (Narvekar P y *otros*, 2009). Tres días después de la inyección del virus, los ratones se inyectaron con LNA específico anti-379 o control aleatorizado como se indicó anteriormente. Los ratones se sacrificaron 7d después de la inyección de LNA.

30 Los órganos incluyendo hígado, almohadillas de grasa epididimaria y músculos gastrocnemios se recolectaron después de los períodos de tiempo correspondientes, se pesaron, se congelaron rápidamente y se usaron para análisis posteriores. También se recolectó la sangre completa para el aislamiento del suero que luego se mantuvo a -80 °C hasta que se necesitara para los análisis. El contenido total de grasa corporal se determinó mediante un analizador de composición corporal Echo MRI (Echo Medical Systems, Houston, TX, EE. UU.). La manipulación y experimentación con animales se realizó de acuerdo con las pautas de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y fue aprobada por las autoridades locales.

35 Análisis tisular y serológico de metabolitos y hormonas

40 Para garantizar un análisis representativo de todo el hígado, se pulverizaron muestras de hígado congelado (Bessman Tissue Pulveriser, 189-476, VWR International GmbH, Darmstadt, DEU) y las alícuotas de tejido en polvo subsiguientes se pesaron y se prepararon para las extracciones de analitos. Los lípidos hepáticos se extrajeron como se describió previamente (Herzig S y *otros*, 2003).

45 Los niveles séricos de glucosa se midieron mediante el uso de un analizador automatizado (One Touch, Lifescan, Neckargemund, Alemania). Se usaron kits disponibles comercialmente para cuantificar en suero, triglicéridos (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania), colesterol (RANDOX, Crumlin, NIR), ácidos grasos no esterificados (WAKO, Neuss, Alemania), cuerpos cetónicos (WAKO, Neuss, Alemania), alanina amino transferasa (Fischer Scientific, Schwerte, Alemania), corticosterona (Assay Designs, Ann Arbor, EE. UU.) e insulina (Merckodia, Uppsala, Suecia). Los triglicéridos, el colesterol, los ácidos grasos libres y los cuerpos cetónicos hepáticos se analizaron a partir de los extractos mediante el uso de los mismos kits comerciales que en suero y. Los valores se calcularon como la concentración milimolar por litro (suero) o por gramo de tejido húmedo (hígado).

50 Cromatografía líquida rápida de proteínas

55 El suero del número especificado de ratones por grupo experimental se agrupó y se sometió a cromatografía líquida rápida de proteínas como se describió previamente (Lichtenstein L y *otros*, 2007). El colesterol y los TG se midieron en las fracciones eluidas mediante el uso de kits comerciales como arriba. Los valores se calcularon como μg de triglicéridos o colesterol por fracción.

60 Liberación de VLDL hepática

65 La producción de VLDL se determinó después de la inyección de tiloxapol (Sigma, Munich, Alemania) como se describió (Mandard y *otros*, 2006). Brevemente, siete ratones C57BL/6J por grupo se mantuvieron en ayunas durante la noche por 16 horas. Al día siguiente, se extrajeron 40 μl de sangre de cada ratón cortando la punta de la cola. El volumen de tiloxapol en μl requerido por ratón fue de aprox. 3 veces el peso del ratón en gramos; es decir, un ratón de 25 g requirió 75 μl de una solución al 20 %. Las cantidades especificadas se administraron a través de la vena de

la cola y se tomaron muestras de sangre de 40 µl cada 50 min durante 2,5 horas. Los ratones se sacrificaron finalmente a los 300 minutos. Se determinaron los valores de TG séricos (véase más arriba) y se representaron frente al tiempo.

Aclaramiento de VLDL

5 La VLDL humana se aisló de muestras de suero en ayunas mediante ultracentrifugación como se describió (Redgrave TG y otros, 1975). Brevemente, se pusieron 3,5 ml de suero en un tubo de polialómero SW40Ti y se mezclaron con 1,39 g de KBr, se cubrieron con 332,8 ml de una solución de NaCl/KBr (D = 1,063, 1,019 y 1,006 g/ml) y se procesaron durante 18 h a 40 000 rpm. Se inyectó VLDL humana (20 mg) en cada animal, y se tomaron muestras de suero a los 10 2, 10, 30, 60 y 120 min. Los niveles séricos de ApoB-100 humana se midieron mediante el uso un ELISA de ApoB específico para humanos. Para el ELISA, los inventores usaron un anticuerpo de recubrimiento primario generado contra apoB-100 humana (mAb47, suministrado amablemente por J. Witztum, Universidad de San Diego, EE. UU.), a una concentración de 2 mg/pocillo de proteína IgG en TBS/EDTA/BHT y un anticuerpo policlonal biotilado secundario producido en cabra contra ApoB humana en una concentración de 4 µg/pocillo en 1,5 % de BSA/TBS/0,1 % de Tween. 15 Para evitar la unión inespecífica, las placas se bloquearon con 1,5 % de BSA/TBS/0,1 % de Tween. Las muestras se diluyeron 1:25. Se leyó la absorbancia 30 min después de la adición de TMB y la detención de la reacción con H₂SO₄ 2 M a 450 nm (Groot PH y otros, 1991).

Actividad de LPL

20 Las mediciones de actividad de LPL se realizaron como se describió (Klingenspor M y otros, 1989) mediante el uso de muestras de tejido adiposo congelado.

Aislamiento de ARN y RT-PCR Taqman cuantitativa

25 El ARN total se extrajo del hígado de ratón homogeneizado o lisados celulares mediante el uso del reactivo Qiazol y miRNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADNc se preparó mediante transcripción inversa mediante el uso de la enzima M-MuLV y el cebador Oligo dT (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Los ADNc se amplificaron mediante el uso de kits de ensayo a pedido y un detector de secuencias ABIPRISM 7700 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Los datos de expresión de ARN se normalizaron respecto a los niveles de ARN de proteína de unión a caja 30 TATA (TBP). Para la RT-PCR de microARN, se usó el kit de transcripción inversa de microARN TaqMan® de Applied Biosystems (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Alemania) junto con TaqMan® MicroRNA Assay Primer. Se usó snoRNA-202 como control interno para las cuantificaciones de miARN. Se pueden proporcionar números de productos particulares para conjuntos de sondas a pedido.

Análisis de proteínas

35 Se extrajeron proteínas de muestras de órganos congelados, líneas celulares cultivadas o células primarias en tampón de lisis celular (Rose AJ y otros, 2007) y se aplicaron 10 mg de proteína en geles de SDS-poliacrilamida al 5-12 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los ensayos de transferencia Western se realizaron como se describió 40 (Herzig S y otros, 2001) mediante el uso de anticuerpos específicos para el receptor de glucocorticoides (Santa Cruz Biotech., Heidelberg, Alemania), LSR (DKFZ, Heidelberg, Alemania), LDLR (Abcam, Cambridge, Reino Unido), APOB (Santa Cruz Antibodies) Actina (Sigma, Munich, Alemania) o VCP (Abeam). Las densidades ópticas de las bandas se cuantificaron mediante el uso del software ImageJ (NIH).

Exámenes histológicos

45 Para la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y de lípidos con aceite rojo O, se fijaron criosecciones de hígado de 5 mm embebidas en el compuesto Tissue Tek OCT (Sakura, Países Bajos) se fijaron en formol de Baker. Los núcleos se tiñeron por contraste con hematoxilina. 50

Cultivo celular y transfecciones

55 Las células se cultivaron en DMEM con FBS al 10 % (HEK293, Hepa1-6) suplementado con glutamina en presencia o ausencia de antibióticos en dependencia del modo de aplicación de la transfección. Las construcciones de plásmidos, los imitadores de microARN (Fisher Scientific, Schwerte, Alemania) y los LNA (Exiqon A/S, Vedbaek, Dinamarca) se transfectoron en células mediante el uso de PEI (Polysciences Europe GmBbH, Eppelheim, Alemania), promofectina (para hepatocitos primarios) (Promocell GmbH, Heidelberg, Alemania), lipofectamina 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), o el método de CaCl₂ de acuerdo con el fabricante o mediante el uso del protocolo estándar. 60 Las construcciones de plásmidos se transfectoron en cantidades de 50 a 2000 ng, mientras que los imitadores de miARN y los LNA se transfectoron a concentraciones de 50 - 100 nM. En todos los estudios de cultivo celular, las células se transfectoron al 50 % de confluencia. El efecto de las construcciones de sobreexpresión/desactivación génica, imitaciones o LNA se evaluó 24-48 horas después de la transfección.

65 Los hepatocitos primarios de ratón se aislaron y cultivaron como se describió (Klingmuller J y otros, 2006). Brevemente, se anestesiaron ratones C57BL/6J machos de 8-12 semanas de edad y después de abrir la cavidad abdominal, se

perfundió el hígado a 37 °C con tampón Hanks I y II. Se extrajo la cápsula hepática y se diseccionó cuidadosamente en medio de adhesión E de Williams (WMEa; suplementado con FCS al 10 %; insulina 1,5 µM; dexametasona 100 nM; L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina al 1 %). La suspensión celular se filtró y se lavó dos veces con WMEa a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en WMEa. Los hepatocitos primarios se sembraron sobre placas de 6 pocillos recubiertas con colágeno I a una densidad de 1*10⁶ células vivas/pocillo en WMEa. Después de 4 h de incubación, las células no adheridas se eliminaron lavando una vez y reemplazando WMEa con WME (suplementado con FCS al 10 %; L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina al 1 %). Se realizó un lavado más severo para eliminar las células muertas después de 16-18 h subsiguientes de células en cultivo y luego las células se trataron en consecuencia.

Ensayo Seahorse de flujo metabólico de β-oxidación

La actividad de β oxidación mitocondrial se determinó mediante el uso de un analizador de flujo extracelular XF96 (Seahorse, Copenhagen). Antes del experimento, se sembraron 1000 células Hepa1-6 por pocillo en un formato de 96 pocillos y se transfectaron con construcciones de sobreexpresión y desactivación génica de miR-379 mediante el uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). El ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante y mediante el uso de un conjugado BSA-Palmitato 200 µM, carnitina 0,5 mM (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania) y etomoxir 100 µM (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania). La tasa de consumo de oxígeno se calculó y normalizó respecto al contenido de proteína, según lo determinado por la tinción con sulforrodamina B.

Perfil de expresión por micromatrices

El perfil de microARN se realizó en extractos de ARN total hepático de [1] ratones de tipo salvaje y db/db y de [2] ratones de control y ratones tratados con rAAV para la desactivación génica del RG específico de hígado. El aislamiento de ARN, la síntesis de ADNc y ARNc, y la hibridación con matrices de tipo GeneChip® miRNA 2,0 Array (Affymetrix, Freiburg, Alemania) se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se hibridaron cuatro matrices por grupo. Los datos de las micromatrices se analizaron en base a ANOVA mediante el uso de un paquete de software comercial (Micro Array Solution, versión 1.0; Instituto SAS, Cary, NC). Se usaron configuraciones estándar, excepto por las siguientes especificaciones: se ajustaron modelos mixtos log-lineales para valores de coincidencias perfectas, con el genotipo considerado constante y la identificación de la matriz, aleatoria. Se usó un CDF personalizado con definiciones de genes/transcritos basadas en Unigene para anotar las matrices. Las vías biológicas afectadas reflejadas por la expresión diferencial de genes se determinaron por ORA en base a la prueba exacta de Fisher.

Transferencia Northern

Para la detección de la expresión de miARN, se realizó una transferencia Northern como se describió previamente (V-arallyay E y otros, 2008). Brevemente, 20-40 µg de ARN total se separaron en geles de poliacrilamida de TBE-urea al 15 % y se transfirieron de modo semiseco a una membrana Hybond N+ (Amersham, GE Healthcare, Alemania). La sonda LNA completa complementaria a miR-379, miR-122 y let-7a se diseñaron como se describió en el registro de microARN (<http://www.sanger.ac.uk/>). Se etiquetaron 20 pmol de la sonda con polinucleótido quinasa T4 (New England Biolabs) y 20 µCi de [γ-³²P] ATP (250 µCi; Perkin Elmer Inc., Rodgau, Alemania). Las hibridaciones se realizaron a 50 °C durante 16 h en 100 ml del tampón de hibridación de ARN pequeño (Formamida•NaCl 1 M•Nafosfato 0,2 M•EDTA 0,04 M•solución de Denhardt•SDS). La membrana se lavó varias veces y se expuso a una pantalla de fósforo borrada que luego se escaneó y analizó después de al menos 4 horas. Para el lavado y el nuevo sondeo, la membrana se incubó a RT con una solución de lavado hirviendo (SSC 0,02X•SDS al 0,01 %) y se hibridó con otra sonda después de 30 minutos de prehibridación. La sonda U6RNA (5'-CACGAATTTGCGTGTCCATCCTT-3') se usó como control de aplicación.

Muestras de hígado humano *ex vivo*

Para examinar los efectos del tratamiento con glucocorticoides o su exceso en los microARN hepáticos humanos, se utilizó una pieza sana de hígado recién resecado de un individuo (Edad: 51 años, Sexo: mujer) sometido a cirugía hepática para extraer un tumor. De esta muestra, piezas pequeñas (10-20 mg) se disecaron cuidadosamente y se incubaron (37 °C, 5 % CO₂) por cuadruplicado en placas no adherentes de cultivo de tejidos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) en medio E de Williams (+L-Glutamina 2 mM y BSA al 0,1 %; Biochrom AG, Berlín, Alemania) que contiene EtOH al 0,11 % (Vehículo), RU486 1 µM (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania), dexametasona 0,1 µM (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania) y RU486 1 µM + dexametasona 0,1 µM. Las muestras se incubaron durante 30 min antes del tratamiento con o sin RU486. Las incubaciones se interrumpieron a las 3 h después del tratamiento tras lo cual se lavaron las piezas de tejido con PBS, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta que se necesitaron. Cada voluntario dio su consentimiento informado por escrito antes de participar, y el estudio fue aprobado por el comité de ética local.

Muestras de hígado humano

Sujetos. Se investigó la expresión de miR-379 en muestras de tejido hepático obtenidas de 10 donantes sanos caucásicos y 64 hombres y mujeres obesos caucásicos con (n=27) o sin (n=37) diabetes tipo 2 que se sometieron a cirugía abdominal abierta para desviación en Y de Roux, gastrectomía en manguito o colecistectomía electiva. Se tomó una pequeña biopsia de hígado durante la cirugía, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta que se realicen más preparaciones. La caracterización fenotípica de la cohorte se realizó como se describió previamente. Todas las muestras de sangre basales se recolectaron entre las 8 y las 10 am después de un ayuno nocturno. Todos los protocolos de estudio han sido aprobados por el comité de ética de la Universidad de Leipzig (363-10-30 13122010 y 017-12-230112). Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito antes de participar en el estudio.

Estudios de hsa-miR-379: La expresión del ARNm de miR-379 humano se midió por RT-PCR cuantitativa en tiempo real en un termociclador de fluorescencia mediante el uso de un ensayo TaqMan, y la fluorescencia se detectó en un detector de secuencia ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). El ARN total se aisló como se describió anteriormente. Se usó el kit de transcripción inversa de miARN TaqMan® de Applied Biosystems (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Alemania) junto con el cebador para hsa-miR-379 del TaqMan® MiRNA Assay para cuantificar el nivel de miARN. RNU58B se usó como control interno para las cuantificaciones de miARN.

Bioinformática y análisis de sitios diana de miARN

El navegador genómico de UCSC (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) se utilizó para identificar la supuesta región promotora del microARN y escanear la región en busca de resultados de experimentos de ChIP-Seq de factores de transcripción (Meyer LR y otros, 2012). Para la predicción de dianas de microARN se usaron, miR-Walk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) y RNA22 (<https://cm.jefferson.edu/rna22v1.0/>) (Dweep H y otros, 2011; Miranda KC y otros, 2006).

Análisis estadístico

Para cada experimento, se determinaron las medias y SEM de los parámetros medidos. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso de la prueba t de Student en diseños de un factor. La correlación se determinó mediante el uso del coeficiente de correlación de Pearson; se aplicó la prueba F para determinar la significación. Para los diseños de estudios multifactoriales, se usó un ANOVA de dos vías cuando fue apropiado. Se aplicó Holm-Sidak post hoc cuando se encontraron diferencias significativas con un nivel de significación general = 0,05. Todos los análisis se llevaron a cabo con el software SigmaPlot v.12 (Systat Software GmbH, Erkrath Alemania).

Referencias

Benetatos, L., Hatzimichael, E., Londin, E., Vartholomatos, G., Loher, P., Rigoutsos, I. y Briasoulis, E. (2013). The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 70, 795-814.

Chahil, T.J. y Ginsberg, H.N. (2006). Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 35, 491-510, vii-viii.

Gebhard, C., Huard, G., Kritikou, EA y Tardif, J.C. (2013). Apolipoprotein B antisense inhibition--update on mipomersen. *Curr Pharm Des* 19, 3132-3142.

Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B. y Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103, 1489-1498.

Kulozik, P., Jones, A., Mattijssen, F., Rose, A.J., Reimann, A., Strzoda, D., Kleinsorg, S., Raupp, C., Kleinschmidt, J., Muller-Decker, K., Wahli, W., Sticht, C., Gretz, N., von Loeffelholz, C., Stockmann, M., Pfeiffer, A., Stohr, S., Dallinga-Thie, G.M., Nawroth, P.P., Berriel Diaz, M. y Herzig, S. (2011). Hepatic deficiency in transcriptional cofactor TBL1 promotes liver steatosis and hypertriglyceridemia. *Cell Metab* 13, 389-400.

Leiter, E.H. y Reifsnnyder, P.C. (2004). Differential levels of diabetogenic stress in two new mouse models of obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Supl. 1, S4-11.

Lemke, U., Kronen-Herzig, A., Diaz, M.B., Narvekar, P., Ziegler, A., Vegiopoulos, A., Cato, A.C., Bohl, S., Klingmuller, U., Sreaton, R.A., Muller-Decker, K., Kersten, S. y Herzig, S. (2008). The glucocorticoid receptor controls hepatic dyslipidemia through Hes1. *Cell Metab* 8, 212-223.

Luk, J.M., Burchard, J., Zhang, C., Liu, A.M., Wong, K.F., Shek, F.H., Lee, N.P., Fan, S.T., Poon, R.T., Ivanovska, I., Philippar, U., Cleary, M.A., Buser, C.A., Shaw, P.M., Lee, C.N., Tenen, D.G., Dai, H. y Mao, M. (2011). DLK1-DIO3 genomic imprinted microRNA cluster at 14q32.2 defines a stemlike subtype of hepatocellular carcinoma associated with poor survival. *J Biol Chem* 286, 30706-30713.

- Mandard, S., Zandbergen, F., van Straten, E., Wahli, W., Kuipers, F., Muller, M. y Kersten, S. (2006). The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *J Biol Chem* 281, 934-944.
- 5 Narvekar, P., Berriel Díaz, M., Krones-Herzig, A., Hardeland, U., Strzoda, D., Stohr, S., Frohme, M. y Herzig, S. (2009). Liver-specific loss of lipolysis-stimulated lipoprotein receptor triggers systemic hyperlipidemia in mice. *Diabetes* 58, 1040-1049.
- 10 Opherk, C., Tronche, F., Kellendonk, C., Kohlmuller, D., Schulze, A., Schmid, W. y Schutz, G. (2004). Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol Endocrinol* 18, 1346-1353.
- 15 Reynolds, R.M., Walker, B.R., Syddall, H.E., Andrew, R., Wood, P.J., Whorwood, C.B. y Phillips, D.I. (2001). Altered control of cortisol secretion in adult men with low birth weight and cardiovascular risk factors. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 245-250.
- 20 Rose, A.J., Diaz, M.B., Reimann, A., Klement, J., Walcher, T., Krones-Herzig, A., Strobel, O., Werner, J., Peters, A., Kleyman, A., Tuckermann, J.P., Vegiopoulos, A. y Herzig, S. (2011). Molecular control of systemic bile acid homeostasis by the liver glucocorticoid receptor. *Cell Metab* 14, 123-130.
- Rose, A.J., Vegiopoulos, A. y Herzig, S. (2010). Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: insights from genetic manipulations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122, 10-20.
- 25 Rosenson, R.S. y Underberg, J.A. (2013). Systematic Review: Evaluating the Effect of Lipid-Lowering Therapy on Lipoprotein and Lipid Values. *Cardiovasc Drugs Ther.*
- Rottiers, V. y Naar, A.M. (2012). MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 239-250.
- 30 Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S. y Kauppinen, S. (2012). Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence* 3, 1.
- Listado de secuencias
- 35 <110> Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts
Ruprecht-Karls Universität Heidelberg
- 40 <120> Microarn que modulan el efecto de la señalización de glucocorticoides
- <130> D31174WO
- 45 <150> EP13190740.4
<151> 2013 10 29
- <160> 14
<170> PatentIn versión 3.5
- 50 <210> 1
<211> 21
<212> ADN
<213> Mus musculus
- 55 <400> 1
ugguagacua uggaacguag g 21
- 60 <210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens
- <400> 2
ugguagacua uggaacguag g 21
- 65 <210> 3
<211> 25

<212> ADN
 <213> Mus musculus

 <400> 3
 5 aagggauucu gauguugguc acacu 25

 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 4
 aaaggauucu gcugucgguc ccacu 25

 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Mus musculus

 <400> 5
 20 ucggauccgu cugagcuugg cu 22

 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens

 <400> 6
 ucggauccgu cugagcuugg cu 22

 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Mus musculus

 <400> 7
 35 ugugacuggu ugaccagagg gg 22

 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 45 ugugacuggu ugaccagagg gg 22

 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Mus musculus

 <400> 9
 gaacggcguc augcaggagu u 21

 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Homo sapiens

 <400> 10
 60 gaacggcuuc auacaggagu u 21

 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 65 <213> Mus musculus

ES 2 812 561 T3

<400> 11
gaaguuguuc gugguggauu cg 22

5 <210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 12
gaaguuguuc gugguggauu cg 22

15 <210> 13
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Molécula Antisentido

20 <400> 13
gttccatagt ctacc 15

25 <210> 14
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Control Aleatorizado

30 <400> 14
acgtctatac gccca 15

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de un micro ARN (miR), o de un sitio diana de un miR, en donde miR es miR-379, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en resistencia a la insulina, hiperglucemia, dislipidemia sistémica y síndrome de Cushing, en donde el inhibidor es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia complementaria a o que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de dicho miR o dicho sitio diana de dicho miR, respectivamente.
2. El inhibidor para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de dicho miR es una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 1 o 2.
3. El inhibidor para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende al menos una modificación química, preferentemente en donde dicha modificación química se selecciona del grupo de análogos de ácido nucleico que consiste en ADN fosforotioato (PS), ARN 2'-O-metilo (OMe), ARN 2'-O-metoxi-etil (MOE), ácido nucleico peptídico (ANP), N3'-P5' fosforoamidato (NP), ácido nucleico 2'-fluoro-arabino (FANA), ácido nucleico bloqueado (LNA), morfolino fosforoamidato (MF), ácido nucleico de ciclohexeno (CeNA) o triciclo-ADN (tc-ADN).
4. El inhibidor para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 13 (GTTCCATAGTCTACC).
5. Una molécula de miR-379 aislada para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Addison.
6. Una construcción genética que comprende una secuencia expresable de una molécula de miR aislada de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Addison.
7. Un método *in-vitro* para alterar la actividad glucocorticoide en una célula, el método comprende las etapas de:
 - a. Proporcionar una célula;
 - b. Para disminuir la actividad glucocorticoide en dicha célula: inhibir la actividad o expresión de miR-379; o
 - c. Para aumentar la actividad glucocorticoide en dicha célula: aumentar la actividad o expresión de miR-379.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde la actividad de un miR se inhibe mediante la introducción en dicha célula de una molécula antisentido (antimiR) dirigida a dicho miR o un bloqueador de miR dirigido al sitio diana de dicho miR; y/o en donde la actividad o expresión de dicho miR aumenta mediante la introducción en dicha célula de una construcción de expresión que comprende una secuencia expresable de dicho miR.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde dicha célula es una célula de mamífero, preferentemente una célula humana, tal como una célula hepática o adiposa humana.
10. Un vector para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en resistencia a la insulina, hiperglucemia, dislipidemia sistémica y síndrome de Cushing, el vector comprende un inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; en donde dicho vector es preferentemente un vector viral, tal como un adenovirus.
11. Un vector para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Addison, el vector comprende una molécula de miR aislada de la reivindicación 5, o una construcción genética de acuerdo con la reivindicación 6; en donde dicho vector es preferentemente un vector viral, tal como un adenovirus.
12. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en resistencia a la insulina, hiperglucemia, dislipidemia sistémica y síndrome de Cushing, la composición farmacéutica comprende un inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un vector de acuerdo con la reivindicación 10 junto con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
13. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Addison, la composición farmacéutica comprende una molécula de miR aislada de la reivindicación 5, una construcción genética de acuerdo con la reivindicación 6, o un vector de acuerdo con la reivindicación 11 junto con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Figura 1:

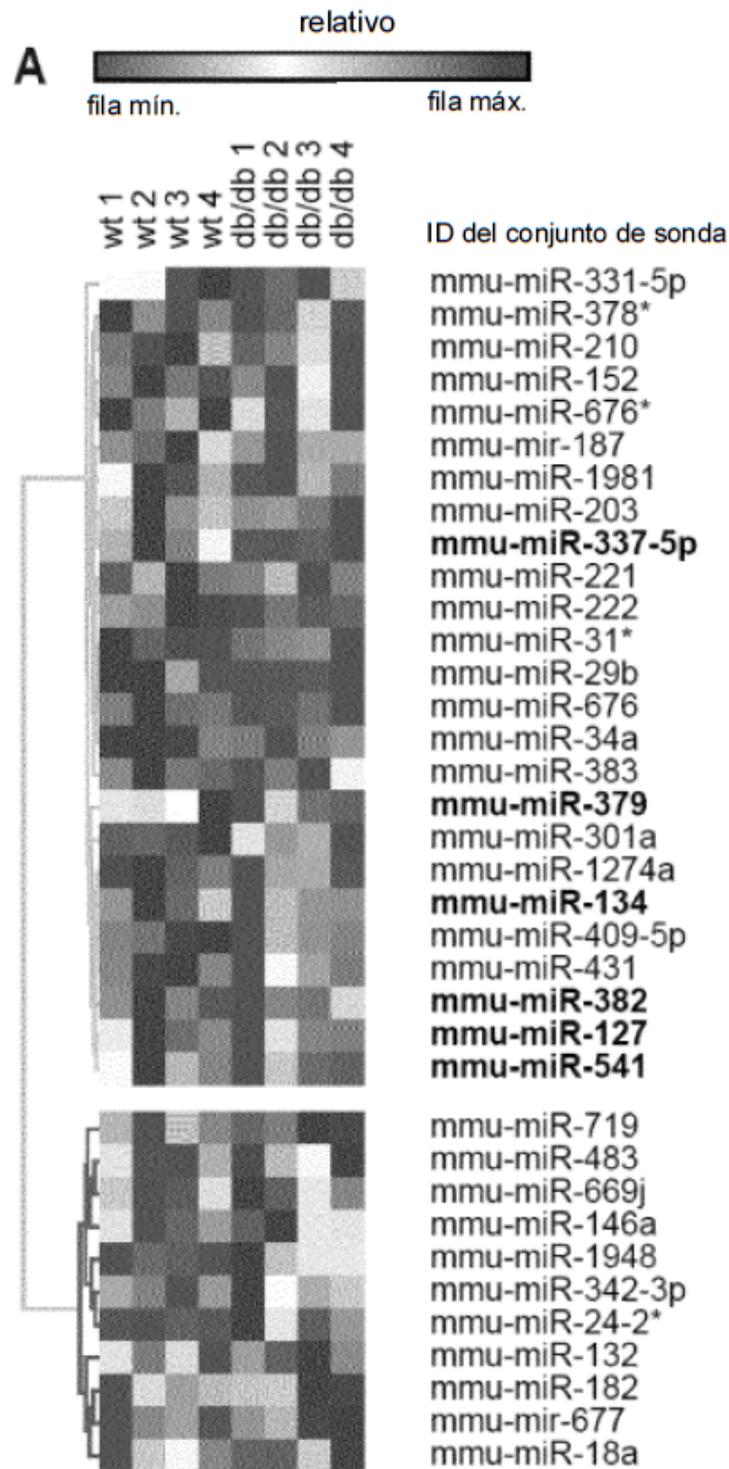


Figura 1 continuación:

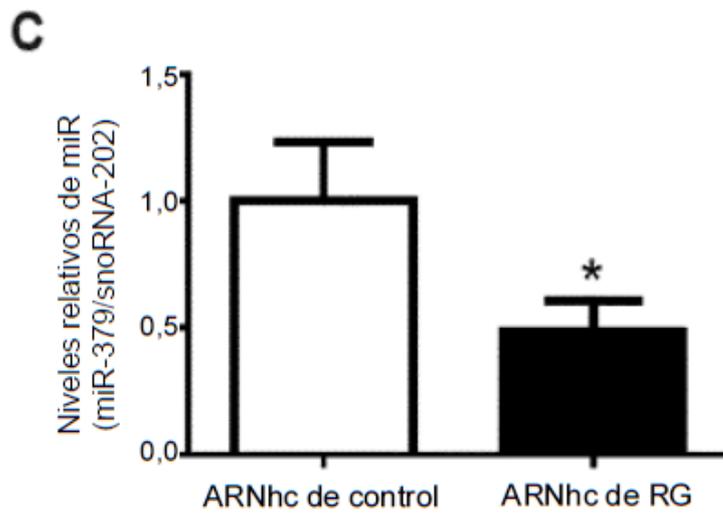
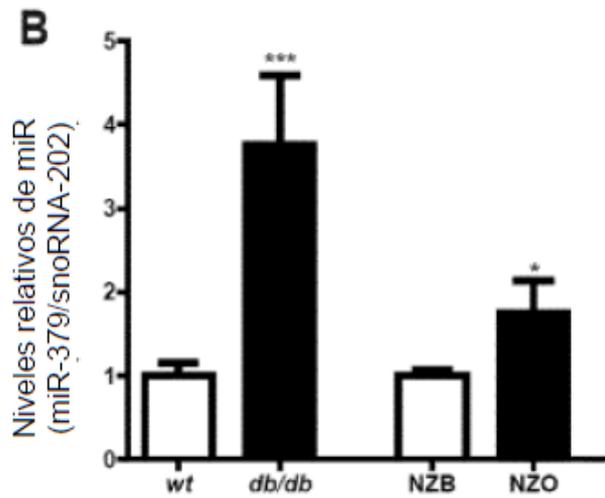
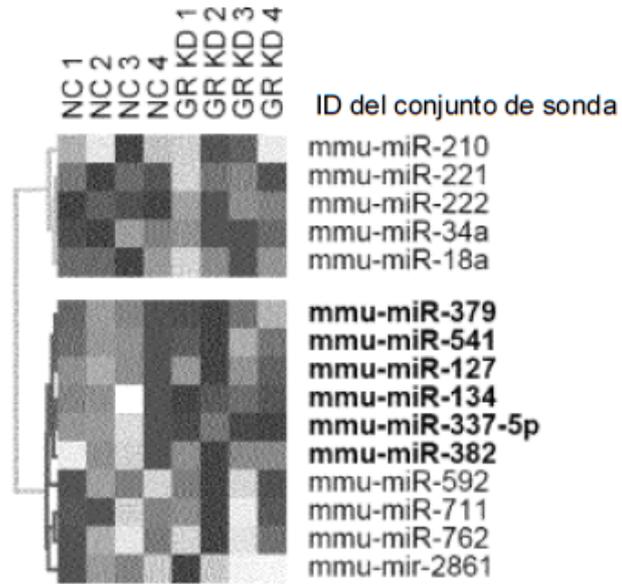


Figura 1 continuación:

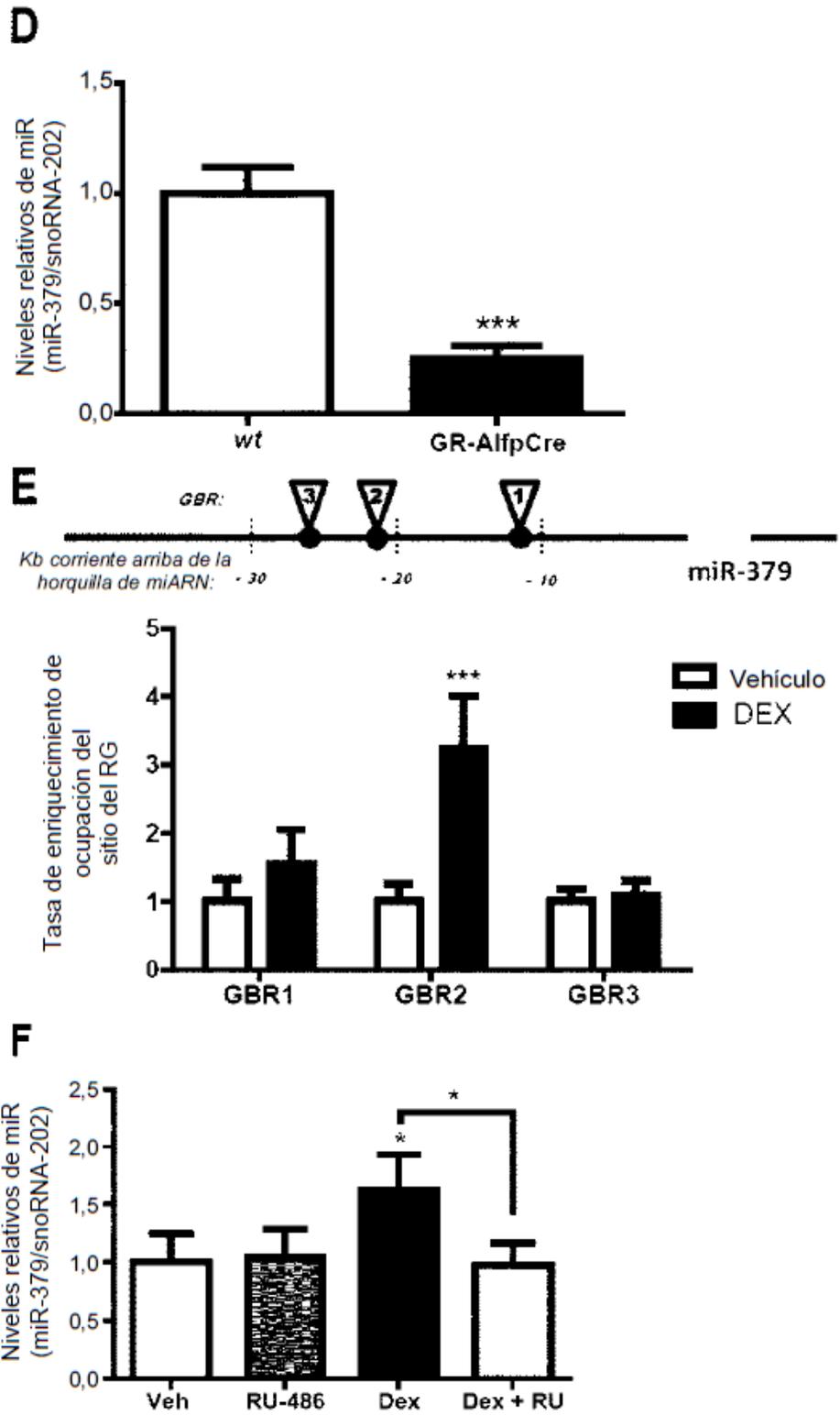


Figura 2:

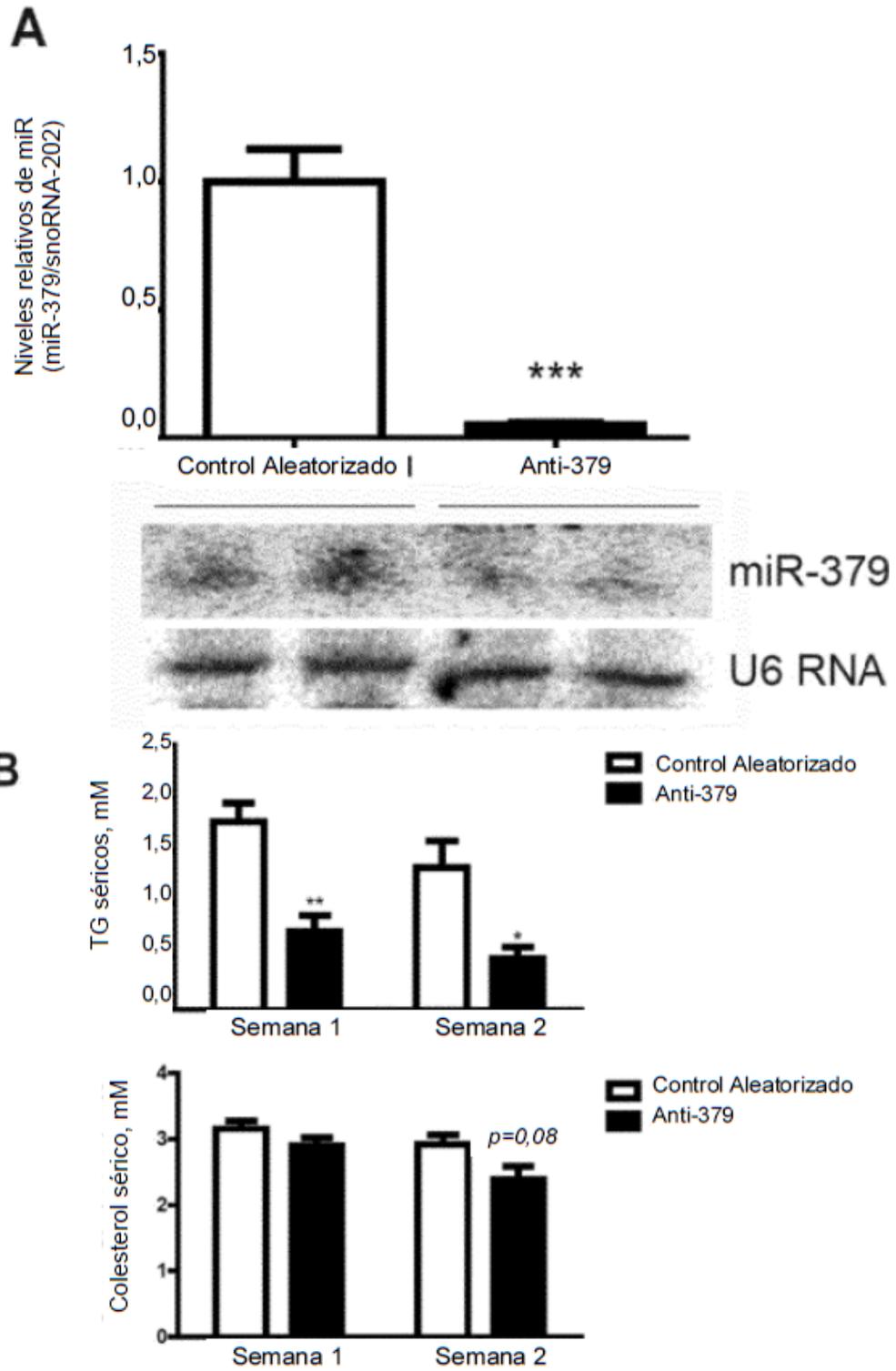


Figura 2 continuación:

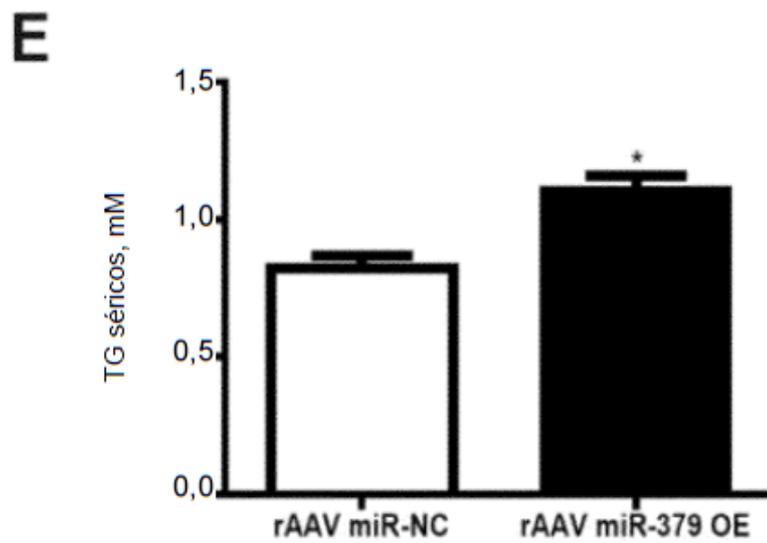
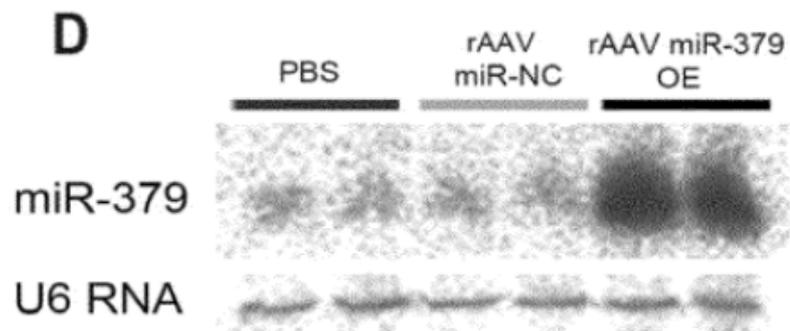
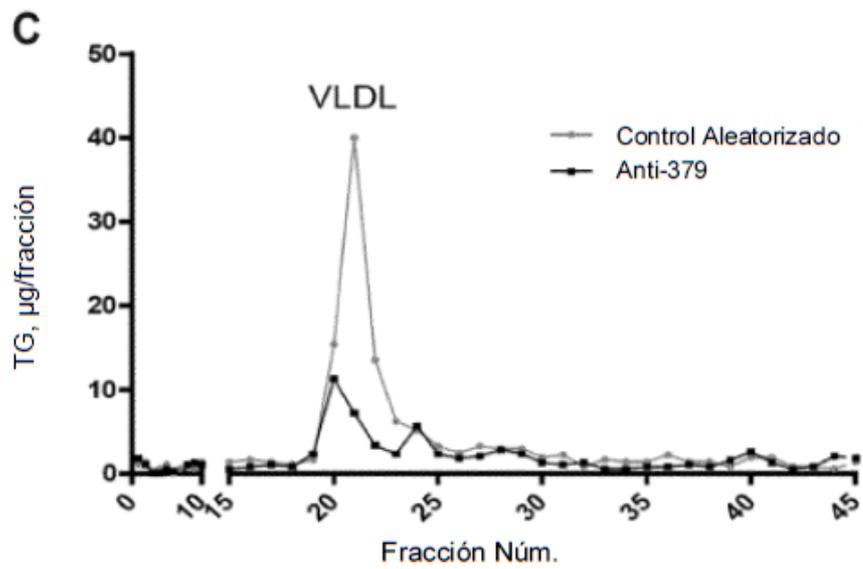


Figura 2 continuación:

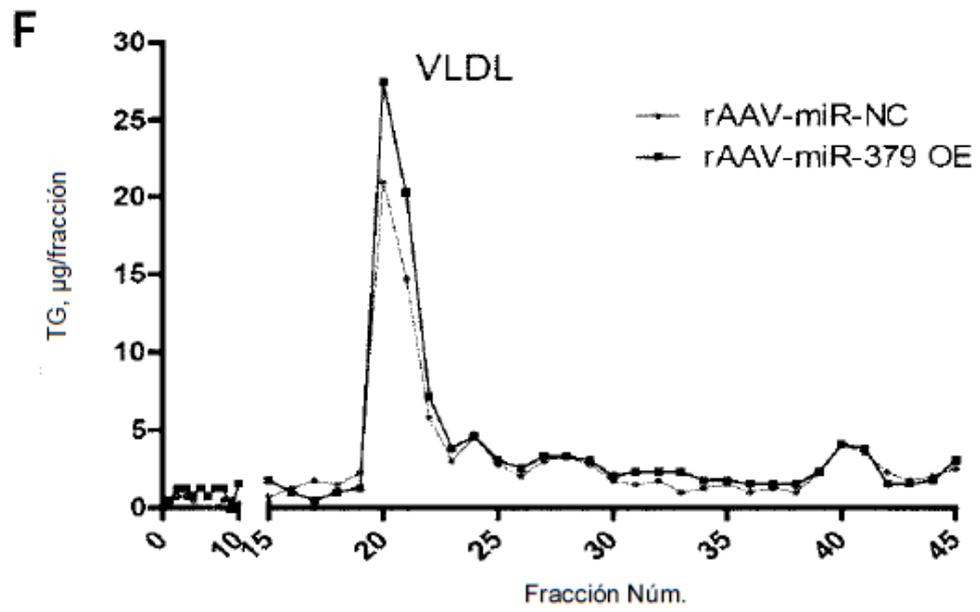
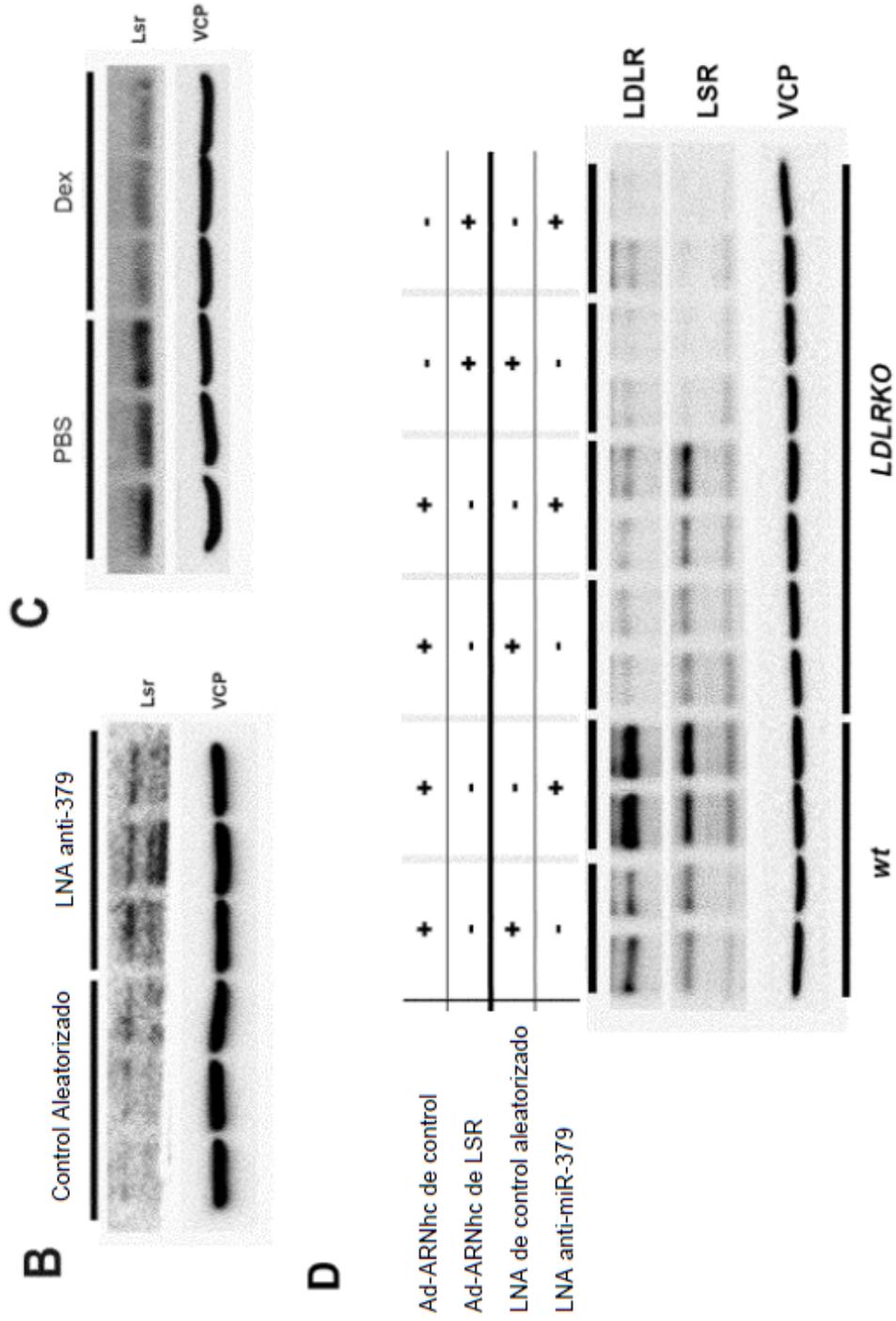
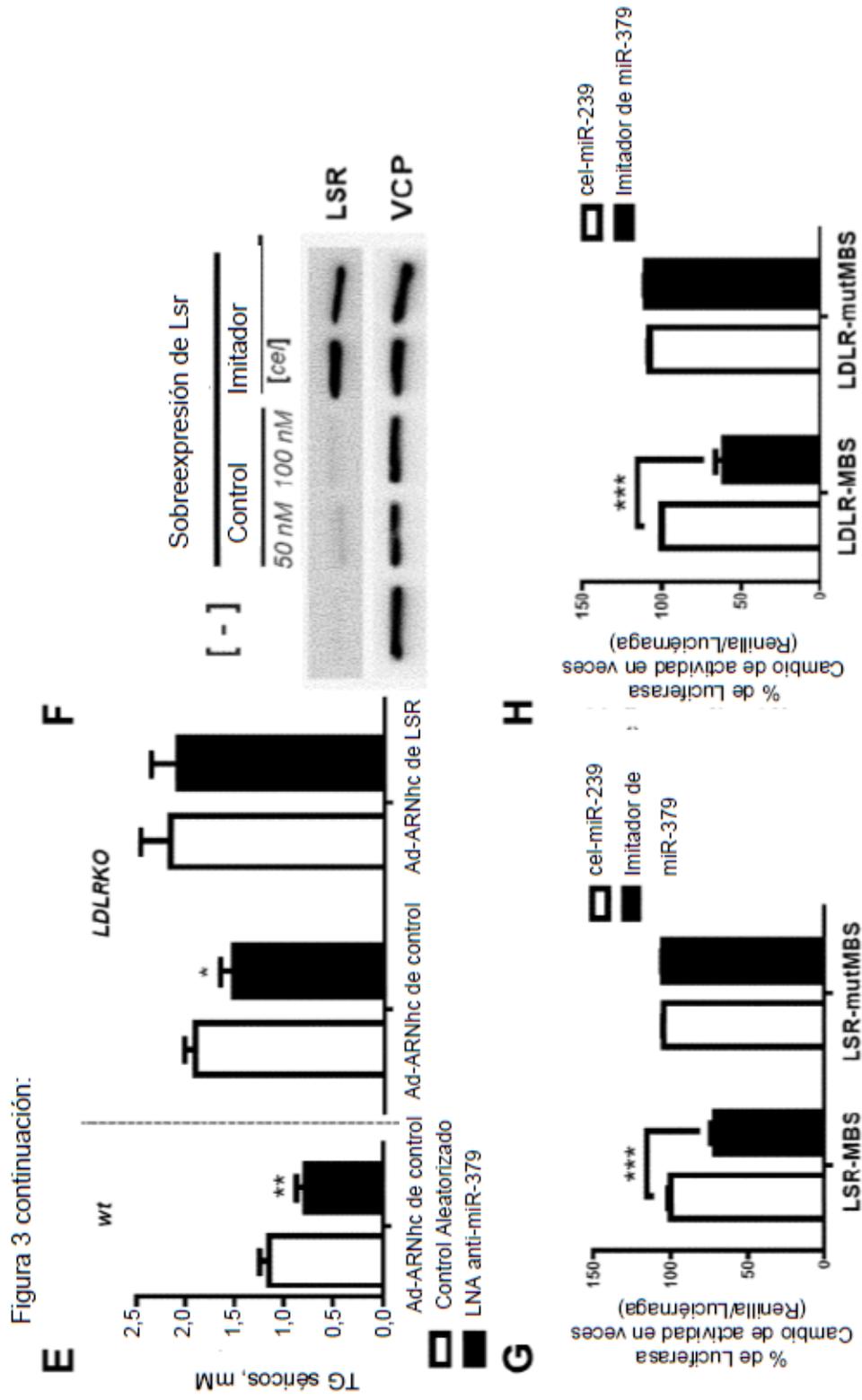


Figura 3 continuación:





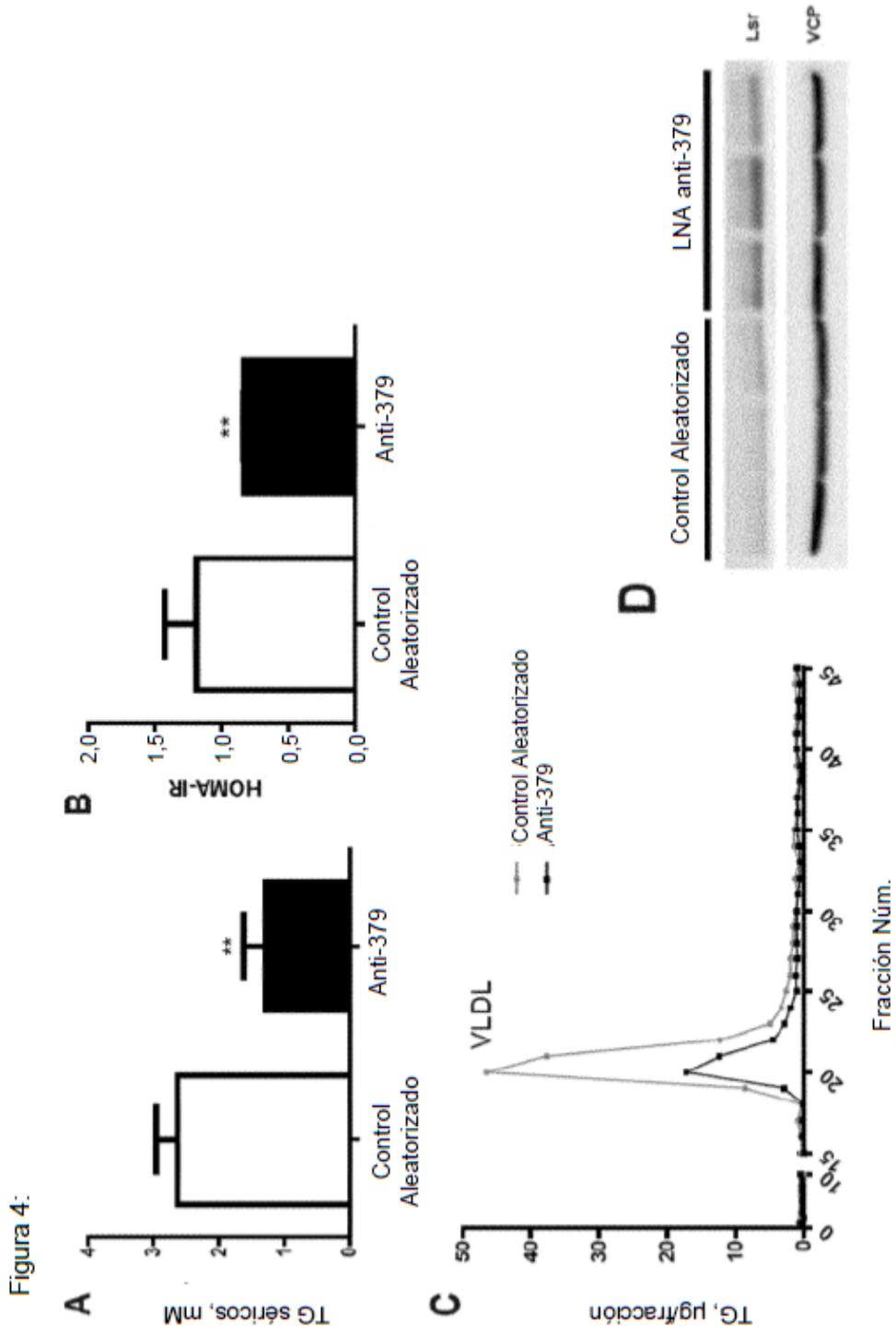


Figura 4 continuación:

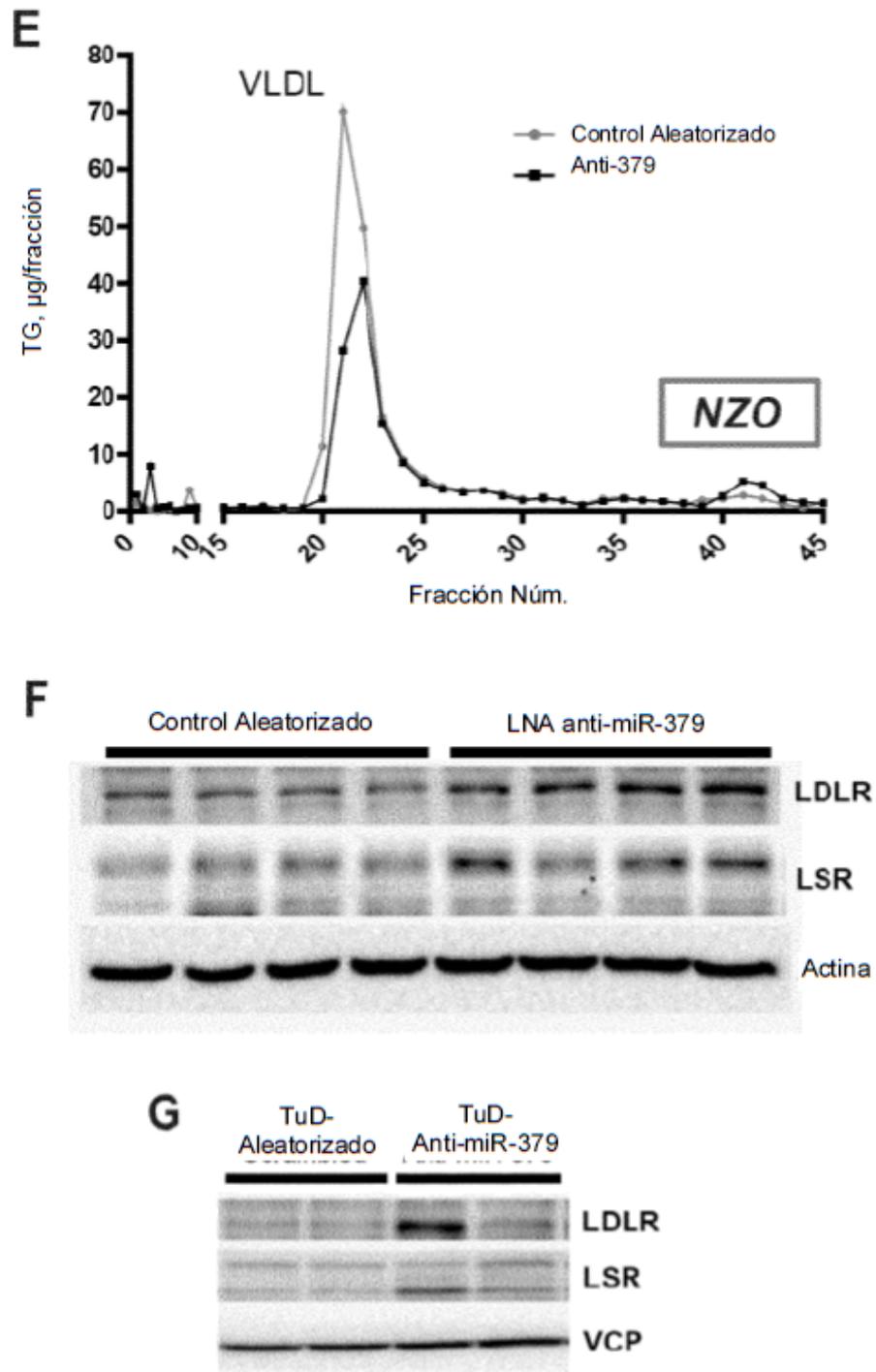


Figura 4 continuación:

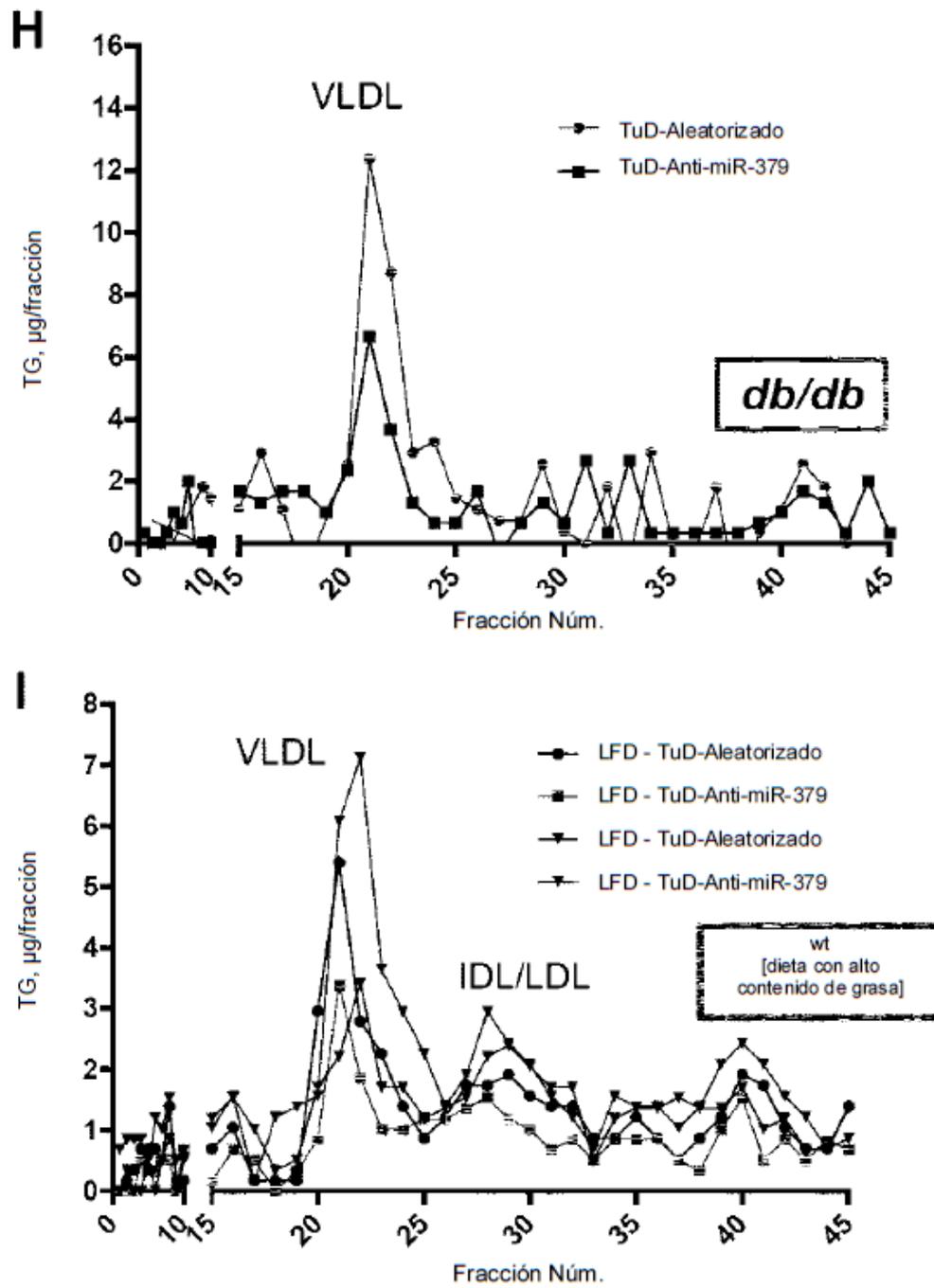


Figura 5:

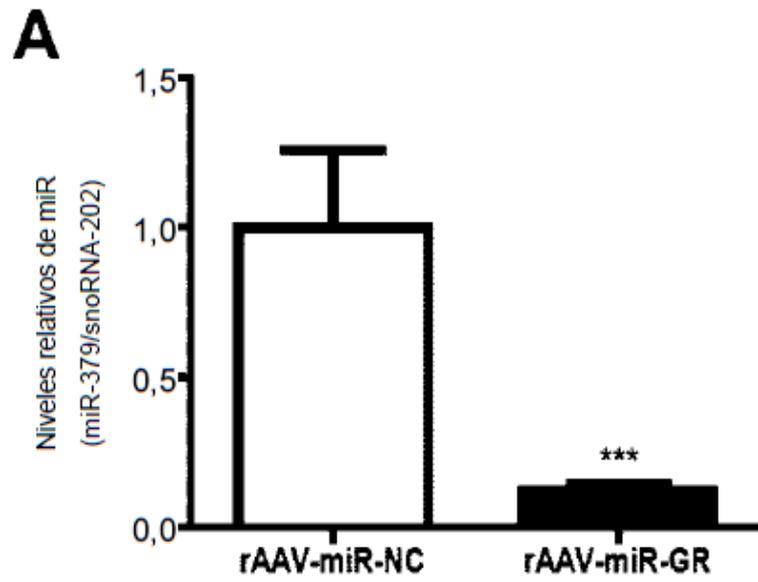
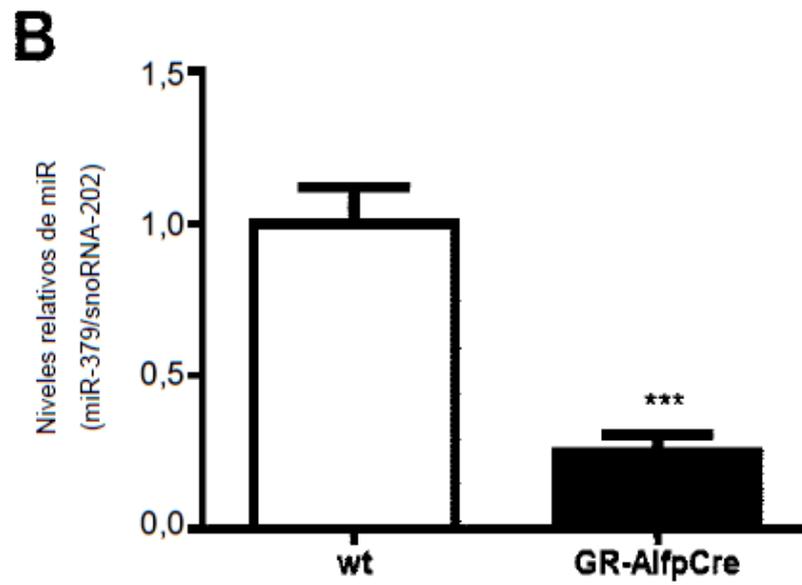


Figura 5 continuación:



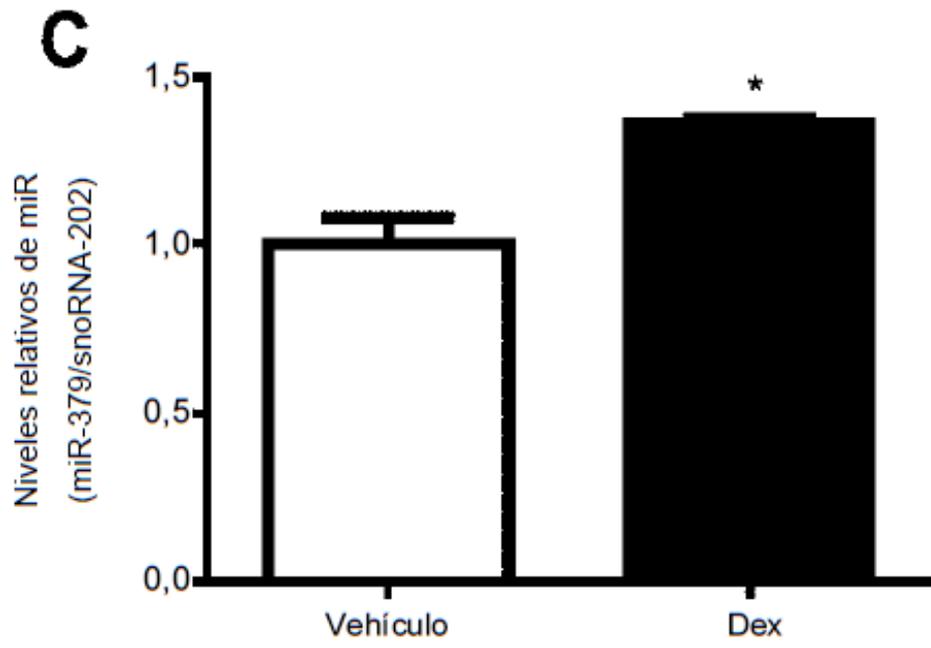
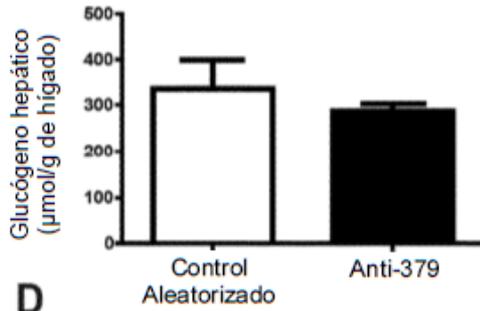


Figura 6:

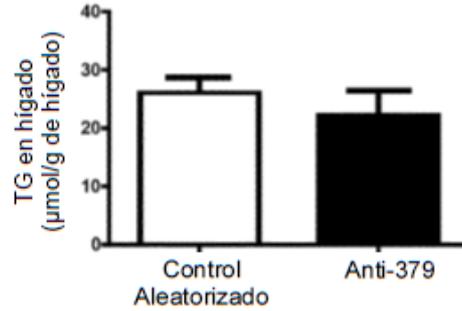
A

ALT sérica, U/L	
Rango Normal	17 - 77
Control Aleatorizado	37,06 ± 11,08
Anti-379	27,57 ± 8,96

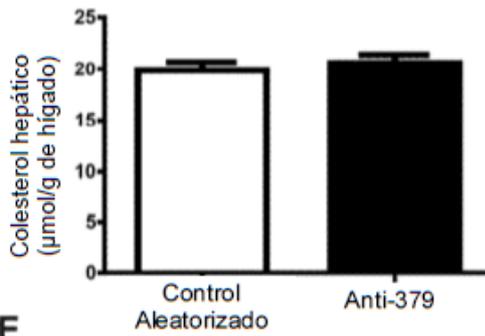
B



C



D



E

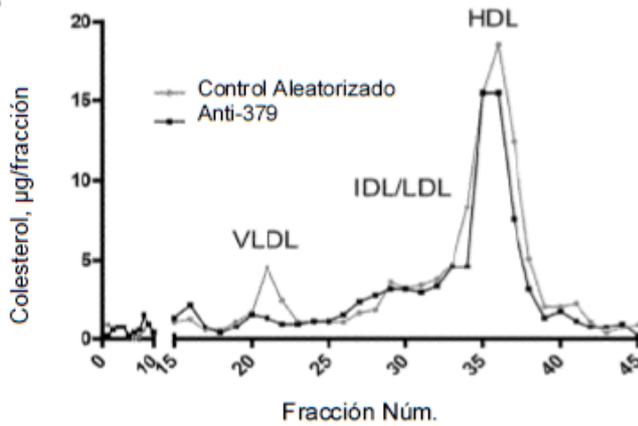


Figura 6 continuación:

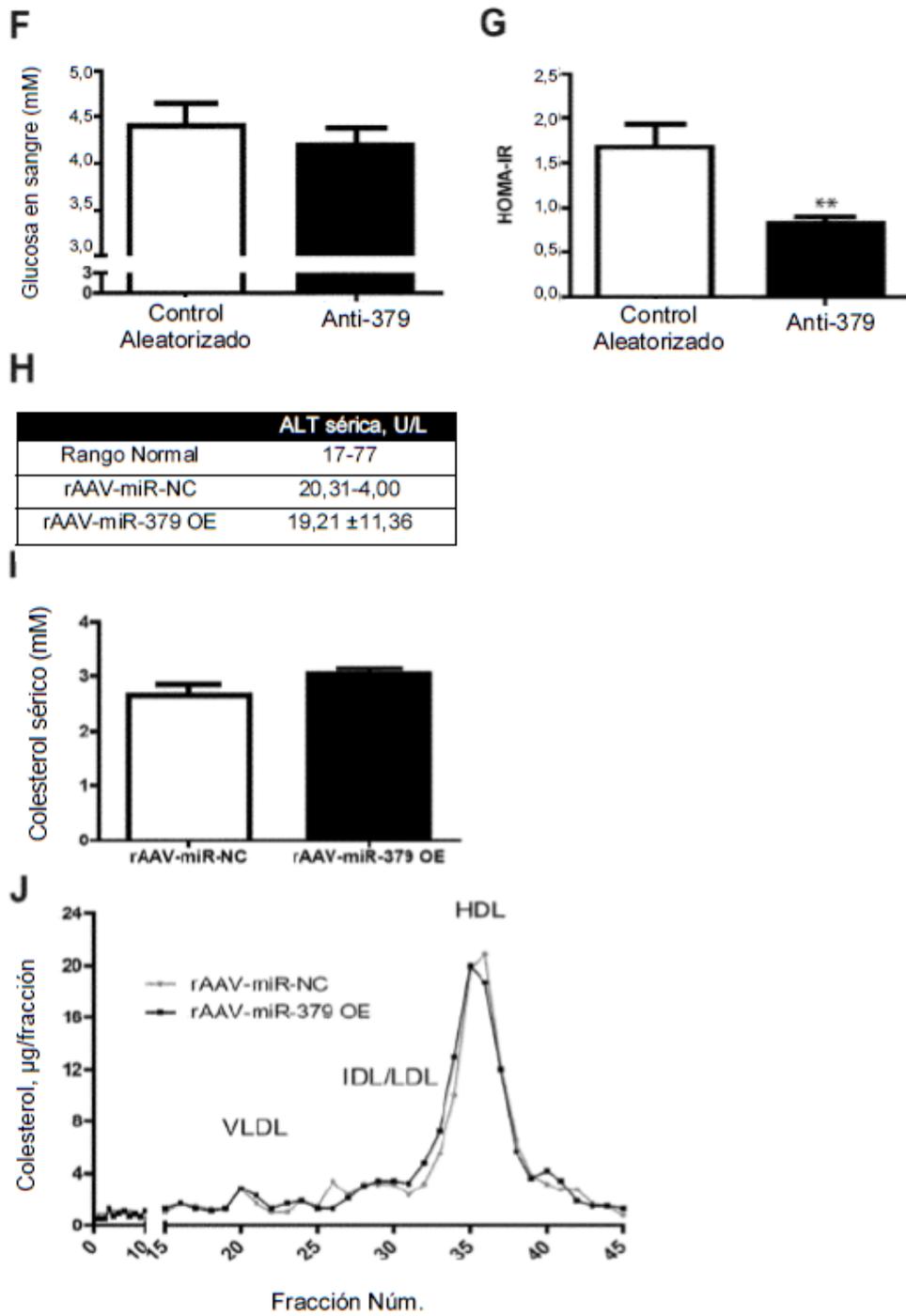


Figura 7:

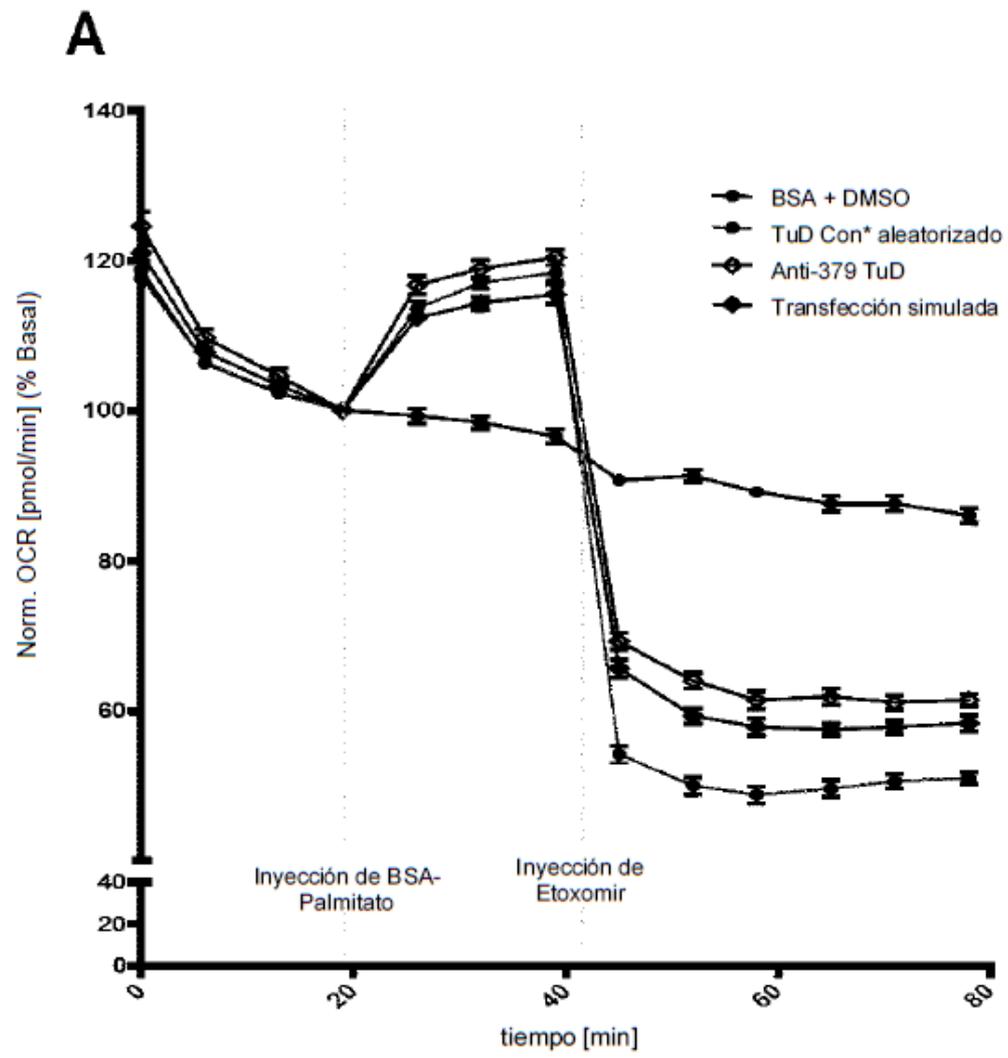


Figura 7 continuación:

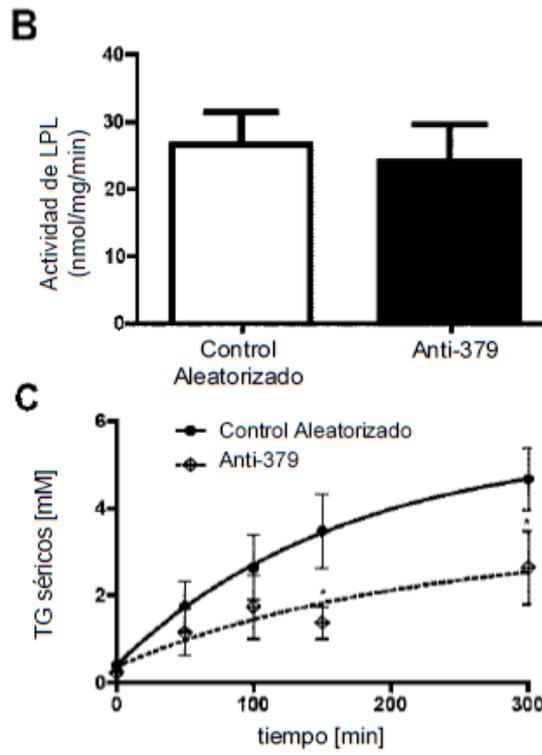


Figura 8:

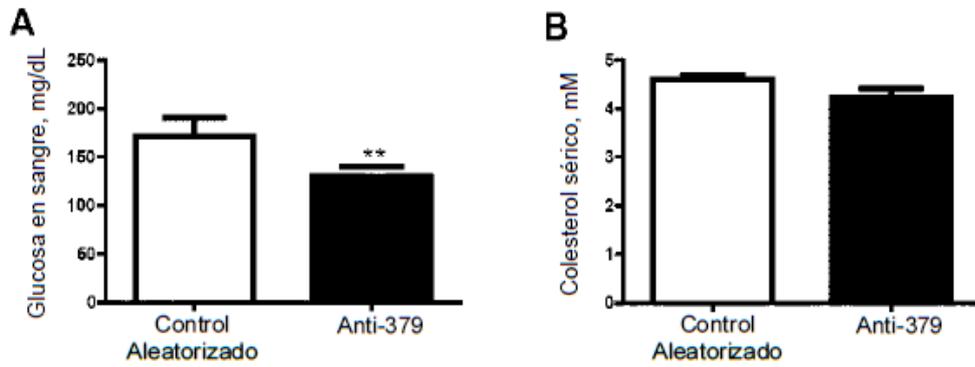
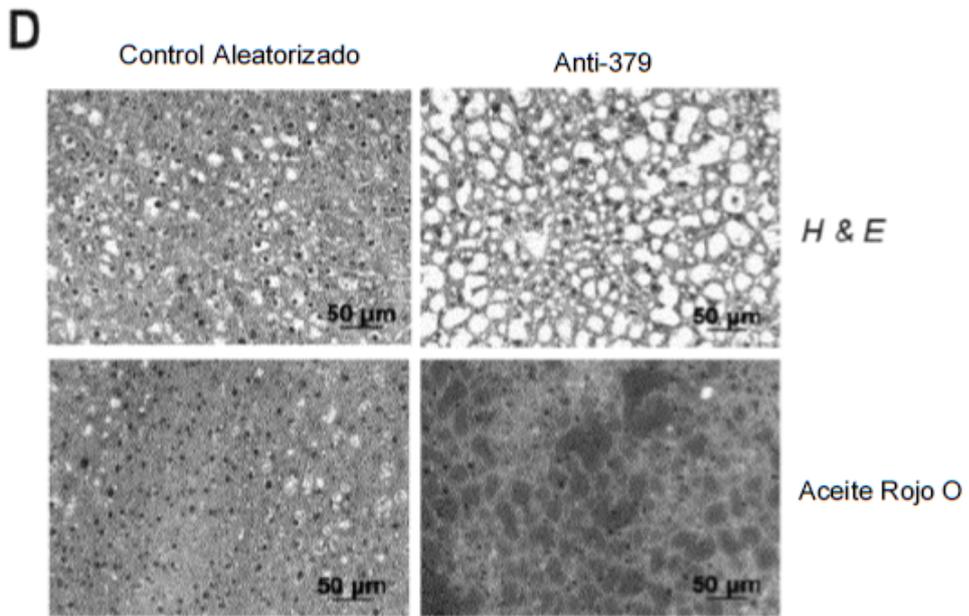
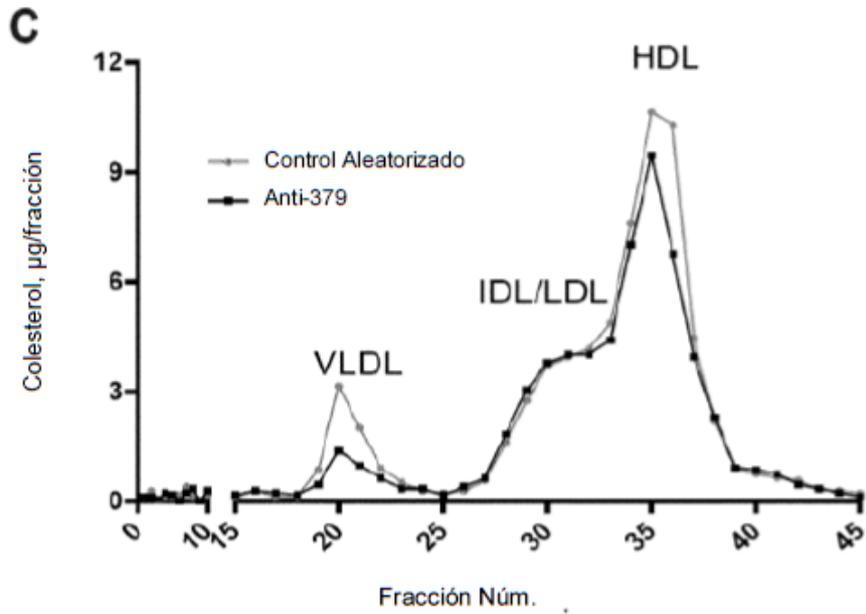


Figura 8 continuación:



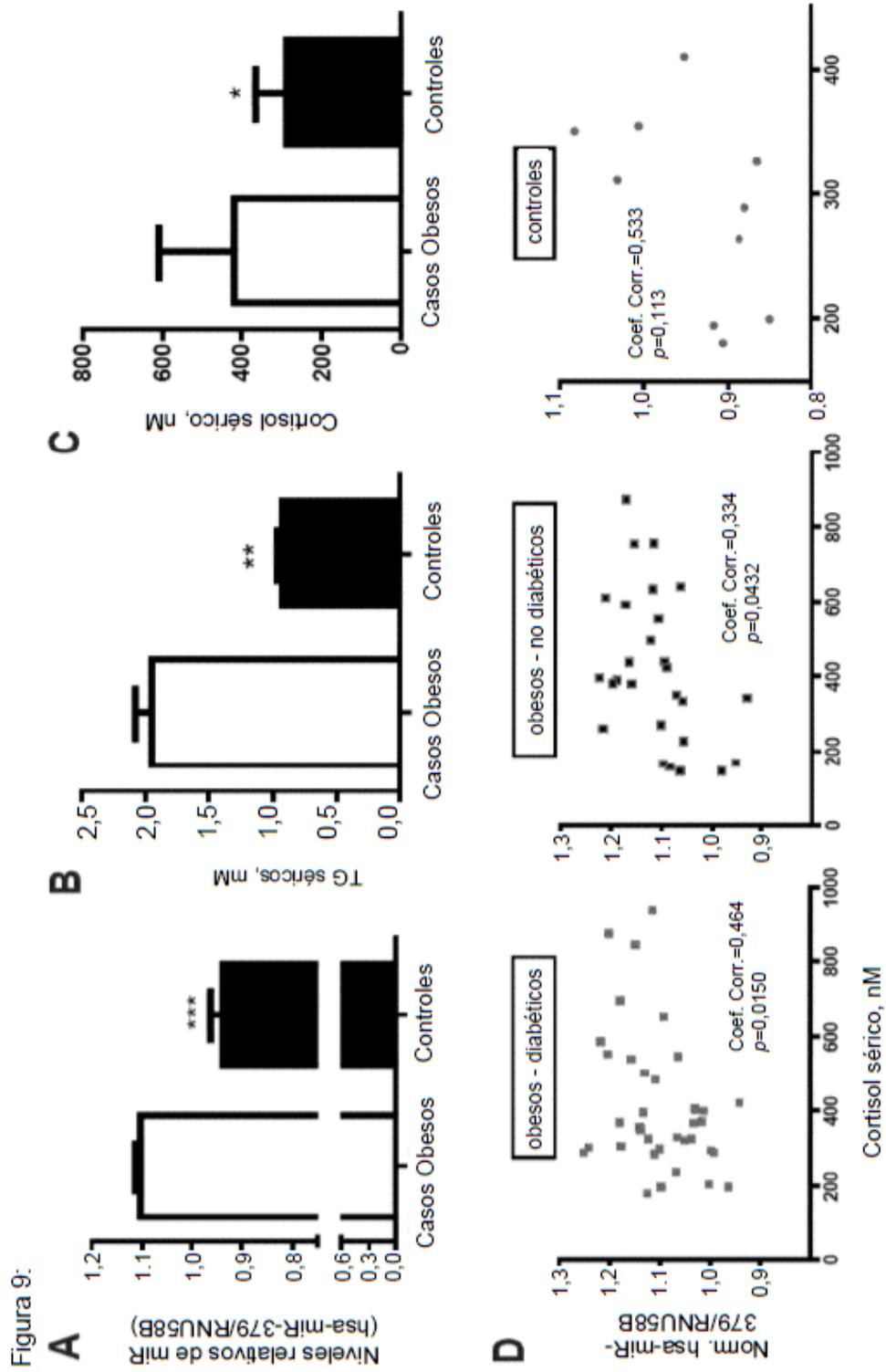


Figura 9 continuación:

