

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2013/001130 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
3 de enero de 2013 (03.01.2013)

WIPO | PCT

- (51) **Clasificación Internacional de Patentes:**  
*C12N 15/113* (2010.01) *A61P 9/10* (2006.01)  
*C07K 14/705* (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
- (21) **Número de la solicitud internacional:**  
PCT/ES2012/070483
- (22) **Fecha de presentación internacional:**  
29 de junio de 2012 (29.06.2012)
- (25) **Idioma de presentación:** español
- (26) **Idioma de publicación:** español
- (30) **Datos relativos a la prioridad:**  
P201131092 29 de junio de 2011 (29.06.2011) ES
- (71) **Solicitantes** (*para todos los Estados designados salvo US*):  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **INSTITUTO CATALÁN DE CIENCIAS CARDIOVASCULARES (ICCC)** [ES/ES]; Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Pavelló del Convent Sant Antoni Maria Claret nº 167, E-08025 Barcelona (ES).
- (72) **Inventores; e**
- (75) **Inventores/Solicitantes** (*para US solamente*):  
**LLORENTE CORTÉS, Concepción Vicenta** [ES/ES]; Centro de Investigación Cardiovascular, Avenida Sant Antoni Maria Claret, 167, E-08025 Barcelona (ES).  
**BADIMON MAESTRO, Lina** [ES/ES]; Centro de Investigación Cardiovascular, Avenida Sant Antoni Maria Claret, 167, E-08025 Barcelona (ES).
- (74) **Mandatario:** UNGRIA LÓPEZ, Javier; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).
- (81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*):  
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:**
- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
  - *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

(54) **Title:** LRP1 AS KEY RECEPTOR FOR THE TRANSFER OF STERIFIED CHOLESTEROL FROM VERY-LOW-DENSITY LIPOPROTEINS (VLDL) TO ISCHAEMIC CARDIAC MUSCLE

(54) **Título :** EL LRP1 COMO RECEPTOR CLAVE PARA LA TRANSFERENCIA DE COLESTEROL ESTERIFICADO DESDE LAS LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD (VLDL) AL MIOCARDIO ISQUEMICO

(57) **Abstract:** The invention relates to novel molecules that can modulate one of the mechanisms leading to the massive deposition of cholesterol in the cardiomyocyte and/or in the smooth muscle cells of the vascular wall, during acute myocardial infarction or other clinical situations involving ischaemia. The invention also shows that the blockage of the LRP1 by means of certain agents including a recombinant expression vector, an RNAi, an antibody, an siRNA etc, prevents the overaccumulation of sterified cholesterol in the cardiomyocytes and/or in the smooth muscle cells of the vascular wall exposed to ischaemia. The invention also relates to the use of said molecules in the treatment and/or prevention of the changes in the metabolism of calcium and cardiac remodelling associated with ischaemia.

(57) **Resumen:** La presente invención se refiere a nuevas moléculas con capacidad de modular uno de los mecanismos que conducen a la deposición masiva de colesterol en el cardiomiocito y/o en las células musculares lisas de pared vascular durante el infarto agudo de miocardio u otras situaciones clínicas que cursan con isquemia. Además la presente invención también demuestra que el bloqueo del LRP1 mediante distintos agentes: un vector de expresión recombinante, un RNAi, un anticuerpo, un siRNA, etc. previene la sobreacumulación de colesterol esterificado en los cardiomiocitos y/o en las células musculares lisas de pared vascular expuestos a isquemia. La presente invención se refiere también al uso de dichas moléculas en el tratamiento y/o prevención de las alteraciones en el metabolismo del calcio y el remodelado cardiaco asociados a isquemia.

WO 2013/001130 A1

## EL LRP1 COMO RECEPTOR CLAVE PARA LA TRANSFERENCIA DE COLESTEROL ESTERIFICADO DESDE LAS LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD (VLDL) AL MIOCARDIO ISQUEMICO.

- 5 La invención tiene interés para el sector farmacéutico y químico, se refiere a nuevas moléculas con capacidad de modular la deposición masiva de colesterol en el cardiomiocito por lo que dichas moléculas tienen aplicación clínica ya que tienen efectos terapéuticos al minimizar las alteraciones cardiacas del infarto agudo de miocardio o la angina de pecho inducidas por dislipemia u otras
- 10 situaciones clínicas que cursan con isquemia.

### ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Durante los procesos isquémicos asociados al infarto agudo de miocardio o la

15 angina de pecho se produce acumulación lipídica en el miocardio. Este hecho se ha observado no solamente en animales de experimentación (Straeter-Knowlen IM *et al*, *Circulation* 1996; Chabowski A *et al*, *FEBS Lett* 2006) sino también en pacientes (Golfbarb JW *et al*, *Radiology* 2009). Además también hay evidencias experimentales que demuestran que la dislipemia contribuye a la exacerbación de

20 las alteraciones cardiacas inducidas por la isquemia en modelos animales (Osipov RM *et al*, *Circulation* 2009; Kim E *et al*, *J Neurosci* 2008). Se ha demostrado recientemente que dosis altas de VLDL alteran la regulación del calcio ( $Ca^{2+}$ ) en los cardiomiocitos y que estas alteraciones inducidas por VLDL se exacerbaban en situación de hipoxia, jugando un papel crucial la proteína del retículo

25 sarcoplasmático SERCA-2 (Castellano J *et al*, *J Mol Cell Cardiol* 2011).

La isquemia como base de la insuficiencia cardiaca se traduce en la patología conocida como cardiomiopatía isquémica. La cardiomiopatía isquémica es con gran frecuencia resultado de la enfermedad coronaria que tiene como patología subyacente la aterosclerosis (Gersh BJ *et al*, revista 1997). La evolución de la

30 placa aterosclerótica produce un desequilibrio progresivo entre la demanda y el aporte de oxígeno en el miocardio. El desenlace más grave del proceso aterosclerótico, el infarto, se debe en un 80% de los casos a la ruptura de la placa aterosclerótica, la formación del trombo y la oclusión total o parcial del vaso (Burke AP *et al*, *Med Clin North America* 2007). La dislipemia es un factor de

riesgo clave en la generación de cardiomiopatías isquémicas principalmente por su papel en el inicio y desarrollo de aterosclerosis. En situación de dislipemia hay un incremento en la entrada de lipoproteínas hacia la íntima arterial donde estas se modifican por oxidación y agregación mediante la interacción con los proteoglicanos que conforman la matriz extracelular (Sartipy P *et al*, *Circ Res* 2000; Hakala JK *et al*, *ATVB* 2001). La captación de lipoproteínas modificadas por células musculares lisas de pared vascular y macrófagos conduce a la formación de células espumosas en la pared vascular. Se ha identificado el receptor “low density lipoprotein receptor-related protein” (LRP1) como receptor clave para la captación de LDL modificadas por agregación y acumulación intracelular de colesterol en células musculares lisas de pared vascular y macrófagos así como para la transformación en células espumosas (Llorente-Cortés V *et al*, *ATVB* 2000; Llorente-Cortés *et al*, *ATVB* 2002; Llorente-Cortés *et al*, *J Lipid Res* 2007, Llorente-Cortés *et al*, *Cardiovasc Res* 2007). El LRP1 está regulado a la alza en lesiones ateroscleróticas avanzadas ricas en lípido (Luoma J *et al*, *J Clin Invest* 1994; Llorente-Cortés *et al*, *Eur J Clin Invest* 2004) y puede considerarse como un biomarcador de enfermedad cardiovascular ya que existen estudios clínicos que demuestran la relación entre las alteraciones en la expresión del LRP1 y la enfermedad coronaria (Handschug K *et al*, *J Mol Med* 1998, Schulz *et al*, *Int J Cardiol* 2003). También se ha demostrado que factores de riesgo tan relevantes para el desarrollo de aterosclerosis como hipercolesterolemia e hipertensión regulan a la alza la expresión de LRP1 en la pared vascular (Llorente-Cortés *et al*, *Circulation* 2002; Sendra J *et al*, *Cardiovas Res* 2008). Posteriormente se ha evidenciado que la captación de LDL agregada por LRP1 regula la expresión y activación del factor tisular, principal activador de la coagulación, y por tanto de formación del trombo mediante un mecanismo dependiente de RhoA y esfingomielina (Llorente-Cortés *et al*, *Circulation* 2004; Camino-López S *et al*, *Cardiovasc Res* 2007; Camino-Lopez S *et al*, *J Thromb Haemost* 2009). Además de en todos estos procesos, se ha descrito que el LRP1 participa en la regulación de la composición de la matriz extracelular (Strickland DK *et al*, *Trends Endocrinol Metab* 2002), puede promover la internalización de receptores (Wu L *et al*, *J Cell Biochem* 2005) y regular la actividad de diferentes proteínas de señalización intracelular (Herz J *et al*, *J Clin Invest* 2001).

En este momento se desconoce por completo el papel del LRP1 en el cardiomiocito y las consecuencias de las alteraciones en su expresión sobre el metabolismo lipídico. Se sabe que la lipoproteína lipasa presente en la superficie de los cardiomiocitos media la captación de LDL. Sin embargo, la lipoproteína lipasa utiliza un receptor no identificado hasta el momento para la captación selectiva de colesterol y no es el receptor clásico de LDL (Yagyu H *et al*, *J Clin Invest* 2003; Yokoyama M *et al*, *J Lipid Res* 2007). También se ha demostrado que el LRP1 media la captación selectiva de colesterol por células vasculares (Llorente-Cortés *et al*, *ATVB* 2006).

10

Los cardiomiocitos acumulan lípido en diferentes condiciones fisiopatológicas y una de ellas es en los procesos de isquemia aguda (Chabowski A *et al*, *FEBS Lett* 2006; Goldfarb JW *et al*, *Radiology* 2009) desconociéndose en gran medida cuales son los mecanismos por los que esto sucede. Uno de los mecanismos que participan en la acumulación de triglicéridos (TG) en situación de isquemia es el incremento en la síntesis endógena de TG por la hipoxia (Boström P *et al*, *ATVB* 2006). Sin embargo, los cardiomiocitos pueden captar lípidos de las lipoproteínas ricas en TG tales como VLDL y quilomicrones. Se sabe que el CD36 y la lipoproteína lipasa participan en la captación de los ácidos grasos de las VLDL por los cardiomiocitos (Bharadwaj KG *et al*, *J Biol Chem* 2010). Dado que el CD36 está incrementado en situación de hipoxia (Mwaikambo BR *et al*, *J Biol Chem* 2009), es plausible que los niveles incrementados de CD36 participen en los acúmulos de TG que se observan en el corazón isquémico. Aunque se sabe que el corazón puede captar colesterol a partir de VLDL (Bharadwaj KG *et al*, *J Biol Chem* 2010) y quilomicrones (Fielding CJ *et al*, *J Clin Invest* 1978), se desconocen por completo los mecanismos que participan en la entrada del colesterol al corazón.

La isquemia está asociada a disfunción electromecánica y a graves alteraciones en la dinámica intracelular del calcio (Garcia-Dorado D *et al*, *Cardiovasc Res* 2006; Takukder MA *et al*, *Cardiovas Res* 2009), claves para la funcionalidad cardiaca. Más aún, se ha demostrado recientemente que los cardiomiocitos expuestos a dosis altas de VLDL sufren acumulación intracelular de lípidos, disminución de la expresión de SERCA-2, de la amplitud de calcio y del contenido

de calcio del retículo sarcoplasmático. Estos efectos se vieron agravados por la exposición de los miocitos cultivados a un ambiente hipóxico. Los resultados ponen de manifiesto el papel protagonista de SERCA-2 en la potenciación por la hipoxia de las alteraciones en el manejo del calcio inducidas por VLDL (Castellano J *et al*, *JMCC* 2011). Recientemente también se ha descrito que el LRP1 está regulado al alza por la hipoxia en células musculares lisas de pared vascular (Castellano J *et al*, *ATVB* 2011). Estos datos revelan la importancia de comprender los mecanismos moleculares involucrados en la captación de lípido por el cardiomiocito en situación de isquemia y la importancia de saber el papel del LRP1 en este proceso.

Por tanto, actualmente existe la necesidad de desarrollar un método para modular los receptores lipoproteícos como LRP1 para tratar y prevenir la acumulación de lípidos neutros como el colesterol esterificado (CE) en los cardiomiocitos durante eventos isquémicos, lo que permitiría minimizar las alteraciones cardiacas del infarto agudo de miocardio o la angina de pecho inducidas por dislipemia u otras situaciones clínicas que cursan con isquemia.

## DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCIÓN

20

La presente invención se refiere a la identificación de un receptor clave para la entrada de colesterol al corazón en situación de isquemia, el LRP1. También se refiere al diseño de moléculas como lentivirus, anticuerpos o factores de transcripción con capacidad de modular la actividad de este receptor y por tanto de prevenir las alteraciones cardiacas asociadas a la entrada de lípidos neutros o colesterol en los cardiomiocitos expuestos a procesos de isquemia aguda, tales como infarto agudo de miocardio o angina de pecho, o bien a procesos de isquemia crónica.

## 30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Actualmente se desconocen por completo los mecanismos que conducen a la acumulación de colesterol en los cardiomiocitos. La presente invención demuestra que en situación de isquemia se produce la regulación a la alza del receptor LRP1

en el cardiomiocito. La sobreexpresión del LRP1 en situación de isquemia juega un papel primordial en la transferencia de colesterol esterificado de las lipoproteínas al cardiomiocito así como en la acumulación intracelular de este lípido en el corazón. Además la presente invención demuestra que la modulación  
5 de la expresión y/o función del LRP1 previene la sobreacumulación de colesterol esterificado en los cardiomiocitos expuestos a isquemia. Por tanto, esta invención aporta nuevas moléculas con capacidad de modular uno de los mecanismos que conducen a la deposición masiva de colesterol en el cardiomiocito durante el infarto agudo de miocardio u otras situaciones clínicas que cursan con isquemia.

10

En la presente invención "infarto agudo de miocardio" hace referencia a un riego sanguíneo insuficiente, con daño tisular, en una parte del corazón producido por una obstrucción en una de las arterias coronarias, frecuentemente por ruptura de una placa de ateroma vulnerable. La isquemia, hipoxia o suministro deficiente de  
15 oxígeno que resulta de tal obstrucción produce la angina de pecho, que si se recanaliza precozmente no produce muerte del tejido cardíaco, mientras que si se mantiene esta anoxia se produce la lesión del miocardio y finalmente la necrosis, es decir, el infarto.

20 En la presente invención se demuestra que en cardiomiocitos expuestos a hipoxia se produce la sobreexpresión del receptor LRP1 en asociación a un incremento en los niveles intracelulares de uno de los lípidos neutros, colesterol esterificado. También se demuestra que la modulación, preferentemente el bloqueo, de la sobreexpresión de LRP1 inducida por hipoxia permite frenar y/o inhibir (parcial o  
25 totalmente) la entrada de colesterol esterificado procedente de lipoproteínas al corazón.

En la presente invención se demuestra que en el corazón de los pacientes con cardiomiopatía isquémica hay una expresión muy elevada del receptor LRP1 y  
30 que la expresión de este receptor se correlaciona de forma muy significativa con el contenido de colesterol esterificado del miocardio. Esto no sucede en pacientes con cardiomiopatía idiopática dilatada o sujetos control. Por tanto, este mecanismo es específico y tiene relevancia solamente en la cardiomiopatía isquémica.

En la presente invención se entiende por “LRP1” el receptor “low density lipoprotein receptor-related Protein”, también denominado  $\alpha$ 2-macroglobulin, CD91, o AI316852. Este receptor se encuentra codificado en *Homo sapiens* por el  
5 gen Mm.271854.

En la presente invención se entiende por “isquemia” o “cardiomiopatía isquémica (ICM)” el conjunto de alteraciones en la funcionalidad del corazón que se presentan cuando las arterias que traen sangre y oxígeno al corazón se bloquean.  
10 Generalmente hay una acumulación de colesterol y otras sustancias, llamada placa, en las arterias que le traen oxígeno al tejido del miocardio. Con el tiempo, el miocardio no trabaja bien y es más difícil para el corazón se llene y bombee sangre. La isquémica es una causa común de insuficiencia cardíaca congestiva. Los pacientes con esta afección pueden en un momento haber tenido un ataque  
15 cardíaco, angina o angina inestable y es posible que unos pocos pacientes no hayan notado ningún síntoma previo. En estos pacientes se ha encontrado lípido en la zona de penumbra (periferia de la zona infartada) desconociéndose en este momento el origen así como los mecanismos que participan en estos acúmulos. Lo que sí se sabe es que este lípido participa en la inducción de graves  
20 alteraciones en el metabolismo del calcio y el remodelado cardiaco, claves en la funcionalidad cardiaca.

En la presente invención se entiende por “cardiomiopatía idiopática dilatada” las enfermedades del músculo cardiaco en las se producen alteraciones en la  
25 estructura y la función del miocardio en ausencia de enfermedad coronaria, hipertensión, valvulopatías o cardiopatías congénitas que expliquen dichas anomalías. Entre las miocardiopatías, la miocardiopatía dilatada (MCD) se define por la presencia de dilatación y disfunción sistólica que afecta al ventrículo izquierdo o a ambos ventrículos.

30

La presente invención hace referencia también a un método para evitar la acumulación de colesterol esterificado en los cardiomiocitos, caracterizado porque la composición farmacéutica comprende al menos un agente modulador de la expresión y/o agente modulador de la función de LRP1. Preferentemente dicho

agente modulador de la expresión y/o de la función de LRP1 se selecciona entre el siguiente grupo: lentivirus, anticuerpo o factor de transcripción. Más preferentemente dicho agente se selecciona de entre el siguiente grupo:

- 5 a) agentes que modulen la expresión de LRP1, a nivel transcripcional tales como factores de transcripción (HIF-1alfa, SREBPs u otros), siRNAs específicos liberados a las células, o moléculas activadoras o inhibidoras de la vía de degradación de LRP1; y/o
- 10 b) agentes que modulen la función de LRP1, tales como moléculas que sean capaces de inhibir específicamente la función de LRP1 en captación de colesterol.

En la presente invención se entiende por “factores de transcripción” definidos en  
15 a), aquellos factores capaces de aumentar o disminuir respectivamente la expresión de LRP1.

En la presente invención se entiende por “siRNAs específicos liberados a las células” definidos en a), aquellos siRNAs para inhibir la expresión de LRP1 que  
20 pueden ser liberados a las células por lentivirus, por anticuerpos, y por otros métodos tales como electroporación ampliamente conocidos en el estado de la técnica.

En la presente invención se entiende por “moléculas activadoras o inhibidoras de  
25 la vía de degradación de LRP1s” definidos en a), aquellas moléculas descritas en el sistema ubiquitin-proteasoma.

En la presente invención se entiende por “moléculas que sean capaces de inhibir específicamente la función de LRP1 en captación de colesterol” definidos en b),  
30 aquellas moléculas, preferentemente proteínas, que pueden competir con LRP1 en la unión de ligandos lipoproteicos. En una realización más preferente de la invención, dichas moléculas previenen la función fisiopatológica del LRP1 sin alterar sus funciones esenciales.



La presente invención hace referencia también a una composición farmacéutica caracterizada por comprender al menos un agente modulador de la expresión y/o agente modulador de la función de LRP1 definido anteriormente, para el control de la expresión de los receptores lipoproteicos como VLDLR, LDLR, o LRP1  
5 durante un infarto agudo de miocardio u otra situación clínica que cursa con isquemia, hipoxia o suministro deficiente de oxígeno, preferentemente la composición farmacéutica se caracteriza por comprender un agente modulador de la expresión y/o agente modulador de la función de LRP1 definido anteriormente para el bloqueo de la expresión de LRP1 durante la isquemia.

10

La presente invención hace referencia también al uso de una composición farmacéutica definida anteriormente para regular la acumulación de lípidos neutros como colesterol esterificado, triglicéridos o colesterol libre en los cardiomiocitos de un paciente con un infarto agudo de miocardio u otra situación  
15 clínica que cursa con isquemia, hipoxia o suministro deficiente de oxígeno como insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía isquémica, o cardiomiopatía idiopática dilatada.

La presente invención hace referencia a un método para regular la acumulación  
20 de lípidos neutros como colesterol esterificado, triglicéridos o colesterol libre, en los cardiomiocitos, caracterizado por la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica para el control de la expresión de los receptores lipoproteicos como VLDLR, LDLR, o LRP1, durante un infarto agudo de miocardio u otra situación clínica que cursa con  
25 isquemia, hipoxia o suministro deficiente de oxígeno, como insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía isquémica, o cardiomiopatía idiopática dilatada.

La presente invención hace referencia también a un método para evitar la acumulación de colesterol esterificado en los cardiomiocitos, caracterizado por la  
30 administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica para el bloqueo de la expresión de LRP1 durante la isquemia, preferentemente el paciente sufre una cardiomiopatía isquémica.

Una realización preferente de la invención hace referencia al uso de la

composición farmacéutica definida en anteriormente para evitar, frenar, inhibir total o parcialmente la acumulación de colesterol esterificado en los cardiomiocitos de un paciente que sufre o ha sufrido una cardiomiopatía isquémica.

5

La presente invención también protege un método de tratamiento y/o prevención de las alteraciones cardiacas asociadas a la entrada de lípidos neutros o colesterol en los cardiomiocitos expuestos a procesos de isquemia aguda, tales como infarto agudo de miocardio o angina de pecho, o bien a procesos de  
10 isquemia crónica.

Por último la presente invención protege el uso de moléculas con capacidad de modular los receptores lipoproteícos como VLDLR, LDLR, o LRP1, en la fabricación de un medicamento para prevenir y/o tratar las alteraciones cardiacas  
15 asociadas a la deposición masiva de lípidos neutros en el cardiomiocito durante el infarto agudo de miocardio u otras situaciones clínicas que cursan con isquemia.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos,  
20 componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIGURA 1. Efecto de la hipoxia en la expresión de LRP1, VLDLR y LDLR por los cardiomiocitos. A)** Los cardiomiocitos HL-1 quiescentes se expusieron a  
30 normoxia o hipoxia durante tiempos crecientes y se analizó la expresión génica de LRP1, VLDLR y LDLR mediante PCR tiempo real. Los datos se procesaron con un "software" que se basa en el cálculo relativo de la concentración de ARNm según el valor Ct (threshold cycle). Los datos se normalizaron por el control endógeno ARBP y se expresaron como la media±SEM de tres experimentos

realizados en duplicado. \* $P < 0.05$  vs cardiomiocitos en normoxia. **B)** Análisis por “western blot” que muestra las bandas de LRP1, VLDLR, y LDLR tanto en HL-1 como en NRVM expuestos a normoxia o hipoxia durante 18-24 horas. Los niveles de  $\beta$ -tubulina y *GAPDH* se mostraron como control de carga de proteína para las 5 células HL-1 y NRVM, respectivamente.

**FIGURA 2. Efecto de VLDL en la expresión de LRP1, VLDLR y LDLR y en la acumulación de lípidos neutros (colesterol libre, esterificado y triglicéridos) en HL-1 expuestos a normoxia o hipoxia.**

10 Los cardiomiocitos quiescentes se expusieron a VLDL bajo condiciones de normoxia o hipoxia. **A)** Análisis por PCR tiempo real de los cambios en la expresión de LRP1, VLDLR y LDLR inducidos por dosis crecientes de VLDL. Los datos se procesaron con un “software” que se basa en el cálculo relativo de la concentración de ARNm según el valor Ct (threshold cycle). Los datos se  
15 normalizaron por el control endógeno *ARBP*. **B)** Se muestra un “western blot” representativo de los niveles de expresión proteica de LRP1, VLDLR, y LDLR en HL-1 expuestos a VLDL (1.8 mM, 18 horas) en normoxia o hipoxia. Los niveles de  $\beta$ -tubulina se muestran como control de carga de proteína. **C)** Cromatografía en capa fina que muestra las bandas de colesterol esterificado (CE), triglicéridos  
20 (TG) y colesterol libre (FC) y diagrama de líneas con la cuantificación de estas bandas en células HL-1 expuestas a normoxia (líneas punteadas) o hipoxia (líneas continuas). Los resultados se muestran como microgramos de CE o TG por miligramo de proteína celular y se expresaron como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados en duplicado. \* $P < 0.05$  vs cardiomiocitos sin VLDL;  
25 # $P < 0.05$  vs cardiomiocitos en normoxia.

**FIGURA 3. Diseño de las secuencias miR RNAi y estudio de su eficiencia para bloquear la expresión de LRP1 en HL-1 y NRVM.**

Análisis de la expresión de ARNm de LRP1 en células HL-1 infectadas con  
30 RNAi1919, RNAi8223 o RNAi8531. Los datos se procesaron con un programa “software” que se basa en el cálculo relativo de la concentración de ARNm según el valor Ct (threshold cycle). Los datos se normalizaron por el control endógeno *ARBP*. Los resultados se expresaron como el porcentaje de expresión respecto a las células infectadas con el control negativo. \* $P < 0.05$  vs células transfectadas

con el control negativo.

**FIGURA 4. Empleo del sistema BLOCK-IT™ RNAi Designer para inhibir la expresión de LRP1 (XM\_001056970) mediante su incorporación en lentivirus utilizados para infectar HL-1 y NRVM. (A)** Generación del vector de expresión miR RNAi mediante el anillamiento de los oligos y ligación en el vector lineal pcDNATM6.2\_GW/miR. **(B)** Transferencia de las construcciones miR RNAi a los vectores pDONR™221 mediante la reacción catalizada por la BP clonasa II. **(C)** Transferencia de la secuencia miRNA del clon pENTR™221 junto con el plásmido pENTR5'-CMV al vector pLenti6.4/R4R2/V5-DEST™ mediante la reacción catalizada por la LR clonasa II.

**FIGURA 5. Efecto de RNAi8531 en la expresión de LRP1 y en la acumulación de CE y TG procedente de VLDL en HL-1 expuestas a normoxia o hipoxia.**

HL-1 transfectadas de forma estable con RNAi8531 o con el control negativo se cultivaron durante 48 horas en presencia de blasticidina. Las células se sometieron a quiescencia durante 24 horas y posteriormente se expusieron a normoxia (N, barras grises) o hipoxia (H, barras negras) **A)** Se muestra un “western blot” representativo de la expresión de LRP1, VLDLR y LDLR en HL-1 infectadas con el control negativo o con miR8531 así como la cuantificación de las bandas correspondientes. Los niveles de  $\beta$ -tubulina se muestran como control de carga de proteína. **B)** Las células HL-1 en quiescencia se expusieron a normoxia o hipoxia durante 24 horas y en las últimas 12 horas se incubaron con VLDL (1.8 mM). Se muestra una cromatografía en capa fina representativa con las bandas de colesterol esterificado (CE), triglicéridos (TG) y colesterol libre (FC) y los histogramas con la cuantificación de las bandas de CE y TG. Los resultados se expresaron como microgramos de lípido por miligramo de proteína y se mostraron como la media $\pm$ SEM de tres experimentos realizados en triplicado.  $P < 0.05$  vs células infectadas con el control negativo. **C)** Las células HL-1 en quiescencia se expusieron a normoxia o hipoxia durante 24 horas y en las últimas 12 horas se incubaron con VLDLs doblemente marcadas radiactivamente (1.8 mM). Se colectaron las células y la captación de colesterol y triglicéridos se evaluó mediante el conteo de dpm de [ $^3$ H] y [ $^{14}$ C] asociadas a los extractos celulares, respectivamente. Los resultados se expresaron como dpm de [ $^3$ H] ó [ $^{14}$ C] por

miligramo de proteína celular. También se determinó el ratio celular [ $^3\text{H}$ ]/ [ $^{14}\text{C}$ ]. Los resultados se expresaron como la media $\pm$ SEM de tres experimentos realizados en triplicado. \* $P < 0.05$  vs HL-1 en normoxia; # $P < 0.05$  vs cardiomiocitos infectados con el control negativo.

5

**FIGURA 6. Efecto de RNAi8531 en la expresión de LRP1 y en la acumulación de CE y TG procedente de VLDL en NRVM expuestas a normoxia o hipoxia.**

NRVM transfectadas transitoriamente con RNAi8531 o con el control negativo se cultivaron durante 48 horas en presencia de blasticidina. Las células se  
10 sometieron a quiescencia durante 24 horas y posteriormente se expusieron a normoxia (N, barras grises) o hipoxia (H, barras negras) **A)** Se muestra un “western blot” representativo de la expresión de LRP1, VLDLR y LDLR en NRVM infectadas con el control negativo o con miR8531 así como la cuantificación de las bandas correspondientes. Los niveles de *GAPDH* se muestran como control de  
15 carga de proteína. **B)** Las células NRVM en quiescencia se expusieron a normoxia o hipoxia durante 24 horas y en las últimas 12 horas se incubaron con VLDL (1.8 mM). Se muestra una cromatografía en capa fina representativa con las bandas de colesterol esterificado (CE), triglicéridos (TG) y colesterol libre (FC) y los histogramas con la cuantificación de las bandas de CE y TG. Los resultados  
20 se expresaron como microgramos de lípido por miligramo de proteína y se mostraron como la media $\pm$ SEM de tres experimentos realizados en triplicado.  $P < 0.05$  vs células infectadas con el control negativo.

**FIGURA 7. Efecto de la isquemia inducida por infarto agudo en la  
25 acumulación de lípidos neutros y en la expresión de receptores lipoproteicos en el miocardio (modelo porcino).** Se obtuvo muestra de zona no-isquémica (remota, barras blancas) e isquémica (penumbra, barras negras) de corazones de cerdos sometidos a infarto (n=6) o controles (n=3, sham) y se congeló en nitrógeno líquido. Una parte de cada muestra se utilizó para extracción

30 lipídica y cromatografía en capa fina y la otra parte para obtener proteína para “western blot”. **A)** Análisis por “western blot” que muestra los niveles de expresión proteica de LRP1 y VLDLR y diagrama de barras mostrando la cuantificación de las bandas. Los niveles de expresión proteica de *GAPDH* se muestran como control de carga. **B)** Cromatografía en capa fina mostrando las bandas de

colesterol esterificado (CE), triglicéridos (TG) y colesterol libre (FC) e histogramas mostrando la cuantificación de las bandas de CE y TG. Los datos se expresaron como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ .  $P < 0.05$  vs miocardio no isquémico o animales sham.

5 **FIGURA 8. Análisis de la expresión de LRP1 en corazones explantados de pacientes con cardiomiopatía idiopática (DCM) o con cardiomiopatía isquémica (ICM) frente a sujetos control (CNT).** **A)** A partir de la proteína obtenida de 50 mg de tejido miocárdico homogeneizado en reactivo TriPure se realizó el análisis por “western blot” de la expresión proteica de LRP1. Los niveles  
10 de GAPH se utilizaron como control de carga. **B)** Imagen representativa del análisis inmunohistoquímico de LRP1 en tejido miocárdico. Magnificación x 240.

**FIGURA 9. Análisis de la expresión de VLDLR en corazones explantados de pacientes con cardiomiopatía idiopática (DCM) o con cardiomiopatía isquémica (ICM) frente a sujetos control (CNT).** **A)** A partir de la proteína  
15 obtenida de 50 mg de tejido miocárdico homogeneizado en reactivo TriPure se realizó el análisis por “western blot” de la expresión proteica de VLDLR. Los niveles de GAPH se utilizaron como control de carga. **B)** Imagen representativa del análisis inmunohistoquímico de VLDLR en tejido miocárdico. Magnificación x  
20 240.

**FIGURA 10. Determinación de los niveles miocárdicos de colesterol esterificado (CE), triglicéridos (TG) y colesterol libre (FC) en corazones explantados de pacientes con cardiomiopatía idiopática dilatada (DCM) o con cardiomiopatía isquémica (ICM) frente a sujetos control (CNT).** A partir  
25 de 5 mg de tejido miocárdico se realizó la extracción lipídica y posterior cromatografía en capa fina **(A)** para determinar los niveles de colesterol esterificado CE **(B)**, triglicéridos (TG) **(C)** y colesterol libre **(D)** (FC). CNT, controles; DCM, cardiomiopatía idiopática dilatada; ICM, cardiomiopatía isquémica. Los resultados se expresaron como microgramos por miligramo de  
30 tejido y se mostraron como  $\text{media} \pm \text{SD}$ .

**FIGURA 11. Correlación entre la expresión de LRP1 y el contenido de colesterol esterificado (CE) en el miocardio de pacientes con insuficiencia**

**cardiaca.** Análisis de la correlación entre la expresión de ARNm de LRP1 (A) o proteica de LRP1 (B) y el contenido de CE del miocardio.

**FIGURA 12. Correlación entre la expresión de VLDLR y el contenido de colesterol esterificado (CE) en el miocardio de pacientes con insuficiencia cardiaca.** Análisis de la correlación entre la expresión de ARNm de VLDLR (A) o proteica de VLDLR (B) y el contenido de CE del miocardio.

**FIGURA 13. Modulación de la expresión del receptor LRP1 por el factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  en cardiomiocitos.** Los cardiomiocitos de la línea HL-1 se transfectaron con siRNA-anti-HIF-1  $\alpha$  o siRNA-random (0.6  $\mu$ mol/L) mediante nucleofección. Las células control se nucleofectaron en ausencia de siRNA. Las células se expusieron a normoxia o hipoxia y se recogieron a las 4 horas para analizar la expresión de HIF-1 $\alpha$  y a las 24 horas para analizar la expresión del LRP1. A) Imagen de "Western blot" representativo y gráfico de barras mostrando la cuantificación de HIF-1 $\alpha$  y LRP1. Los niveles de  $\beta$ -tubulina se muestran como control de carga. Los resultados se expresaron como la media $\pm$ SEM de dos experimentos realizados en triplicado. \* $P$ <0.05 vs. HL-1 en normoxia. B) Cuantificación por PCR tiempo real de la expresión génica de LRP1, VLDLR y LDLR en HL-1 expuestos a normoxia e hipoxia durante 24 horas. Los datos se procesaron con un "software" que se basa en el cálculo relativo de la concentración de ARNm según el valor Ct (threshold cycle). Los datos se normalizaron por el control endógeno *ARBP* y se expresaron como la media $\pm$ SEM de tres experimentos realizados en duplicado. \* $P$ <0.05 vs. HL-1 en normoxia; # vs. "control cells" (células control).

**FIGURA 14. La proteína E3 ubiquitina ligasa CHFR modula la estabilidad de la proteína LRP1 en células musculares lisas de pared vascular humana (CMLV).** Las CMLV se trasfectaron con siRNA-random o siRNA-anti-CHFR y posteriormente se expusieron a lipoproteínas de baja densidad modificadas por agregación (LDLag). A) Gráficas de barras que muestran la cuantificación por PCR tiempo real de los niveles de expresión de ARNm para CHFR. Los datos se procesaron con un "software" que se basa en el cálculo relativo de la

concentración de ARNm según el valor Ct (threshold cycle). Los datos se normalizaron por el control endógeno *gapdh* y se expresaron como la media±SEM de tres experimentos realizados en triplicado. Imagen de “Western blot” (B) representativo de los niveles de expresión proteica y gráfico de barras mostrando la cuantificación de las bandas de LRP1 (C) y CHFR (D) normalizados por los niveles de  $\beta$ -tubulina. \*P<0.05 vs células no expuestas a LDLag. #P<0.05 vs CMLV tratadas con siRNA-random.

**FIGURA 15. Las lipoproteínas de baja densidad modificadas por agregación (LDLag) estabilizan la proteína LRP1 mediante una disminución de la expresión de CHFR y de la ubiquitinación de la cadena citoplasmática en células musculares lisas de pared vascular humana (CMLV).** “Western blot” representativo de la expresión proteica de CHFR (A) y LRP1 (B) y diagrama de barras mostrando la cuantificación de las bandas respectivas normalizando los resultados por  $\beta$ -tubulina. C) Las CMLV control o expuestas a LDLag (100  $\mu$ g/mL, 24 horas) se incubaron con cicloheximida (100  $\mu$ M) durante los tiempos indicados. Los niveles de  $\beta$ -tubulina se mostraron como control de carga. Gráfico de líneas que muestra el porcentaje de expresión proteica después de la adición de cicloheximida. Los resultados se muestran como la media±SEM de dos experimentos independientes realizados en triplicado. D) Los extractos proteicos de CMLV expuestas a LDLag se aplicaron sobre bolas de afinidad con anticuerpo anti-ubiquitina para realizar la inmunoprecipitación de las proteínas ubiquitinadas. Una fracción de los extractos celulares se aplicó sobre bolas unidas a anticuerpos inespecíficos. Posteriormente, se analizó por “Western blot” la proteína LRP1 ubiquitinada. Los “Westerns” se incubaron con anticuerpos anti-ubiquitina demostrándose que la expresión de ubiquitina no se alteraba por el tratamiento con LDLag. \*P<0.05 vs células no expuestas a LDLag.

**FIGURA 16. Efecto de los anticuerpos policlonales en la acumulación intracelular de lípido procedente de LDL modificada por agregación (LDLag) en células musculares lisas de pared vascular humana (CMLV).** Las células CMLV en quiescencia se expusieron a hipoxia durante 18 horas. Posteriormente, se adicionaron al medio de cultivo los anticuerpos policlonales (anti-P1, anti-P2 y



anti-P3) (100 µg/mL). Al cabo de 3 horas se adicionaron al mismo medio de cultivo LDL agregadas (100 µg/mL) y se mantuvieron durante 4 horas más. Se recogieron las células en NaOH, se realizó la extracción lipídica y cromatografía en capa fina. Se muestra una cromatografía en capa fina representativa con las 5 bandas de colesterol esterificado (CE), y colesterol libre (FC) y los histogramas con la cuantificación de las bandas de CE. Los resultados se expresaron como microgramos de lípido por miligramo de proteína y se mostraron como la media±SEM de tres experimentos realizados en triplicado. P<0.05 vs células control.

10

**FIGURA 17. Efecto de los anticuerpos policlonales en la acumulación intracelular de lípido procedente de VLDL en cardiomiocitos HL-1 expuestos a hipoxia.** Las células HL-1 en quiescencia se expusieron a hipoxia durante 24 horas. Posteriormente, se adicionaron al medio de cultivo los anticuerpos policlonales (anti-P1, anti-P2 y anti-P3) (100 µg/mL) y al cabo de 4 horas se 15 adicionaron al mismo medio de cultivo VLDL (75 µg/mL) y se mantuvieron durante 4 horas. Los cardiomiocitos HL-1 se recogieron en NaOH y posteriormente se realizó la extracción lipídica seguida de cromatografía en capa fina. Se muestra una cromatografía en capa fina representativa con las bandas de colesterol 20 esterificado (CE), triglicéridos (TG) y colesterol libre (FC) y los histogramas con la cuantificación de las bandas de CE y TG. Los resultados se expresaron como microgramos de lípido por miligramo de proteína y se mostraron como la media±SEM de tres experimentos realizados en triplicado. P<0.05 vs células control.

25

**BIBLIOGRAFÍA**

- Bharadwaj KG, Hiyama Y, Hu Y, Huggins LA, Ramakrishnan R, Abumrad NA, Shulman GI, Blaner WS, Goldberg IJ. Chylomicron- and VLDL-derived lipids enter the heart through different pathways: *in vivo* evidence for receptor- and non-receptor-mediated fatty acid uptake. *J Biol Chem* 2010;**285**:37976-37986.
- Boström P, Magnusson B, Svensson PA, Wiklund O, Borén J, Carlsson LM, Ståhlman M, Olofsson SO, Hultén LM Hypoxia converts human macrophages into triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;**26**:1871-1876.
- Burke AP, Virmani R. Pathophysiology of acute myocardial infarction *Med Clin North Am* 2007;**91**:553-572.
- 15 Camino-López S, Llorente-Cortés V, Sendra J, Badimon L. Tissue factor induction by aggregated LDL depends on LDL receptor-related protein expression (LRP1) and Rho A translocation in human vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2007;**73**:208-216.
- 20 Camino-López S, Badimon L, González A, Canals D, Peña E, Llorente-Cortés V. Aggregated low density lipoprotein induces tissue factor by inhibiting sphingomyelinase activity in human vascular smooth muscle cells. *J Thromb Haemost* 2009;**7**:2137-2146.
- 25 Castellano J, Farré J, Fernandes J, Bayes-Genis A, Cinca J, Badimon L, Hove-Madsen L, Llorente-Cortés V. Hypoxia exacerbates Ca<sup>2+</sup>-handling disturbances induced by very low density lipoproteins (VLDL) in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**50**:894-902.
- 30 Castellano J, Aledo R, Sendra J, Costales P, Juan-Babot O, Badimon L, Llorente-Cortés V. Hypoxia stimulates Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Expression Through Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;**31**:1411-1420

- Chabowski A, Gorski J, Calles-Escandon J, Tandon NN, Bonen A. Hypoxia-induced fatty acid transporter translocation increases fatty acid transport and contributes to lipid accumulation in the heart. *FEBS letters* 2006;**580**:3617-3623.
- 5 Fielding CJ. Metabolism of cholesterol-rich chylomicrons. Mechanism of binding and uptake of cholesteryl esters by the vascular bed of the perfused rat heart. *J Clin Invest* 1978;**62**:141-51.
- Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inserte J, Agulló L,  
10 Cabestrero A. The end-effectors of preconditioning protection against myocardial cell death secondary to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 2006;**70**:274-85.
- Goldfarb JW, Roth M, Han J. Myocardial fat deposition after left ventricular myocardial infarction: assessment by using MR water-fat separation imaging.  
15 *Radiology* 2009;**253**:65-73.
- Hakala JK, Öörni K, Pentikäinen MO, Hurt-Camejo E, Kovanen PT. Lipolysis of LDL by human secretory phospholipase A(2) induces particle fusion and enhances the retention of LDL to human aortic proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*  
20 2001;**21**:1053-1058.
- Handschug K, Schulz S, Schnürer C, Köhler S, Wenzel K, Teichmann W, Gläser C. Low-density lipoprotein receptor-related protein in atherosclerosis development: up-regulation of gene expression in patients with coronary obstruction. *J Mol Med*  
25 1998;**76**:596-600.
- Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 2001;**108**:779-784.
- 30 Kim E, Tolhurst AT, Qin LY, Chen XY, Febbraio M, Cho S. CD36/fatty acid translocase, an inflammatory mediator, is involved in hyperlipidemia-induced exacerbation in ischemic brain injury. *J Neurosci* 2008;**28**:4661-4670.

- Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Badimon L. Differential role of heparan sulfate proteoglycans on aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells and mouse embryonic fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**:1905-1911.
- 5
- Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Hurt-Camejo E, Martínez-González J, Badimon L. Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**:387-393.
- 10
- Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Sánchez S, Rodríguez C, Badimon L. Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation* 15 2002;**106**:3104-10.
- Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Camino-López S, Llampayas O, Badimon L. Aggregated low-density lipoprotein uptake induces membrane tissue factor procoagulant activity and microparticle release in human vascular smooth muscle 20 cells. *Circulation* 2004;**110**:452-459.
- Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Camino-López S, Costales P, Badimon L. Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in 25 123. human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;**26**:117-123.
- Llorente-Cortés V, Royo T, Juan-Babot O, Badimon L. Adipocyte differentiation-related protein is induced by LRP1-mediated aggregated LDL internalization in human vascular smooth muscle cells and macrophages. *J Lipid Res* 30 2007;**48**:2133-2140.
- Llorente-Cortés V, Royo T, Otero-Viñas M, Berrozpe M, Badimon L. Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein

(LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages. *Cardiovasc Res* 2007;**74**:526-536.

Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Berrozpe M, Badimon L. Intracellular lipid  
5 accumulation, low-density lipoprotein receptor-related protein expression, and cell survival in vascular smooth muscle cells derived from normal and atherosclerotic human coronaries.

Luoma J, Hiltunen T, Särkioja T, Moestrup SK, Gliemann J, Kodama T, Nikkari T,  
10 Ylä-Herttua S. Expression of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1994;**93**:2014-2021.

Mwaikambo BR, Yang C, Chemtob S, Hardy P. Hypoxia up-regulates CD36  
15 expression and function via hypoxia-inducible factor-1- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 2009;**284**:26695-26707.

Osipov RM, Bianchi C, Feng J, Clements RT, Liu Y, Robich MP, Glazer HP, Sodha NR, Sellke FW. Effect of hypercholesterolemia on myocardial necrosis and  
20 apoptosis in the setting of ischemia-reperfusion. *Circulation* 2009;**120**(11 Suppl):S22-30.

Reeder GS, Gersh BJ. Modern management of acute myocardial infarction. *Curr Probl Cardiol.* 1996;21(9):585-667.

25

Sartipy P, Johansen B, Gåsvik K, Hurt-Camejo E. Molecular basis for the association of group IIA phospholipase A(2) and decorin in human atherosclerotic lesions. *Circ Res* 2000;86:707-714.

Schulz S, Birkenmeier G, Schagdarsurengin U, Wenzel K, Müller-Werdan U, Rehfeld D, Süß T, Kabisch A, Werdan K, Gläser C. Role of LDL receptor-related protein (LRP) in coronary atherosclerosis. *Int J Cardiol* 2003;92:137-144.  
30

- Sendra J, Llorente-Cortés V, Costales P, Huesca-Gómez C, Badimon L. Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension. *Cardiovasc Res* 2008;**78**:581-589.
- 5
- Straeter-Knowlen IM, Evanochko WT, den Hollander JA, Wolkowicz PE, Balschi JA, Caulfield JB, Ku DD, Pohost GM., Wolkowicz PE, Balschi JA, Caulfield JB, et al. <sup>1</sup>H NMR spectroscopic imaging of myocardial triglycerides in excised dog hearts subjected to 24 hours of coronary occlusion. *Circulation* 1996;**93**:1464-10 1470.
- Strickland DK, Kounnas MZ. Mechanisms of Cellular Uptake of Thrombin-Antithrombin II Complexes Role of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein as a Serpin-Enzyme Complex Receptor. *Trends Cardiovasc Med.* 15 1997;**7**:9-16.
- Talukder MA, Zweier JL, Periasamy M. Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 2009;**84**:345-352.
- 20 Yagyu H, Chen G, Yokoyama M, Hirata K, Augustus A, Kako Y, Seo T, Hu Y, Lutz EP, Merkel M, Bensadoun A, Homma S, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2003;**111**:419-426.
- 25 Yokoyama M, Seo T, Park T, Yagyu H, Hu Y, Son NH, Augustus AS, Vikramadithyan RK, Ramakrishnan R, Pulawa LK, Eckel RH, Goldberg IJ. Effects of lipoprotein lipase and statins on cholesterol uptake into heart and skeletal muscle. *J Lipid Res* 2007;**48**:646-655.
- 30 Wu L, Gonias SL. The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts. *J Cell Biochem* 2005;**96**:1021-33.

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

### 10 EJEMPLO 1- EFECTO DE LA HIPOXIA EN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES LIPOPROTEÍCOS POR EL CARDIOMIOCITO

Los cardiomiocitos adultos HL-1 o neonatales de rata (NRVM) se expusieron a condiciones de normoxia o hipoxia. Se analizó la expresión de LRP1, receptor de VLDL (VLDLR) y receptor clásico de LDL (LDLR) a nivel de ARNm mediante PCR por tiempo real y a nivel de proteína mediante análisis por "western blot" (Figura 1)

Se observó que en cardiomiocitos en normoxia, los niveles de expresión de LRP1 y VLDLR eran muy bajos mientras que los del LDLR eran muy altos especialmente en cardiomiocitos adultos HL-1. Este patrón de expresión se alteró completamente por exposición de los cardiomiocitos a hipoxia. Tal como se observa en la Figura 1A, la hipoxia indujo de forma tiempo-dependiente la expresión de LRP1 (desde 1.6 veces a las 4 horas hasta 2.7 veces a las 16 horas) y también la del VLDLR (desde 2.8 veces a las 4 horas hasta 4-veces a las 16 horas) mientras que disminuyó la expresión del receptor clásico de LDL (desde un 10% a las 4 horas hasta un 34% a las 16 horas). A las 24 horas, la expresión de los receptores LRP1 y VLDLR se vio aumentada significativamente mientras que la del LDLR se vio disminuida por la hipoxia tanto en HL-1 como en NRVM (Tabla 1). Al igual que se observó por PCR, los resultados del "western blot" demostraron que la hipoxia aumentaba la expresión de LRP1 y VLDLR mientras que disminuía la del receptor clásico de LDL en los dos tipos celulares estudiados (Figura 1B).

**Tabla 1. Efecto de la hipoxia en la expresión génica de receptores lipoproteicos en cardiomiocitos**

	HL-1		NRVM	
	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia
LRP1	0.8±0.2	3.5±0.2*	1.2±0.2	3.1±0.9*
VLDLR	3.2±0.5	15±2*	0.6±0.07	1.8±0.34*
LDLR	225±31	91±4*	0.8±0.2	0.4±0.1*

Los cardiomiocitos HL-1 y NRVM se expusieron a normoxia o hipoxia durante 24 horas. Se determinaron los niveles de expresión de ARNm de LRP1, VLDLR y LDLR mediante PCR por tiempo real. Los datos se procesaron mediante un programa basado en el valor Ct y se normalizaron por la expresión del control endógeno *ARBP*. Los resultados se expresaron como la media±SEM de tres experimentos realizados en duplicado. \* $P < 0.05$  vs células expuestas a condiciones de normoxia.

## **EJEMPLO 2 - EFECTO DE VLDL EN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES LIPOPROTEICOS (LRP1, VLDLR Y LDR) Y EN LA ACUMULACIÓN DE LIPIDOS NEUTROS (CE, TG y FC) EN HL-1 EXPUESTOS A NORMOXIA O HIPOXIA.**

Se recogieron las células expuestas a VLDL en normoxia o hipoxia y se realizó el estudio de la expresión de receptores lipoproteicos y determinación del lípido intracelular. Los resultados de la Figura 2A demostraron que VLDL todas las dosis testadas inhibía la expresión de LDLR ARNm en células normóxicas o hipóxicas y que la dosis más alta de VLDL incrementaba la expresión de LRP1 en HL-1 hipóxicas. La expresión del VLDLR no se alteró significativamente por la presencia de VLDL. El análisis por "western blot" (Figura 2B) confirmó los resultados obtenidos a nivel de ARNm también a nivel de proteína. Los experimentos de cromatografía en capa fina (Figura 2C) demostraron que la VLDL inducía la acumulación lipídica intracelular de forma dosis de VLDL dependiente desde 6.7±2.2 hasta 77.6±8.8 µg CE/mg proteína celular y desde 2.5±0.2 hasta 69.17±3.0 µg TG/mg proteína celular. La hipoxia incrementó significativamente dicha acumulación a todas las dosis testadas de VLDL (i.e a 3.6mM, hasta 110.52±1.6 µg CE/mg proteína celular o hasta 80.54±3.85 µg TG/mg proteína celular.

Para analizar la viabilidad de los cultivos, analizamos los niveles celulares de un marcador de supervivencia (Bcl2) y un marcador de apoptosis (BAX). Ni la VLDL ni la hipoxia alteraron los niveles de BAX. Sin embargo, se produjo una reducción de los niveles de Bcl2 desde 5.39±0.35 hasta 4.48±0.18 por VLDL (1.8 mM, 18



horas), hasta  $3.32 \pm 0.13$  por hipoxia (18 horas) y hasta  $2.85 \pm 0.01$  por VLDL (1.8 mM) e hipoxia (18 horas). Estos resultados demuestran que nuestras condiciones experimentales no inducen apoptosis aunque si reducen la capacidad de supervivencia de las células HL-1 en cultivo.

5

**Tabla 2. Efecto de VLDL e hipoxia en la apoptosis de HL-1**

Bcl2			BAX		Bcl2/BAX	
VLDL (mM)	normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia
0	$5.4 \pm 0.4$	$3.3 \pm 0.1\#$	$10.4 \pm 0.1$	$11.3 \pm 0.6\#$	0.5	0.3
1.8	$5.0 \pm 0.20$	$3.3 \pm 0.2\#$	$9.4 \pm 0.5$	$10.9 \pm 0.4\#$	0.5	0.3
3.6	$4.5 \pm 0.2^*$	$2.9 \pm 0.1^*\#$	$11.1 \pm 0.6$	$12.2 \pm 0.4^*$ #	0.4	0.2

10 Los cardiomiocitos HL-1 se expusieron a dosis crecientes de VLDL bajo condiciones de normoxia o hipoxia durante 16 horas. Se determinó la expresión génica de Bcl2, BAX y CPP32 mediante PCR tiempo real. Los datos se procesaron mediante un programa basado en el valor Ct y se normalizaron por la expresión del control endógeno *ARBP*. Los resultados se expresaron como la  
15  $\text{media} \pm \text{SEM}$  de cuatro experimentos realizados en duplicado. \* $P < 0.05$  vs células incubadas en ausencia de VLDL; # $P < 0.05$  vs células expuestas a condiciones de normoxia.

### 20 EJEMPLO 3 – DISEÑO DE LENTIVIRUS PARA INHIBIR LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR LRP1.

A) Se diseñaron distintas secuencias miR RNAi utilizando el sistema de Invitrogen BLOCK-IT™ RNAi Designer para inhibir la expresión de LRP1 (XM\_001056970) mediante su incorporación en lentivirus utilizados para infectar HL-1 y NRVM: las secuencias SEQ ID No: 1 y SEQ ID No: 2 se diseñaron para inhibir la expresión  
25 de LRP1 (miR RNAi-XM\_001056970\_1919 o RNAi1919 (SEQ ID No. 16)); las secuencias SEQ ID No: 3 y SEQ ID No: 4 se diseñaron para inhibir la expresión de LRP1 (miR RNAi-XM\_001056970\_8223 o RNAi8223 (SEQ ID No. 17)); y las secuencias SEQ ID No: 5 y SEQ ID No: 6 se diseñaron para inhibir la expresión de LRP1 (miR RNAi-XM\_001056970\_8531 o RNAi8531 (SEQ ID No. 18)).

30 El plásmido pcDNA™ 6.2-GW/miR se utilizó como control negativo en todos los experimentos de transfección: las SEQ ID No: 7 y SEQ ID No: 8 se diseñaron

para el control negativo universal (pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/miR-neg).

**B)** Análisis de la expresión de ARNm de LRP1 en células HL-1 infectadas con RNAi1919 (SEQ ID No. 16), RNAi8223 (SEQ ID No. 17) o RNAi8531 (SEQ ID No. 5 18) (Figura 3). Los datos se procesaron con un programa “software” que se basa en el cálculo relativo de la concentración de ARNm según el valor Ct (threshold cycle). Los datos se normalizaron por el control endógeno *ARBP*. Los resultados se expresaron como el porcentaje de expresión respecto a las células infectadas con el control negativo. \**P*<0.05 vs células transfectadas con el control negativo. 10 Se emplea también la SEQ ID No: 9 sintetizada artificialmente para ser usada como vector pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW.

BLOCK-IT<sup>TM</sup> RNAi Designer es una herramienta de la “web” que permite diseñar y encargarse oligonucleótidos siRNA o miRNA específicos contra secuencias diana 15 concretas. Después de introducir la secuencia diana en el programa y fijar una serie de parámetros restrictivos, el programa genera varios diseños de RNAi que quedan ordenados según su probabilidad de eficiencia en inhibir la expresión del gen diana. En nuestro caso el programa ha generado tres secuencias con capacidad para inhibir el gen LRP1 [RNAi1919 (SEQ ID No. 16), RNAi8223 (SEQ 20 ID No. 17) o RNAi8531 (SEQ ID No. 18)] además del control negativo (pcDNA<sup>TM</sup>-GW/miR\_neg). El plásmido pcDNA<sup>TM</sup>-GW/miR\_neg contiene un inserto que forma una estructura “hairpin” que se procesa en una forma de miRNA madura que es incapaz de unirse a ninguno de los genes conocidos en vertebrados. Por tanto, este plásmido sirve como control negativo para los experimentos de “knockdown” 25 realizados con vectores de expresión pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/miR. Para generar el vector de expresión miR RNAi se anillaron los oligos y se ligaron en el vector lineal pcDNA<sup>TM</sup>6.2\_GW/miR (SEQ ID No. 10) (Figura 4A). Posteriormente, se transformaron células competentes *E.Coli* con el DNA ligado y se seleccionaron las células en medio LB suplementado con 50 µg/mL de espectinomicina. 30 Posteriormente, se transfirieron las construcciones miR RNAi a los vectores pDONR<sup>TM</sup>221 (SEQ ID No. 11) mediante la reacción catalizada por la BP clonasa II (Figura 4B). Entonces se transfirió la secuencia miRNA del clon pENTR<sup>TM</sup>221 (SEQ ID No. 12) junto con el plásmido pENTR5'-CMV (Invitrogen) al vector pLenti6.4/R4R2/V5-DEST<sup>TM</sup> (SEQ ID No. 23) mediante la reacción catalizada por

la LR clonasa II (Figura 4C). Se transformaron las células competentes *E.coli* con el vector de expresión recombinante y se seleccionaron las células en LB suplementado con ampicilina.

En la presente invención, se entiende por “vector de expresión recombinante” un pequeño plásmido que contiene un lugar de clonaje múltiple flanqueado por una o dos secuencias promotores, como pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-V5-MSGW/miR (Life Technologies (Invitrogen)). Estos promotores se requieren para transcribir los fragmentos de DNA insertados en el lugar de clonaje múltiple. En este caso la secuencia de DNA insertada se refiere a las secuencias RNAi previamente descritas.

Se picaron colonias y se cultivaron durante la noche en medio LB con ampicilina. Se realizó la digestión con Hind para comprobar que se había producido una recombinación correcta. Los lentivirus (pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW/miR-XM-001056970-1919 (SEQ ID No. 21); pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW/miR-XM-001056970-8223 (SEQ ID No. 24); pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW/miR-XM-001056970-8531 (SEQ ID No. 20); pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW/miR-neg (Life Technologies (Invitrogen)) se utilizaron para transfectar los cardiomiocitos. Se determinó la capacidad de estas secuencias para inhibir la expresión de ARNm de LRP1 mediante PCR tiempo real. Se observó que pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW/miR-XM-001056970-1919 (SEQ ID No. 21) y pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW/miR-XM-001056970-8531 (SEQ ID No. 20) tenían la capacidad de inhibir la expresión de ARNm de LRP1 en cardiomiocitos hipóxicos en aproximadamente un 50% (Figura 3). Se seleccionó pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW/miR-XM-001056970-8531 (SEQ ID No. 20) para transfectar de forma estable HL-1 y transitoriamente NRVM. Otro ejemplo de cómo inhibir la expresión de LRP1 en el cardiomiocito podría ser la utilización de alelos recombinantes “floxed” y la recombinación mediada por Cre- que resultaría en la delección de parte del promotor del LRP1 incluyendo el sitio del inicio de la transcripción.

Otros ejemplos de cómo inhibir la expresión de LRP1 sería mediante la modulación de los niveles nucleares de factores de transcripción con capacidad de modular la expresión de LRP1. En concreto nuestro grupo ha publicado que la actividad transcripcional de LRP1 se modula negativamente por los factores de transcripción SREBP (Llorente-Cortés V *et al*, *Circulation* 2002; Llorente-Cortés V

*et al*, *J Mol Biol* 2006; Costales P *et al*, *Atherosclerosis* 2010) y positivamente por HIF-1 $\alpha$  (Castellano J *et al*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011) en células musculares lisas de pared vascular. Por lo tanto, es muy probable que la sobreexpresión de SREBP y la inhibición de HIF-1 $\alpha$  sean estrategias a  
5 considerar en la inhibición de la regulación a la alza de LRP1 por hipoxia en los cardiomiocitos. Pero además de todas estas estrategias enfocadas a prevenir la regulación a la alza de LRP1 inducida por hipoxia, quizás sea más interesante desde el punto de vista farmacológico por afectar en menor grado la función fisiológica de LRP1 inhibir específicamente la capacidad de LRP1 de transferir  
10 colesterol desde las lipoproteínas aterógenicas a los cardiomiocitos en situación por ejemplo de dislipemia. Para ello es sin duda imprescindible el desarrollo de moléculas que puedan impedir o dificultar la capacidad de LRP1 de transferir colesterol al cardiomiocito cuando se produce una situación de isquemia y más aun si el paciente es dislipémico. En este sentido hemos transfectado de forma  
15 estable células COS con capacidad de secretar minireceptores de LRP1, moléculas que podrían ser eficaces compitiendo con el LRP1 celular por la unión de lipoproteínas.

**EJEMPLO 4 – EFECTO DE LA DEFICIENCIA CELULAR DE LRP1 EN LA  
20 TRANSFERENCIA DE COLESTEROL ESTERIFICADO Y TRIGLICÉRIDOS DESDE VLDL A CARDIOMIOCITOS EXPUESTOS A NORMOXIA O HIPOXIA.**

RNAi8531 (SEQ ID No. 18) redujo la expresión proteica de LRP1 en un 50.7 $\pm$ 1.14% en HL-1 (Figura 5A) y en un 40.6 $\pm$ 1.8% (Figura 6A) en NRVM respecto a las mismas células transfectadas con el control negativo. Sin embargo,  
25 RNAi8531 (SEQ ID No. 18) no tuvo ningún efecto sobre la baja expresión proteica de LRP1 en normoxia. No se encontraron diferencias en la expresión proteica de VLDLR o LDLR entre células transfectadas con control negativo o RNAi8531 (SEQ ID No. 18) independientemente de que estuviesen expuestas a normoxia o hipoxia. Por tanto, con esta metodología obtuvimos cardiomiocitos  
30 específicamente deficientes en la expresión del receptor LRP1. Estudiamos entonces el efecto de VLDL en la acumulación intracelular de CE y TG en cardiomiocitos deficientes en LRP1 expuestos a normoxia e hipoxia respecto a los control. Nuestros resultados demostraron que la “overacumulación”

(sobreacumulación) de CE inducida por hipoxia en HL-1 (Figura 5B) y NRVM (Figura 6B) se prevenía completamente en las células deficientes en LRP1. Sin embargo, la overacumulación intracelular de TG inducida por hipoxia fue similar en las células deficientes en LRP1 que en las células control. Estos resultados sugieren que la deficiencia de LRP1 afectaba específicamente a la captación de CE de las VLDL y que por tanto las vías de captación de colesterol y triglicéridos por los cardiomiocitos podrían ser independientes. Para estudiar la captación de CE y TG de forma específica, se expusieron los cardiomiocitos a VLDL en las que el componente colesterol y el componente triglicéridos se marcaron con dos isótopos radiactivos diferentes. Se marcó el CE de las VLDL con [ $^3\text{H}$ ] y los TG con [ $^{14}\text{C}$ ]. La actividad específica del [ $^3\text{H}$ ] fue de  $439\pm 54$  y la del [ $^{14}\text{C}$ ] de  $87\pm 15$  dpm/mg proteína. Nuestros resultados demostraron que la deficiencia de LRP1 prevenía completamente el incremento en la captación de CE (2.3-veces) inducido por hipoxia (Figura 5C). Sin embargo el incremento en la captación de TG inducido por la hipoxia (1.3 veces) fue similar en células control y deficientes en LRP1 (Figura 5C). La relación [ $^3\text{H}$ ]/ [ $^{14}\text{C}$ ] fue  $5\pm 0.8$  en las VLDL doblemente marcadas mientras que en las células HL-1 esta relación fue de  $1.04\pm 0.19$  indicando que la captación de [ $^3\text{H}$ ] por células HL-1 en normoxia es muy baja. La hipoxia incrementó dos veces la captación de [ $^3\text{H}$ ] en células control pero no en las deficientes en LRP1. Por lo tanto, estos resultados demuestran que el LRP1 ejerce un papel crucial en la captación selectiva de colesterol esterificado por los cardiomiocitos expuestos a hipoxia y que el bloqueo de este receptor tiene una repercusión clara en la acumulación de colesterol esterificado en los cardiomiocitos. Dado que las VLDL son una de las principales fuentes de colesterol para el corazón, el bloqueo de LRP1 podría ser clave para reducir el aporte de colesterol al corazón isquémico sin altera el aporte de triglicéridos.

#### **EJEMPLO 5 – EFECTO DE LA ISQUEMIA INDUCIDA POR INFARTO AGUDO EN LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDO EN EL CORAZÓN.**

Se utilizó el modelo experimental de infarto agudo de miocardio en modelo porcino previamente descrito (Vilahur G *et al*, *J Moll Cell Cardiol* 2011; Vilahur G *et al*, *J Thromb Haemost* 2009). Evaluamos el efecto de la hipoxia en la acumulación de lípidos neutros (CE, TG y FC) y en la expresión de receptores

lipoproteicos (LRP1 y VLDLR) en la zona no isquémica (zona remota del miocardio) y en la zona isquémica (zona de penumbra o perinecrotica). El patrón de lípidos se determinó mediante la extracción lipídica de las muestras y posterior cromatografía en capa fina. Se demostró que los niveles de colesterol esterificado y los de triglicéridos estaban incrementados 2 y 3-veces respectivamente en el miocardio isquémico vs el no isquémico o el miocardio control (Figura 7A). El nivel de colesterol libre no varió entre miocardio isquémico y no-isquémico o control. También se determinaron los niveles de expresión de los diferentes receptores lipoproteicos mediante análisis por "western blot". Se observó que la expresión proteica del LRP1 estaba aumentada 5.7 veces en el miocardio isquémico vs el no isquémico o control,  $P < 0.05$ . También se observó un aumento de la expresión proteica del VLDLR en la zona isquémica aunque mucho más moderado (2-veces) (Figura 7B). Estos resultados demuestran que en un proceso de isquemia aguda como la inducida por el infarto agudo de miocardio se produce un incremento muy significativo en la expresión de LRP1 en la zona de penumbra del miocardio concomitantemente a un incremento en el contenido de lípidos neutros.

**EJEMPLO 6 – ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES LIPOPROTEICOS EN MUESTRAS DE MIOCARDIO PROCEDENTES DE SUJETOS CONTROL, PACIENTES CON CARDIOMIOPATÍA IDIOPÁTICA DILATADA O CON CARDIOMIOPATIA ISQUÉMICA.**

Se seleccionaron un total de 55 corazones humanos explantados procedentes de 26 pacientes con cardiomiopatía idiopática dilatada (DCM) y de 29 pacientes con cardiomiopatía isquémica (ICM) (Tabla 3). Como controles se utilizaron corazones de 4 personas sanas que fallecieron en accidente de tráfico y sus corazones no pudieron ser utilizados para trasplante.

**Tabla 3. Características de los pacientes de acuerdo con la etiología de la insuficiencia cardiaca**

Cardiomiopatía	dilatada (DCM) (n=26)	isquémica (ICM) (n=29)	<i>P</i>
Edad (years)	56±3	54±3	0.566
Género (hombres/mujeres) (%)	86/14	93/1	
NYHA (%)	clase III = 79 clase IV = 21	clase III = 47 clase IV = 53	
Colesterol plasma (mmol/L)	4.49±0.29	3.89±0.28	0.833
GPPD (mm)	73.60±5.43	67.60±2.84	0.043
FE (%)	20.20±2.66	25.00±2.48	0.779

**Coronariografía**

1 vaso (%)	7	27	
2 vasos (%)	0	7	
3 vasos (%)	0	53	

Los valores se expresaron como media±SD par alas variables continuas y como porcentaje de pacientes en las variables categóricas. GPPD: grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole; FE: fracción de eyección. DCM, cardiomiopatía dilatada; ICM, cardiomiopatía isquémica.

La muestra miocárdica (25 mg) obtenida de corazones explantados se pulverizó y se homogeneizó en el reactivo TriPure. Se determinó la expresión génica y proteica de los receptores lipoproteicos LRP1, VLDLR y LDLR mediante PCR tiempo real y análisis por "western blot" respectivamente.

**Tabla 4. Expresión génica de los receptores lipoproteicos en el miocardio en insuficiencia cardiaca dependiendo de la etiología**

	Control (n=4)	DCM (n=26)	ICM (n=29)
<b>LRP1</b>	9.53±3.14	7.65±3.45	12.33±11.53*#
<b>VLDLR</b>	28.85±9.66	22.01±12.04	27.30±14.92
<b>LDLR</b>	11.14±10.90	3.19±1.94*	3.75±4.57*

El tejido miocárdico congelado (25 mg) se pulverizó y se homogeneizó en el reactivo de TriPure. was pulverized and homogenized in TriPure isolation reagent. Se determinó la expresión génica de LRP1, VLDLR and LDLR mediante PCR tiempo real. Los datos se procesaron mediante un programa basado en el valor Ct y se normalizaron por la expresión del control endógeno *18srRNA*. controls; DCM, cardiomiopatía dilatada; ICM, cardiomiopatía isquémica. Los datos se expresaron como la media±SD. \* $P < 0.05$  vs controles, # $P < 0.05$  vs DCM.

Comparando con la expresión en corazones DCM y controles, los corazones de pacientes ICM mostraron niveles incrementados de LRP1 tanto a nivel de mRNA  
 5 (12.33±11.53 vs 7.65±3.45 o 9.53±3.14,  $P < 0.05$ ) (Tabla 4) como de proteína  
 (22.27±20.66 vs 8.64±7.22 o 6.11±0.74,  $P < 0.05$ ) (Figura 8A). Estos resultados se  
 corroboraron además por inmunohistoquímica (Figura 8B) Por el contrario, la  
 expresión de VLDLR a nivel proteico se incrementó por la cardiomiopatía  
 independientemente de la etiología de la misma (ICM: 15.48±10.61 y  
 10 DCM: 11.64±4.90 vs CNT: 3.68±2.98,  $P = 0.05$  y  $P = 0.01$ , respectivamente) (Figura  
 9A). Los resultados de inmunohistoquímica confirmaron la falta de diferencias en  
 la expresión de VLDLR entre miocardio de pacientes DCM e ICM (Figura 9B). El  
 receptor de LDL disminuyó en situación de cardiomiopatía independientemente de  
 la etiología de la misma (ICM: 3.75±4.57 y DCM: 3.19±1.94 vs 11.14±10.90,  
 15  $P = 0.016$  y  $P = 0.012$ , respectivamente) (Tabla 4).

#### **EJEMPLO 7 – ANÁLISIS DEL NIVEL DE LÍPIDOS NEUTROS EN MUESTRAS DE MIOCARDIO PROCEDENTES DE SUJETOS CONTROL, PACIENTES CON CARDIOMIOPATÍA IDIOPÁTICA DILATADA (DCM) O CON CARDIOMIOPATIA ISQUÉMICA (ICM).**

Los resultados de cromatografía en capa fina (Figura 10A) demostraron que el miocardio de los pacientes con ICM tenía niveles superiores de CE que el de los pacientes con DCM o los controles (92.2±68.3 vs 49.7±9.9 o 39.0±1.8,  $P = 0.05$ )



(Figura 10B). Aunque el nivel de TG fue superior en el miocardio de pacientes con DCM o ICM respecto a controles ( $111.3 \pm 60.7$  y  $100.2 \pm 44.4$  vs  $50.8 \pm 39.4$ ,  $P=0.05$  y  $P=0.04$ ) (Figura 10C), no se observaron diferencias significativas entre estos dos grupos de pacientes. No hubo diferencias en el contenido de colesterol libre de los corazones procedentes de los distintos grupos estudiados (Figura 10D). Se encontró que la expresión miocárdica de LRP1 correlacionaba muy significativamente y positivamente con el contenido de CE tanto a nivel de ARNm ( $R^2=0.69$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 11A) como de proteína ( $R^2=0.66$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 11B). En mucho menor grado que el LRP1, la expresión miocárdica de VLDLR también correlacionó positivamente con el contenido de CE a nivel de ARNm ( $R^2=0.32$ ,  $P=0.03$ ) (Figura 12A) y a nivel de proteína ( $R^2=0.27$ ,  $P<0.01$ ) (Figura 12B). La correlación entre LRP1 o VLDLR y contenido en colesterol esterificado en el corazón se observó específicamente en el grupo de la cardiomiopatía isquémica (Tabla 5).

15

**Table 5. Correlaciones entre la expresión de receptores lipoproteicos y el contenido miocárdico de colesterol esterificado dependiendo de la etiología de la insuficiencia cardíaca.**

	DCM (n=10)		ICM (n=13)	
	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P
ARNm LRP1	0.012	0.075	0.74	<0.0001
Proteína LRP1	0.032	0.65	0.78	<0.0001
ARNm VLDLR	0.001	0.93	0.27	0.05
Proteína VLDLR	0.031	0.63	0.33	0.05

DCM: cardiomiopatía dilatada; ICM: cardiomiopatía isquémica

### **EJEMPLO 8. LA HIPOXIA NO INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE LRP1 EN CARDIOMIOCITOS SILENCIADOS PARA LA EXPRESIÓN DE HIF-1 ALFA.**

Para estudiar el papel de HIF-1 alfa en la regulación al alza del LRP1 por la hipoxia, se inhibió la expresión de HIF-1alfa con un siRNA específico (Applied Biosystems, siRNA ID 4390815) mediante nucleofección. siRNA-anti HIF-1alfa

pero no siRNA random previno completamente el incremento de la proteína HIF-1alfa (3.8 veces) inducido por la hipoxia (Figura 13A, panel izquierdo) en cardiomiocitos HL-1. La hipoxia no ejerció ningún efecto sobre la expresión proteica de LRP1 en cardiomiocitos HL-1 deficientes en HIF-1 alfa (Figura 13A, 5 panel derecho) pero si que incrementó significativamente la expresión de LRP1 en HL-1 control y transfectadas con siRNA-random. Como se muestra en la Figura 13B, los resultados de PCR tiempo real demostraron que la inhibición de HIF-1 alfa previene eficientemente la regulación al alza de los receptores LRP1 y VLDLR inducidas por la hipoxia. Por el contrario, la inhibición de HIF-1 alfa no 10 ejerció ningún efecto en la supresión del receptor clásico de LDL (LDLR) inducida por hipoxia.

**EJEMPLO 9. LA PROTEÍNA UBIQUITINA LIGASA E3 CHFR MODULA LA ESTABILIDAD DE LA PROTEINA LRP1 Y MEDIA EL EFECTO DE LAS 15 LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD MODIFICADAS POR AGREGACIÓN EN LA UBIQUITINACIÓN DE LA CADENA BETA DEL RECEPTOR LRP1.**

Para conocer el efecto de la proteína CHFR en los niveles de proteína de LRP1, se silenció la expresión proteica de CHFR mediante siRNA específicos por nucleofección. Como se observa en la Figura 14A, tanto siRNA-CHFR (Applied 20 Biosystems, siRNA ID s 31393) como LDLag (100 µg/mL) disminuyeron la expresión de ARNm para CHFR en un 70% y un 50%, respectivamente. Cuando siRNA-CHFR y LDLag se adicionaron conjuntamente al medio de cultivo, la expresión de ARNm de CHFR se redujo hasta un 30%. De acuerdo con estos resultados, el análisis por “Western blot” demostró que los niveles proteicos de 25 CHFR se redujeron en un 56% por LDLag, en un 39% mediante siRNA-CHFR y en un 27% por el tratamiento conjunto (Figura 14B & Figura 14C). Concomitantemente con la reducción de CHFR se observó un incremento significativo de la expresión de LRP1 por LDLag (1.72-veces) por siRNA-CHFR (en 1.9-veces) y por los dos tratamientos (2.26-veces) (Figura 14B & Figura 14D). 30 Como se observa en la Figura 15A, la LDLag (100 µg/mL, 20 horas) redujo la expresión proteica de CHFR en un 33% y aumentó la expresión de LRP1 en 2.5 veces. La disminución de la expresión de CHFR por LDLagregada (LDLag) dio lugar a una disminución en la ubiquitinación de la cadena beta del LRP1 (Figura 15B) y a un incremento en la vida media de la proteína LRP1 (Figura 15C).

**EJEMPLO 10. LOS ANTICUERPOS ANTI-P2 Y ANTI-P3 DISMINUYEN LA ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE COLESTEROL ESTERIFICADO PROCEDENTE DE LA CAPTACIÓN DE LDL MODIFICADA POR AGREGACIÓN EN CÉLULAS VASCULARES EN HIPOXIA.** Como se muestra en la Figura 16, los anticuerpos anti-P2 y anti-P3 fueron capaces de competir con las LDL modificadas por agregación y de inhibir significativamente la acumulación de colesterol esterificado procedente de la captación de LDLag. Anti-P2 y anti-P3, disminuyeron la acumulación intracelular de colesterol esterificado en un 50% y en un 30%, respectivamente, en CMLV en hipoxia.

**EJEMPLO 11. LOS ANTICUERPOS ANTI-P1 DISMINUYEN LA ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE COLESTEROL ESTERIFICADO PROCEDENTE DE LA CAPTACIÓN DE VLDL EN CARDIOMIOCITOS HIPÓXICOS.** Como se muestra en la Figura 17, los anticuerpos anti-P1 fueron capaces de competir con VLDL y de inhibir significativamente la acumulación intracelular de colesterol esterificado procedente de la captación de VLDL en un 56% en cardiomiocitos HL-1 hipóxicos.

**EJEMPLO 12.**

**HITO I. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y MOLÉCULAS DE PEQUEÑO TAMAÑO PARA SU APLICACIÓN EN MODELOS *IN VIVO* DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO**

Sobre la base de los anticuerpos policlonales obtenidos según el procedimiento descrito en esta memoria, se obtienen anticuerpos monoclonales y moléculas de pequeño tamaño con capacidad de inhibir la captación del colesterol de las VLDL por los cardiomiocitos en modelos *in vivo*.

Para la realización de este trabajo se cuenta con la colaboración de la Unidad de Producción de Anticuerpos de la Universidad Autónoma de Barcelona (Responsable: Antoni Iborra), también se realiza la purificación de estos anticuerpos para eliminar las endotoxinas y poder suministrar estos anticuerpos en el modelo *in vivo*.

## HITO II. PAPEL DE LA INHIBICIÓN DEL RECEPTOR LRP1 EN CARDIOPROTECCIÓN EN MODELOS *IN VIVO* DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO.

5 Se estudia el efecto de las moléculas desarrolladas en el hito I en:

Ila. Cultivos celulares de cardiomiocitos.

Ilb. Modelos *in vivo* de infarto agudo de miocardio: ratón y cerdo.

10 El hito II se desarrolla en su totalidad en El Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC) provisto de los laboratorios, equipos y personal científico especializado para desarrollar las siguientes procedimientos experimentales: cultivos celulares, estabulario, plataforma de Genómica, laboratorio de Proteómica, Microscopio Confocal con Scanner de Resonancia,  
15 Plataforma de Inmunocitología e Inmunohistoquímica y Plataforma de Citometría de Flujo.

\*Cada una de estas plataformas tiene un investigador (Doctor) como responsable. En este centro cuentan con las plataformas y metodología adecuadas para realizar la mayor parte de los estudios. La mayor parte de las técnicas que se  
20 requieren están ya puestas a punto y han sido adaptadas a los objetivos propuestos en este proyecto.

### EJEMPLO 13. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 25 **13.1 Cultivos celulares**

##### I. Cultivos de la línea celular HL-1

La línea celular HL-1 fue amablemente cedida por el Dr. W.C. Claycomb (Louisiana State University Medical Center, New Orleans, Louisiana, USA). Estas células muestran características similares a las de los cardiomiocitos. Estas  
30 células se mantuvieron en medio Claycomb (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) suplementado con un 10% de FCS (invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), norepinefrina (100  $\mu$ M), penicilina (100 U/mL), estreptomina (100  $\mu$ g/mL) y amfotericina (0.25  $\mu$ g/mL) en placas de cultivo recubiertas de fibronectina (12.5  $\mu$ g/mL) y gelatina (0.02%) a 37°C y en un 5% de CO<sub>2</sub>.

## II. Aislamiento y cultivo celular de miocitos ventriculares neonatales de rata (NRVM)

Este estudio fue aprobado por el Comité de Investigación con animales del Instituto Catalán de Ciencias Cardiovasculares (ICCC020/DMAH4711) y se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y la Utilización de Animales de Experimentación publicada por el Instituto Nacional US de Salud. Las células NRVM se prepararon a partir de los ventrículos de corazones de ratas de 3-4 días de edad. Los neonatos se sacrificaron por decapitación, se extrajeron los corazones y se separaron los Atria. Se prepararon soluciones homogéneas utilizando el kit "Neonatal Cardiomyocyte Isolation System" (Worthington Biochemical Corporation) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cardiomiocitos se separaron de los fibroblastos cardiacos mediante la presiembra de estos en "wells" de plástico durante 90 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Los cardiomiocitos se mantuvieron en "wells" gelatinizados con un 1% de gelatina en medio DMEM:M199 (Gibco) suplementado con 5% FBS, 10% suero de caballo (Invitrogen) y 1% de P/S. Se añadió al medio de cultivo 1µg/mL de cytosine b-D-arabinofuranosido (Sigma) para inhibir la proliferación residual de fibroblastos. El medio de cultivo se cambió un día sin otro. Después de 48 horas de cultivo, los miocitos exhibieron una contracción espontánea regular. Las células se utilizaron para los experimentos después de 3-6 días en cultivo.

## III. Generación de cardiomiocitos deficientes en LRP1.

### *Diseño de lentivirus miRNA para inhibir la expresión de LRP1*

25

**A)** Se diseñaron distintas secuencias miR RNAi utilizando el sistema de Invitrogen BLOCK-IT™ RNAi Designer para inhibir la expresión de LRP1 (XM\_001056970) mediante su incorporación en lentivirus utilizados para infectar HL-1 y NRVM:

30 - las secuencias SEQ ID No: 1 y SEQ ID No: 2 corresponden con los oligonucleótidos "top" y "bottom" del miR RNAi diseñado y sintetizado artificialmente para inhibir la expresión de LRP1 (miR RNAi-XM\_001056970\_1919 o RNAi1919);

- las secuencias SEQ ID No: 3 y SEQ ID No: 4 corresponden con los oligonucleótidos “top” y “bottom” del miR RNAi diseñado y sintetizado artificialmente para inhibir la expresión de LRP1 (miR RNAi-XM\_001056970\_8223 o RNAi8223);
- 5
- las secuencias SEQ ID No: 5 y SEQ ID No: 6 corresponden con los oligonucleótidos “top” y “bottom” del miR RNAi diseñado para inhibir la expresión de LRP1 (miR RNAi-XM\_001056970\_8531 o RNAi8531);
- 10 El plásmido pcDNA<sup>TM</sup> 6.2-GW/miR se utilizó como control negativo en todos los experimentos de transfección: las SEQ ID No: 7 y SEQ ID No: 8 corresponden con los oligonucleótidos “top” y “bottom” del control negativo universal (pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/miR-neg).
- 15 **B)** Análisis de la expresión de ARNm de LRP1 en células HL-1 infectadas con RNAi1919 (SEQ ID No. 16), RNAi8223 (SEQ ID No. 17) o RNAi8531 (SEQ ID No. 18) (Figura 3). Los datos se procesaron con un programa “software” que se basa en el cálculo relativo de la concentración de ARNm según el valor Ct (threshold cycle). Los datos se normalizaron por el control endógeno *ARBP*. Los resultados
- 20 se expresaron como el porcentaje de expresión respecto a las células infectadas con el control negativo. \* $P < 0.05$  vs células transfectadas con el control negativo.

En nuestro caso el programa ha generado tres secuencias con capacidad para inhibir el gen LRP1 [RNAi1919 (SEQ ID No. 16), RNAi8223 (SEQ ID No. 17) o

25 RNAi8531 (SEQ ID No. 18)] además del control negativo (pcDNA<sup>TM</sup>-GW/miR\_neg). El plásmido pcDNA<sup>TM</sup>-GW/miR\_neg contiene un inserto que forma una estructura “hairpin” que se procesa en una forma de miRNA madura que es incapaz de unirse a ninguno de los genes conocidos en vertebrados. Por tanto, este plásmido sirve como control negativo para los experimentos de “knockdown”

30 realizados con vectores de expresión pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/miR. Se emplean también las SEQ ID No: 9 y SEQ ID No: 10 sintetizadas artificialmente que corresponden respectivamente con las secuencias de ADN de los vectores pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW y pcDNA<sup>TM</sup>6.2\_GW.

#### IV. Producción de las partículas de lentivirus

Para generar el vector de expresión miR RNAi se anillaron los oligos y se ligaron en el vector lineal pcDNA<sup>TM</sup>6.2\_GW/miR (SEQ ID No. 10). Posteriormente, se transformaron células competentes *E.Coli* con el DNA ligado y se seleccionaron 5 las células en medio LB suplementado con 50 µg/mL de espectinomicina. Posteriormente, se transfirieron las construcciones miR RNAi a los vectores pDONR<sup>TM</sup>221 (SEQ ID No. 11) mediante la reacción catalizada por la BP clonasa II (Figura 4B).

10 Entonces se transfirió la secuencia miRNA del clon pENTR<sup>TM</sup>221 (SEQ ID No. 12) junto con el plásmido pENTR5'-CMV (Invitrogen) al vector pLenti6.4/R4R2/V5-DEST<sup>TM</sup> (SEQ ID No. 23) mediante la reacción catalizada por la LR clonasa II (Figura 4C). Se emplean también las SEQ ID No: 11 y SEQ ID No: 12 sintetizadas artificialmente que corresponden respectivamente con las secuencias de ADN de 15 los vectores pDONR<sup>TM</sup>221 (SEQ ID No. 11) y pENT<sup>TM</sup>221 (SEQ ID No. 12).

Se transformaron las células competentes *E. coli* con el vector de expresión recombinante pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-V5-MSGW/miR (Life Technologies (Invitrogen)) y se seleccionaron las células en LB suplementado con ampicilina. Se picaron 20 colonias y se cultivaron durante la noche en medio LB con ampicilina. Se realizó la digestión con Hind para comprobar que se había producido una recombinación correcta. Los lentivirus (preferiblemente pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW/miR-XM-001056970-1919 (SEQ ID No. 21); pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW/miR-XM-001056970-8223 (SEQ ID No. 24); pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW/miR-XM-001056970-8531 (SEQ 25 ID No. 20); pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW/miR-neg (Life Technologies (Invitrogen)), se utilizaron para transfectar los cardiomiocitos HL-1 y NRVM.

El día anterior a la transfección, se sembraron células embrionarias de riñón 293T. Se mezclaron el vector de transferencia lentiviral (pLenti6.4-CMV-MSGW/miR, 6 µg) (SEQ ID No: 9), el plásmido de la cubierta viral (pMD-G-VSV-G 30 (Sigma Aldrich), 2µg) y la construcción de empaquetamiento (pCMV-ΔR8.2 (SEQ ID No. 22), 4 µg) con cloruro sódico 150 mM y la mezcla se adicionó a una solución llamada "Polyplus transfection". La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Esta solución se adicionó gota a gota a las células 293T que se incubaron durante 16 horas a 37°C y con un 5% CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se

retiró la solución de transfección y se adicionó a las células medio sin FBS. A las 48 horas de incubación, se recogió el sobrenadante, se centrifugó y se filtró mediante un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  de baja unión. El sobrenadante filtrado se concentró mediante filtros Amicon siguiendo las instrucciones del fabricante. Los distintos 5 “stocks” generados así como el control negativo de lentivirus se titularon por el método de la blasticidina.

#### *V. Generación de cardiomiocitos deficientes en LRP1.*

En los experimentos de transfección transitoria, las NRVM confluentes se 10 incubaron durante 18 horas en presencia de lentivirus con 10 MOI. En los experimentos de transfección estable, tres días después de la infección por los virus, las células HL-1 se trataron con blasticidina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El medio se reemplazó con medio fresco con blasticidina cada 3 o 4 días hasta que las colonias resistentes a blasticidina se identificaron. Los clones con la máxima inhibición en 15 la expresión de LRP1 se seleccionaron y se crecieron.

### **13.2 Obtención de células musculares lisas de pared vascular humana**

Para la obtención de las CMLV se utilizaron arterias coronarias humanas siguiendo la técnica de explantes establecida por nuestro grupo (Llorente-Cortés 20 et al, ATVB 2000; Llorente-Cortés et al, Circulation 2002). Para la realización de los experimentos se utilizaron CMLVs descongeladas o subcultivadas entre el 3er y el 7º pasaje. Para los tratamientos en condiciones de normoxia (21%  $\text{O}_2$ ) se utilizó un incubador Nirco con un ambiente de un 74%  $\text{N}_2$  y un 5%  $\text{CO}_2$ , y para la hipoxia un incubador Anoxic Workstation H35 de Don Whitley Scientific Ltd. con 25 una mezcla de gases de 1%  $\text{O}_2$ , 94%  $\text{N}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ .

### **13.3 Aislamiento y caracterización de VLDL y LDL**

Las VLDL ( $d_{1.001}-d_{1.019}$  g/mL) y LDLs ( $d_{1.019}-d_{1.063}$  g/mL) humanas se obtuvieron a partir de “pool” de sueros de voluntarios normolipémicos. Las preparaciones de 30 VLDL y LDL que se utilizaron para los experimentos fueron siempre de menos de 24 horas y sin niveles detectables de malonaldehído o endotoxina. La modificación de las LDL por agregación se realizó de forma mecánica (Llorente-Cortés et al, ATVB 1998). Las LDL nativas se llevaron a una concentración de 1mg/mL diluyéndolas en tampón PBS y se agitaron de forma intensa mediante un



agitador vortex durante 4 minutos a temperatura ambiente (T.A.). Después, se centrifugaron a 10000xg durante 10 minutos a T.A. para precipitar la LDLag y se descartó el sobrenadante. La LDLag se resuspendió en PBS hasta una concentración proteica de 1mg/mL. La LDLag obtenida por agitación presenta una estructura y funcionalidad similar a la producida por incubación con el proteoglicanos versican de la matriz extracelular (Llorente-Cortés V et al, ARVB 2002).

### 13.4 Medida de la estabilidad de la proteína LRP1

10 Para medir la estabilidad de la proteína LRP1, se utilizó cicloheximida, un inhibidor de la traducción en eucariotas. Las CMLV se pre-expusieron a LDLag (100 µg/mL) durante 18 horas antes de la adición de cicloheximida (100 µM). Las células se recogieron a los siguientes tiempos después del tratamiento con cicloheximida (6, 12, 24 y 32 horas), se recogieron en tampón de lisis y la concentración de proteína LRP1 se analizó por "Western blot". La estabilidad de la proteína de LRP1 se determinó como la proporción de proteína inicial que quedaba a cada tiempo después del tratamiento con cicloheximida.

### 13.4 Immunoprecipitación de la proteína LRP1 ubiquitinada.

20 Las proteínas poliubiquitinadas se inmunoprecipitaron utilizando el kit "Ubiquitinated Protein Enrichment Kit" (Calbiochem 662200). Una alícuota del extracto proteico se aplicó a bolas enriquecidas con poli-ubiquitina y otra alícuota a bolas control negativo. Después de la inmunoprecipitación, las membranas se incubaron con anticuerpos anti-LRP1 (Epitomics, 2703-1, dilución 1:7000) y anticuerpos anti-ubiquitina (Calbiochem, 662099, dilución 1:5000).

### 13.5 Producción de Anticuerpos policlonales

*1. Síntesis de los péptidos:* Se designaron tres péptidos sobre la base de la secuencia del cluster II de la cadena alfa del LRP1 (SEQ ID NO. 19). Las secuencias de estos péptidos y su localización son:

- **Péptido 1 (P1):** CTNQATRPPGGSHTDE (SEQ ID No. 13), la S sustituye a la C de la secuencia LRP1 humana original (1051-1066).

- **Péptido 2 (P2):** DSSDEKSSEGVTHVC (SEQ ID No. 14), la S sustituye a la C de la secuencia LRP1 humana original (1090-1104).
- **Péptido 3 (P3):** GDNDSEDNSDEENC (SEQ ID No. 15) la S sustituye a la C de la secuencia LRP1 humana original (1027-1140).

Estos péptidos se sintetizaron en la Unidad de Técnicas Separativas y Síntesis de Péptidos de la Universidad de Barcelona mediante un método de fase sólida utilizando un sintetizador de péptidos y se purificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) mediante detección UV a 254 nm. Los péptidos purificados se caracterizaron por espectrometría de masas. Posteriormente, los péptidos se acoplaron al "carrier" KLH para realizar la inmunización y al "carrier" albúmina para hacer un "test" de los anticuerpos generados mediante la técnica de ELISA.

15

II. Inmunización de los animales: La producción de los anticuerpos policlonales se realizó en el Servicio de Cultivos Celulares, Producción de Anticuerpos y Citometría de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). El estudio en animales se aprobó por el Comité de Investigación en Animales de la UAB y el gobierno catalán. Para cada péptido, dos grupos de tres ratones Balb/c (8 semanas) se inmunizaron intraperitonealmente con 50 microgramos de los péptidos conjugados con KLH. Se extrajo una pequeña cantidad de sangre para testar la presencia de anticuerpos frente a los péptidos mediante el método de ELISA.

25 El suero de los ratones se recogió siguiendo las guías de inmunización. Los anticuerpos específicos para cada péptido se purificaron inmovilizando los péptidos en columnas de afinidad SulfoLink de acuerdo con las instrucciones del fabricante y sus niveles se analizaron por ELISA.

30 III. ELISA Los niveles de anticuerpos específicos en las muestras de suero así como los de los anticuerpos anti-péptido purificados se determinaron por ELISA. Brevemente, los péptidos conjugados con BSA y BSA sola se inmovilizaron en placas de 96 pocillos a una concentración de 1 µg/mL durante 60 minutos en un tampón carbonato 0.1 M y pH 9.6. Después de bloquear con BSA 1% en PBS, las

placas se incubaron con anticuerpos primarios a diferentes diluciones, seguido de una incubación con anticuerpo secundario unido a peroxidasa. La reacción enzimática se realizó en un equipo Sigma-Fast OPD. Después de 30 minutos, la densidad óptica se midió a 450 nm en un lector de placas.

5

### **13.6 Extracción lipídica y determinación de los niveles de colesterol esterificado (CE), colesterol libre (FC) y triglicéridos (TG)**

Siguiendo la incubación celular con VLDL, las células se lavaron exhaustivamente y se recogieron en NaOH. En el caso del tejido miocárdico, se pesaron 5 mg, se  
10 homogeneizó y se trituró también en NaOH. El homogenado celular o tisular se utilizó para la extracción de lípidos mediante el método de Bligh and Dyer con pequeñas modificaciones. La extracción lipídica se realizó adicionando una mezcla de metanol/diclorometano (2:1, vol/vol). Después de la evaporación del solvente orgánico, el extracto se disolvió en diclorometano y se utilizó para  
15 cromatografía en capa fina (CCF). La CCF se realizó en placas de sílica G-24. Se utilizó una mezcla de estándares (colesterol, colesterol palmitato, triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos) que se aplicaron en cada placa. La solución cromatográfica fue heptano/dietileter/ácido acético (74:21:4, vol/vol/vol). Las bandas correspondientes a CE, FC y TG se cuantificaron por densitometría frente  
20 a una curva estándar de colesterol palmitato, colesterol y triglicéridos, respectivamente utilizando un densitómetro.

### **13.7 Preparación de VLDL doblemente marcada**

Para preparar VLDL doblemente marcada con radiactividad, se formó una capa  
25 de cholesteryl-1,2- $^3\text{H}$ -(N) (125  $\mu\text{Ci}$ ) y glicerol trioleato [ $^{14}\text{C}$ ] en una botella de fondo redondeado mediante evaporación del solvente orgánico a 37°C bajo vacío. Entonces, se adicionaron 50 mL de plasma humano y la botella se quedó rotando en un baño de agua a 37°C durante 30 horas. Se aislaron las VLDL mediante ultracentrifugación secuencial, se dializaron en columnas PD10 y se filtraron. La  
30 actividad específica de las VLDL fue de 492 cpm/ $\mu\text{g}$  proteína para [ $^3\text{H}$ ] y 102 cpm/ $\mu\text{g}$  proteína para [ $^{14}\text{C}$ ].

### **13.8 Determinación de la captación de VLDL- $^3\text{H}$ -CE y VLDL- $^{14}\text{C}$ -TG por los cardiomiocitos**

Células HL-1 quiescentes control o deficientes en LRP1 se incubaron con VLDL doblemente marcada (1.8 mM, 18 horas). Al final del periodo de incubación, las células se lavaron y se recogieron en NaOH 0.1 M. Se determinaron los niveles de radiactividad en 50  $\mu$ L de homogenado celular en un contador de centelleo 5 (Beckman Coulter, LS6500) y las cuentas (dpm) se normalizaron por la proteína celular.

### 13.9 Análisis de la expresión de ARNm y proteína

Para la extracción tanto de ARNm como de proteína, las células o el tejido se 10 homogeneizaron en el reactivo de aislamiento TriPure siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### *I. Expresión de ARN mensajero (ARNm)*

La expresión de ARNm de LRP1, VLDLR, LDLR y CHFR se analizó mediante PCR 15 a tiempo real utilizando el equipo PCR-7000 Sequence Detection System de ABIPRISM (Applied Biosystems) con los siguientes "assays-on-demand": LRP1 (Rn01503901 o Mm00464601\_m1), VLDLR (Rn01498166\_m1 o Mm00443281\_m1), LDLR (Rn00598440\_m1 o Mm01151339\_m1) y CHFR (Hs00943495\_m1). ARBP (Rn00821065\_g1) y GAPDH (4326317E) se utilizaron 20 como control endógeno. La PCR tiempo real se realizó con 1  $\mu$ L del producto de la retrotranscripción en 10  $\mu$ L de PCR Master Mix con los cebadores a 300 nM y la sonda a 200 nM. Los Ct (threshold cycle) se utilizaron para el cálculo de la expresión que se normalizó por los Ct del control endógeno.

#### 25 *II. Expresión proteica*

Se aisló la proteína mediante el método TriPure y se resuspendió en SDS. Las membranas se incubaron con anticuerpos monoclonales frente a LRP1 (cadena  $\beta$ , clon 8B8, RDI61067), o VLDLR (Santa Cruz Biotechnology Inc, D-17, sc-11823) LDLR (Epitomics, 1956-1) o CHFR (Cell Signaling, 4297, dilución 1:1000). Para 30 comprobar la carga de proteína, se tiñeron las membranas con Ponceau y se incubaron las membranas con anticuerpos frente a  $\beta$ -tubulin (Abcam, ab6046) en el caso de HL-1 o con anticuerpos frente a GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc, sc-20357) en el caso de NRVM.

Los anticuerpos monoclonales frente a LRP1 se han utilizado para la detección de la cadena citoplasmática de LRP1 (cadena beta, citoplasmática) por la técnica de “western blot” y por tanto no servirían para inhibir la capacidad de unión de la cadena alfa del LRP1 (extracelular).

5

### **13.10 Modelo *in vivo* de isquemia miocárdica**

Se estudió el perfil de lípidos neutros y la expresión de receptores lipoproteicos en el miocardio de un grupo de cerdos macho (Crossbred commercial pigs (Landrace-Largewhite) en los que se indujo infarto agudo de miocardio mediante  
10 oclusión de la arteria coronaria descendente izquierda (LAD) durante 1.5 horas (n=6) y se comparó con un grupo control (sham, intervención sin oclusión, n=3) tal como se detalla en los trabajos previamente publicados (Vilahur G *et al*, J Thromb Haemost 2009; Vilahur G *et al*, J Mol Cell Cardiol 2011). La arteria coronaria se ocluyó mediante angioplastia por “ballon” via femoral. El lugar de la oclusión fue  
15 distal con respecto a la rama diagonal primera. Noventa minutos de oclusión resulta en infartos grandes y transmurales que están asociados a un proceso de remodelado. Se tomaron muestras de la periferia de la zona de necrosis en la zona septal (zona isquémica) y del ventrículo izquierdo en la zona remota respecto al infarto (zona no isquémica) y se utilizaron para el análisis molecular.

20

### **13.11 Pacientes**

Se recogieron un total de 55 corazones explantados a 26 pacientes con cardiomiopatía idiopática dilatada (DCM) y 29 pacientes con cardiomiopatía isquémica a los que se sometió a trasplante en el Hospital de la Santa Creu i Sant  
25 Pau de Barcelona o el Hospital La Fe de Valencia. Los pacientes se clasificaron según los criterios de la Asociación del Corazón de New York (NYHA) y recibieron el tratamiento según las guías de la Sociedad Europea de Cardiología. Los datos bioquímicos y ecográficos de estos pacientes se muestran en la Tabla. Se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes de acuerdo con nuestras guías  
30 institucionales. Cuatro corazones no enfermos obtenidos de donadores que sufrieron un accidente de tráfico fueron utilizados como controles.

### 13.12 Immunohistoquímica

Las muestras de miocardio se cortaron en bloques apropiados y se sumergieron en solución fijadora (paraformaldehído al 4%) y después se embebieron en OCT, se cortaron en láminas de 5 µm de grosor y se colocaron en portas de poly-L-  
5 Lisina. Se utilizó como anticuerpo primario anti-LRP1 (Research Diagnostica, PRO61067). Previamente a la incubación, las secciones se lavaron y se inhibió la actividad de peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando el suero de caballo para inhibir la actividad inespecífica. El anticuerpo primario se detectó mediante la técnica de inmunoperoxidasa avidina-biotina utilizando un anticuerpo secundario  
10 biotinilado (Vector). Se usó 3,3'-diaminobenzidina como cromógeno y hematoxilina para la tinción nuclear. El protocolo fue similar para la tinción del VLDLR (Santa Cruz Biotechnology, sc-18824) excepto que hubo mayor permeabilización antes de aplicar el anticuerpo primario. Las imágenes se capturaron con un microscopio Nikon Eclipse 80i y digitalizadas con una Cámara  
15 Retiga 1300i Fast (magnificación x240).

### 13.13 Cultivos celulares de cardiomiocitos para la obtención de anticuerpos monoclonales y moléculas de pequeño tamaño para su aplicación en modelos *in vivo* de infarto agudo de miocardio

20 Como modelo de cardiomiocitos adultos se utiliza la línea celular de cultivos HL-1. Esta línea celular ha sido amablemente cedida por el DR. W.C. Claycomb (Louisiana State University Medical Center, New Orleans, Louisiana, USA) y tiene unas características fenotípicas similares a las del cardiomiocito adulto (Claycomb WC et al, PNAS 1998). Las células HL-1 se mantendrán en medio Claycomb (JHR  
25 Biosciences, Lenexa, KS, USA) con suero bovino fetal (10%), norepinefrina (100 U/mL) y antibiótico. Las placas de cultivo se cubrirán previamente a la siembra con fibronectina y gelatina y las células HL-1 se cultivarán en paralelo en condiciones de normoxia e hipoxia y en ausencia o presencia de lipoproteínas (Castellano J et al. JMCC 2011\*). En este momento disponemos de líneas  
30 estables de cardiomiocitos control y deficientes en LRP1 que hemos generado mediante transfección con lentivirus con secuencias miRNA inhibitorias de la expresión de LRP1 (pLenti6.4-CMV-MSGW/miR, Invitrogen). Compararemos el efecto de los minireceptores solubles y de los anticuerpos generados en la

prevención de la transferencia de colesterol esterificado desde las VLDL a los cardiomiocitos hipóxicos.

### 13.14 Inducción del infarto agudo de miocardio para el estudio del papel de 5 la inhibición del receptor Irp1 en cardioprotección en modelos *in vivo* de infarto agudo de miocardio

I. **Ratón** - Como modelo de ratón se escogen los ratones transgénicos apoE3leiden (E3L) cuyo patrón de dislipemia se parece a la de los pacientes con  
10 disbetalipoproteinemia, en los cuales la elevación tanto de colesterol como de triglicéridos está limitada a las VLDL. Tras la anestesia de los ratones por vía intraperitoneal con una mezcla de ketamina (50mg/ml) y xylacina (2%), se intuban endotraquealmente y se conectan a un ventilador. Se realiza una toracotomía izquierda, entre el 4º y el 5º espacio intercostal para poder acceder al corazón. La  
15 arteria coronaria izquierda se ocluye con un hilo de sutura 5-0, aproximadamente a 2 mm del origen, entre el borde del atrio izquierdo y el surco de la arteria pulmonar; se cruzan los hilos de forma tal de detener completamente el flujo sin dañarla. La oclusión se confirma visualmente por el cambio de coloración del miocardio afectado y la desoclusión se verifica mediante la desaparición del área  
20 de cianosis epicárdica.

II. **Cerdo** - El modelo porcino es ideal como modelo preclínico en cardioprotección ya que la circulación coronaria colateral y la anatomía arterial de cerdos y humanos es similar. Además el tamaño del infarto es fácilmente predecible. La  
25 inducción del infarto en el modelo porcino se realiza tal como se ha descrito previamente en nuestro Centro de Investigación (Vilahur G et al, JMCC 2011). Doce horas antes de la inducción experimental de infarto agudo de miocardio (IAM), se administra una dosis de carga de clopidogrel (150mg/kg). La anestesia se aplica mediante inyección intramuscular de Zoletil ® (7mg/Kg), Dormitorio ®  
30 (7mg/kg) y atropina (0.03mg/Kg). Los animales se someten a intubación endotraqueal, y se mantiene la anestesia por inhalación de isofluorano (1,5-2%). La infusión continua de amiodarona (300 mg, 75 mg / h) se inicia en el inicio del procedimiento en todos los cerdos como profilaxis de arritmias ventriculares malignas. Se utilizan imágenes de angiografía para guiar la colocación de una

angioplastia con balón (por debajo de la primera rama diagonal). La angioplastia con balón (2.5-3 mm) se infla a la presión nominal (la oclusión completa de la arteria coronaria se verificará por fluoroscopia). La oclusión se mantiene durante noventa minutos y los niveles de oxígeno y el electrocardiograma se monitorizarán durante todo el procedimiento quirúrgico. El sitio de la oclusión se sitúa inmediatamente distal al origen de la primera rama diagonal.

### **13.15 Liberación de los anticuerpos**

10 Los anticuerpos se inyectan intraperitonealmente durante la cirugía y en un estudio piloto se realiza un estudio de la dosis de anticuerpo requerida para inhibir la captación masiva del colesterol de las VLDL por el cardiomiocito en situación de isquemia.

### **15 13.16 Estudio del tamaño del infarto**

**I. Ratón** - Para determinar el tamaño del infarto, se sacrifican los animales y el corazón se monta en un aparato Langendorff para profundir el corazón con formol al 10%. Después de la fijación se mide el área de cicatriz en las secciones teñidas con tricrómico de Masson (Sigma-Aldrich) mediante el "software" de imágenes Bioquant y se expresará como porcentaje del área total del ventrículo izquierdo

**II. Cerdo** - Después del sacrificio, se realizan cortes del corazón de 5 mm de espesor desde el vértice hacia el surco auriculoventricular. Cortes alternativos se utilizarán para tinción con trifenil cloruro de tetrazolio (TTC) y para Biología Molecular. También se obtiene sangre de estos animales antes de la oclusión de la arteria coronaria y antes del sacrificio para la detección de marcadores de necrosis miocárdica tales como la troponina-I y CK-MB / CK.

### **30 13.17 Parámetros ecocardiográficos**

Se realiza una ecocardiografía transtorácica antes y después de la cirugía utilizando el sistema de imágenes Philips iE33 para cerdos y Vevo 2100 (VisualSonics Inc), equipado con una sonda de 30 MHz para los ratones.



### 13.18 Técnicas relacionadas con el manejo de lípidos y lipoproteínas

**I. Aislamiento de lipoproteínas.** Las VLDL y LDL se obtienen por ultracentrifugación secuencial a 4°C en solución de densidad de KBr a partir de plasma de donantes normolipémicos. Las lipoproteínas se dializan y se analiza su pureza por electroforesis en gel de agarosa tal y como hemos descrito previamente (Llorente-Cortés V et al, ATVB 2002\*; ATVB 2006\*).

**II. Determinación del contenido de colesterol libre, colesterol esterificado y triglicéridos en muestras celulares y tisulares.** La muestra celular se recoge en NaOH y la tisular se tritura y pesa exhaustivamente antes de realizar la extracción lipídica y la cromatografía en capa fina de las muestras según hemos descrito previamente (Llorente-Cortés V et al, ATVB 2002\*, ATVB 2006\*).

**III. Preparación de  $^{3\text{H}}$ CE- $^{14\text{C}}$ TG-VLDL y determinación de la captación de CE y TG por los cardiomiocitos**

Se obtiene VLDL doblemente marcada con un método previamente descrito con pequeñas modificaciones. Se depositan el cholesteryl-1,2,- $^3\text{H}$ (N) (125  $\mu\text{Ci}$ ) y el glycerol trioleate [ $^{14}\text{C}$ ] (25  $\mu\text{Ci}$ ) (PerkinElmer Life Sciences) en un frasco con fondo redondeado para evaporar el solvente orgánico a 37°C bajo vacío. Entonces se añaden 50 mL de plasma humano al frasco y se dejará en rotación en un baño de agua bajo vacío durante 20 horas a 37°C. Posteriormente, se aíslan las VLDL marcadas radiactivamente por ultracentrifugación, se dializan y se filtran guardándose a 4°C y protegidas de la luz hasta su uso.

Se analiza en cultivos celulares la capacidad de los anticuerpos monoclonales generados para inhibir la captación de las VLDL marcadas. La captación se determina por medición de la radiactividad en una alícuota de la suspensión celular utilizando un contador de centelleo LS6500. Las cpm obtenidas se normalizan por la proteína celular.

### 13.19 Técnicas de biología molecular

I. **Obtención de muestras a nivel tisular** Se extraen los corazones de ratones control y tratados a partir del ventrículo se obtiene una muestra para estudios de 5 Biología Molecular y otra para inmunohistoquímica.

II. **Electroforesis en gel e “immunoblotting”** (para el análisis de la expresión proteica) Se estudia la expresión de proteína mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. La proteína se transfiere a filtros de nitrocelulosa que se 10 incuban con los anticuerpos específicos de los genes en estudio (Llorente-Cortés V, Circulation 2002\*)

III. **PCR tiempo real** (para el análisis de la expresión génica). El RNA total se aísla de las muestras recogidas en reactivo TriPure™ de acuerdo con las 15 instrucciones del fabricante. Los genes de interés se analizan mediante PCR tiempo real después de realizar la síntesis de cDNA a partir de 1 ug de RNA utilizando el "high capacity archive kit" (Llorente-Cortés et al, J Mol Biol 2006\*).

IV. **Ensayos de inmunoprecipitación de proteínas.**- Esta técnica se utiliza para 20 estudiar la formación de complejos en el proceso de señalización intracelular. Las células se lisan en tampón de lisis con inhibidores de proteasas. Los lisados se limpian de “debris” mediante centrifugación a 10,000xg durante 5 min a 4°C. La proteína se incuba entonces con anticuerpos primarios y posteriormente con agarosa unida a proteínas G durante toda la noche a 4°C. Los inmunoprecipitados 25 se recogen mediante centrifugación a 10,000xg durante 5 min a 4°C, se resuspenden y se lavarán con tampón de lisis. Posteriormente, los inmunoprecipitados se resuspenden en tampón de carga Laemli y se analizan mediante análisis por “western-blot”.

30 V. **Detección de la fosforilación de la cadena citoplasmática del LRP1**-Se utiliza anticuerpo anti-LRP1 como anticuerpo inductor de la inmunoprecipitación y anticuerpo anti-fosfotirosina como anticuerpo para la detección del complejo inmunoprecipitado en la membrana de transferencia (Boucher P et al, J Biol Chem 2002)

**VI. Zimografía-** La actividad de las metaloproteasas se mide en los sobrenadantes celulares mediante una zimografía que tiene como sustrato gelatina. Se cargan cantidades equivalentes de sobrenadantes en geles de 5 poliacrilamida al 10% que contienen 1mg/mL de gelatina y se realiza la carrera a 4°C. La tinción de los geles se realiza con azul de Coomasie R-250 y posteriormente los geles se destiñen con ácido acético (10%) y metanol (40%). Las bandas claras presentes en el fondo azul indican la presencia de actividad proteolítica. Estas bandas se cuantifican mediante densitometría (Otero-Viñas M 10 et al, Atherosclerosis 2007\*).

**VII. Medida del estrés oxidativo-** El compuesto permeable a las células (H<sub>2</sub>DCF-DA) (no fluorescente) se usa para medir los niveles intracelulares de ROS. Dentro de las células, este compuesto se de-esterifica a 2', 7'-dichlorofluorescein 15 (H<sub>2</sub>DCF) que al oxidarse por ROS da lugar al compuesto fluorescente (DCF) que permanece dentro de las células. El H<sub>2</sub>DCF-DA se disuelve en DMSO y se añade a las células. Estas se incuban con el compuesto durante 40 min a 37°C. Entonces las células se recogen y se determina la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo.

20

### **LISTA DE SECUENCIAS**

**SEQ ID No. 1:** oligonucleótidos "top" diseñados para inhibir la expresión de LRP1 (miR RNAi-XM\_001056970\_1919 o RNAi1919)

25

**SEQ ID No. 2:** oligonucleótidos "bottom" diseñados para inhibir la expresión de LRP1 (miR RNAi-XM\_001056970\_1919 o RNAi1919)

**SEQ ID No. 3:** oligonucleótidos "top" diseñados para inhibir la expresión de LRP1 30 (miR RNAi-XM\_001056970\_8223 o RNAi8223)

**SEQ ID No. 4:** oligonucleótidos "bottom" diseñados para inhibir la expresión de LRP1 (miR RNAi-XM\_001056970\_8223 o RNAi8223)

**SEQ ID No. 5:** oligonucleótidos “top” diseñados para inhibir la expresión de LRP1 (miR RNAi-XM\_001056970\_8531 o RNAi8531)

**SEQ ID No. 6:** oligonucleótidos “bottom” diseñados para inhibir la expresión de  
5 LRP1 (miR RNAi-XM\_001056970\_8531 o RNAi8531)

**SEQ ID No. 7:** oligonucleótidos “top” diseñados para el control negativo universal (pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/miR-neg)

10 **SEQ ID No. 8:** oligonucleótidos “bottom” diseñados para el control negativo universal (pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/miR-neg)

**SEQ ID No. 9:** vector pLenti6.4<sup>TM</sup>-CMV-MSGW

15 **SEQ ID No. 10:** vector lineal pcDNA<sup>TM</sup>6.2\_GW/miR

**SEQ ID No. 11:** vector pDONR<sup>TM</sup>221

**SEQ ID No. 12:** vector pENTR<sup>TM</sup>221

20

**SEQ ID No. 13:** péptido P1, secuencia de aminoácidos del cluster II de la cadena alfa de la proteína LRP1, dentro de la secuencia se identifica la zona del cluster II: 1N7D, codificado por la secuencia localizada en intervalo de bases: [1051-1066].

25 **SEQ ID No. 14:** péptido P2, secuencia de aminoácidos del cluster II de la cadena alfa de la proteína LRP1, dentro de la secuencia se identifica la zona del cluster II: 1N7D Interface, codificado por la secuencia localizada en intervalo de bases: [1090-1104].

30 **SEQ ID No. 15:** péptido P3, secuencia de aminoácidos del cluster II de la cadena alfa de la proteína LRP1, dentro de la secuencia se identifica la zona del cluster II: 1N7D Interface, codificado por la secuencia localizada en intervalo de bases: [1127-1140].

**SEQ ID No. 16:** RNAi1919, pcDNA6.2-GW/miR-XM\_001056970-1919.

**SEQ ID No. 17:** RNAi8223, pcDNA6.2-GW/miR-XM\_001056970-8223.

5 **SEQ ID No. 18:** RNAi8531, pcDNA6.2-GW/miR-XM\_001056970-8531.

**SEQ ID No. 19:** secuencia de aminoácidos del cluster II de la cadena alfa del LRP1, dentro de la secuencia se identifican P1 (codificado por la secuencia localizada en intervalo de bases [1051-1066]), P2 (codificado por la secuencia  
10 localizada en intervalo de bases [1090-1104]), P3 (codificado por la secuencia localizada en intervalo de bases [1127-1140]).

**SEQ ID No. 20:** pLenti6.4-CMV-MSGW/miR- XM\_001056970 – 8531.

15 **SEQ ID No. 21:** pLenti6.4-CMV-MSGW/miR- XM\_001056970 – 1919.

**SEQ ID No. 22:** construcción de empaquetamiento pCMV delta R8.2

**SEQ ID No. 23:** pLenti6.4/R4R2/V5-DEST™

20

**SEQ ID No. 24:** pLenti6.4™-CMV-MSGW/miR-XM-001056970-8223

## REIVINDICACIONES

1. Un agente modulador de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1 caracterizado por ser útil en el tratamiento y/o prevención de al menos una  
5 alteración cardiaca asociada a isquemia.
2. El agente modulador de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1 según la reivindicación 1, caracterizado por ser útil en el tratamiento y/o  
10 prevención de la acumulación de colesterol esterificado en los cardiomiocitos y/o en las células musculares lisas de pared vascular asociados a isquemia.
3. El agente modulador de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1 según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por ser útil en el tratamiento y/o  
15 prevención de las alteraciones en el metabolismo del calcio y el remodelado cardiaco asociados a isquemia.
4. El agente modulador de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1 según las reivindicaciones 1-3, caracterizado por ser útil en el tratamiento y/o  
20 prevención de las alteraciones cardiacas asociadas a un infarto agudo de miocardio u otra situación clínica que cursa con isquemia, hipoxia o suministro deficiente de oxígeno.
5. El agente modulador de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1 según las reivindicaciones 1 – 4, caracterizado por que dicho agente es un vector  
25 de expresión recombinante.
6. El agente modulador de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1 según la reivindicación 5, caracterizado por que el vector de expresión recombinante es un lentivirus.  
30
7. El agente modulador de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1 según la reivindicación 6, caracterizado por que el lentivirus comprende al menos un RNAi capaz de inhibir la expresión de la proteína LRP1.

8. El agente modulador de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1 según las reivindicaciones 1 – 4, caracterizado por que dicho agente es un anticuerpo.
- 5 9. El agente modulador de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1 según la reivindicación 8, caracterizado por que es un anticuerpo monoclonal.
10. El agente modulador de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1 según las reivindicaciones 1 – 4, caracterizado por que dicho agente es un siRNA.
- 10 11. El agente modulador de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1 según la reivindicación 10, caracterizado por que el siRNA es un siRNA-anti-HIF-1 $\alpha$ .
- 15 12. El agente modulador de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1 según la reivindicación 10, caracterizado por que el siRNA es un siRNA-anti-CHFR.
13. El agente modulador de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1  
20 según las reivindicaciones 1 - 12, caracterizado por que dicho agente inhibe la expresión y/o la función de la proteína LRP1.
14. Una composición farmacéutica caracterizada por comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente modulador de la expresión y/o de la  
25 función de la proteína LRP1 descrito en las reivindicaciones 1 – 13.
15. Un método de prevención y/o tratamiento de al menos una alteración cardíaca asociada a isquemia caracterizado por comprender la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente modulador  
30 de la expresión y/o de la función de la proteína LRP1 descrito en las reivindicaciones 1-13 o una composición farmacéutica descrita en la reivindicación 14.

FIG. 1

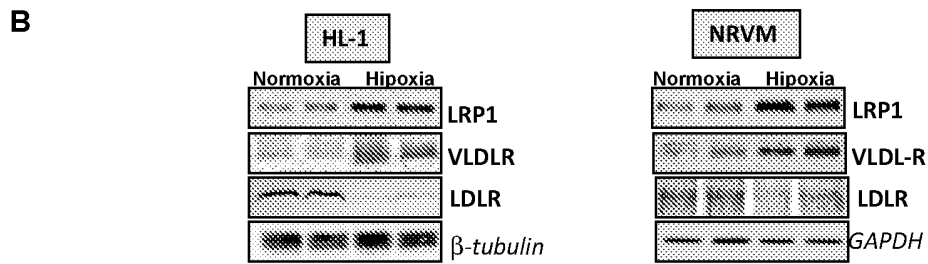
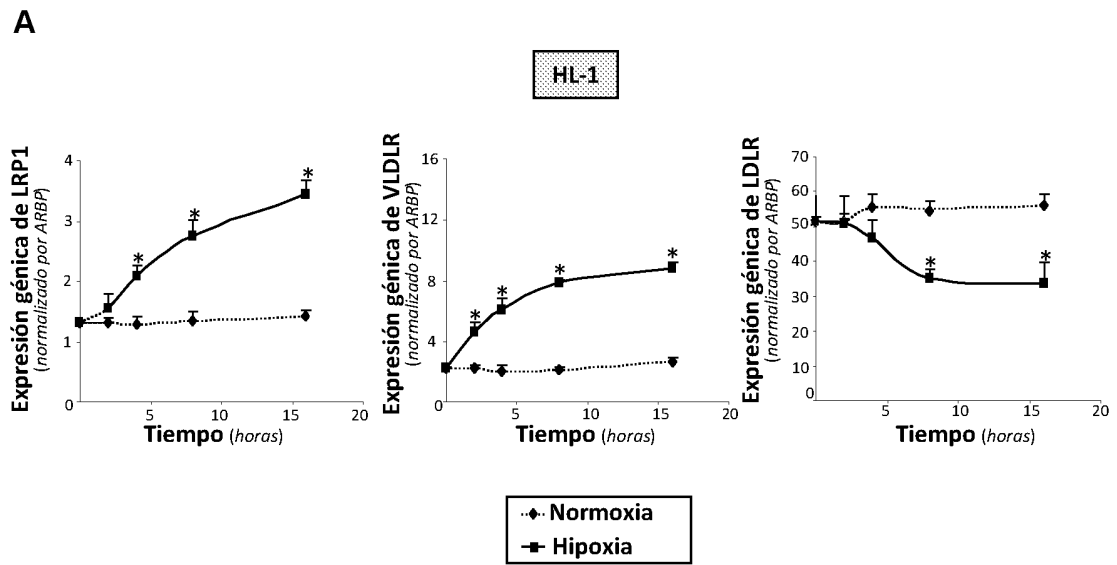




FIG. 2

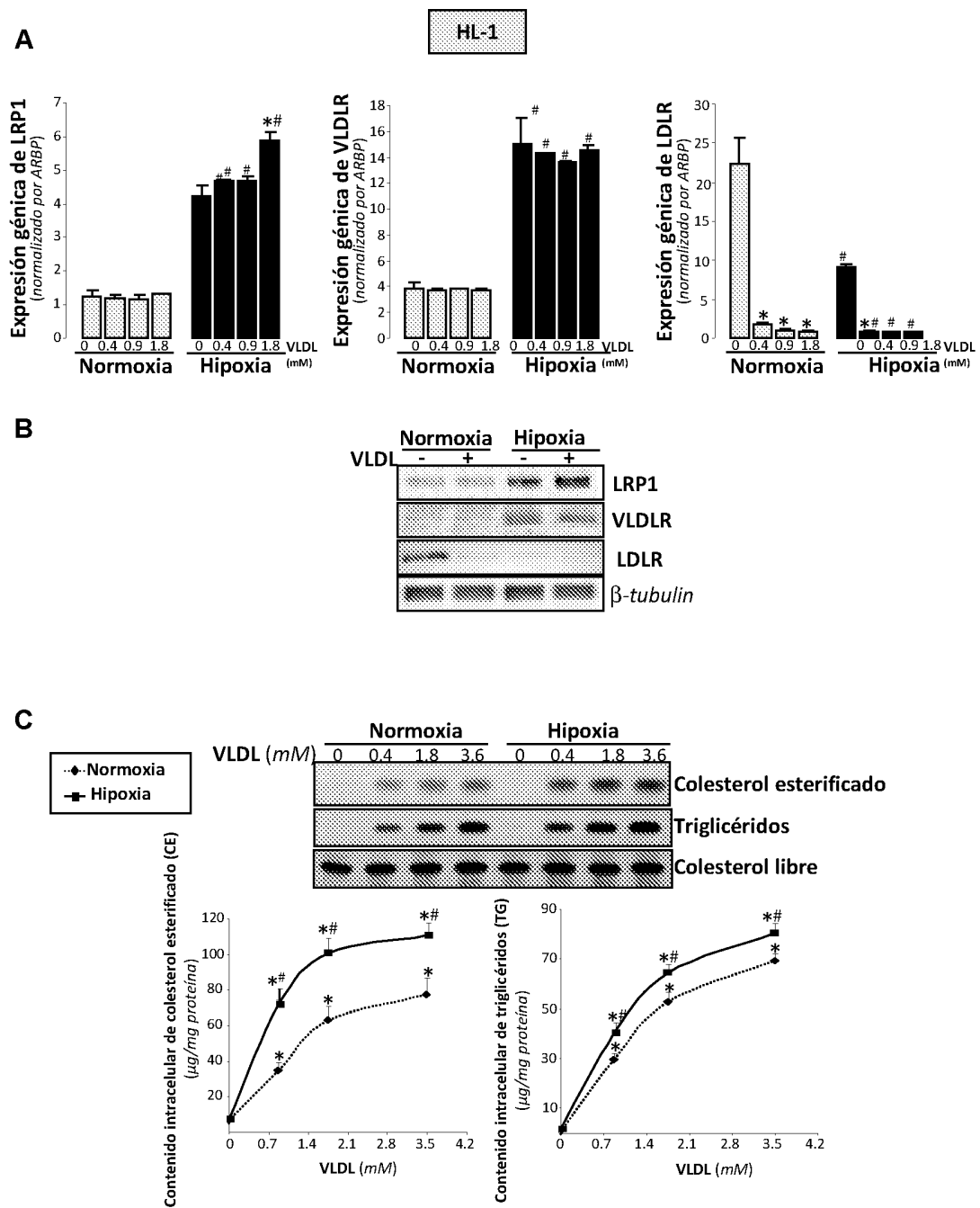


FIG. 3

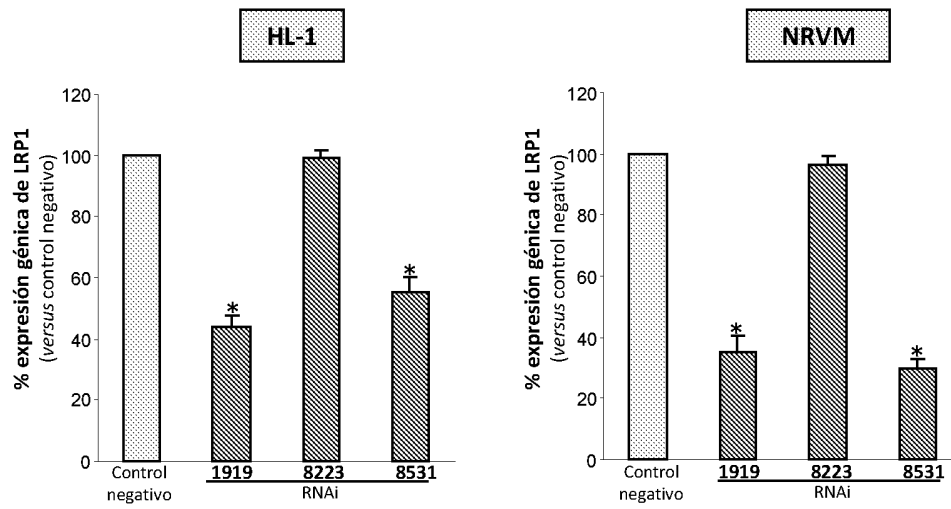


Fig. 4

A

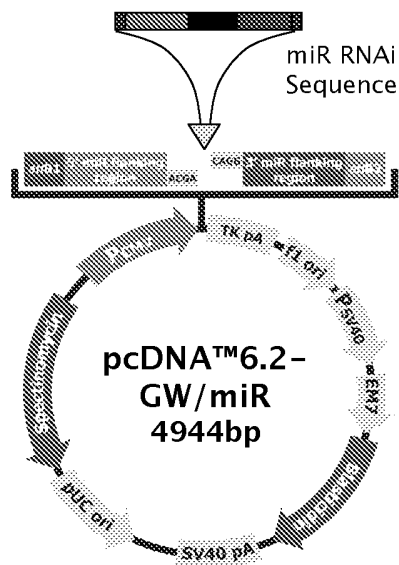
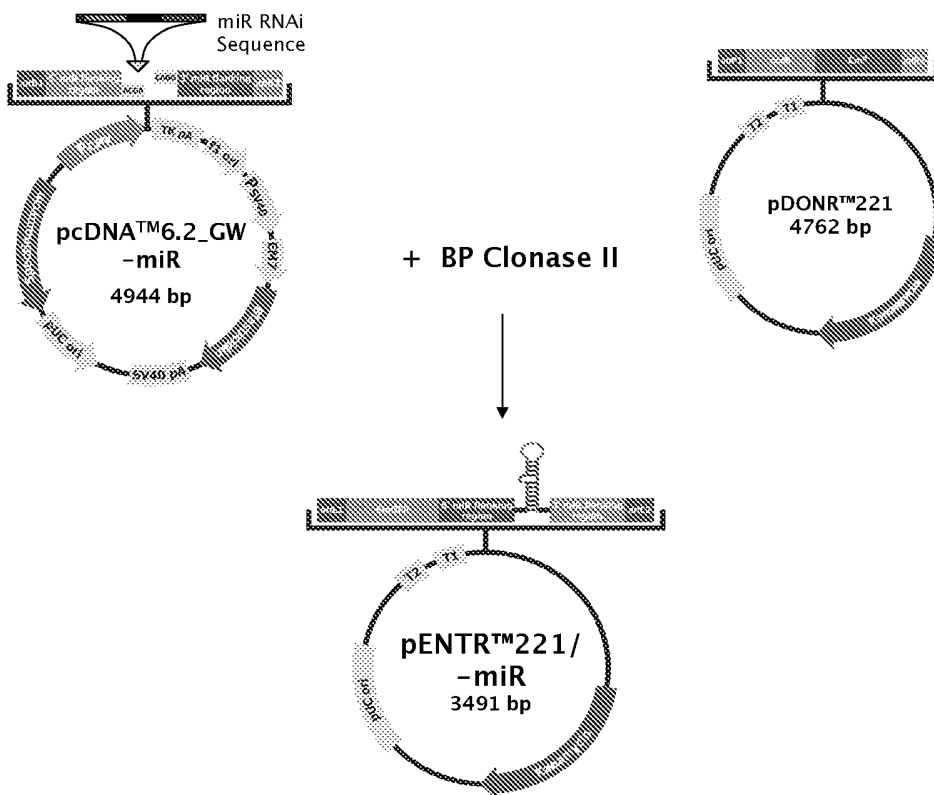


Fig. 4

B



C

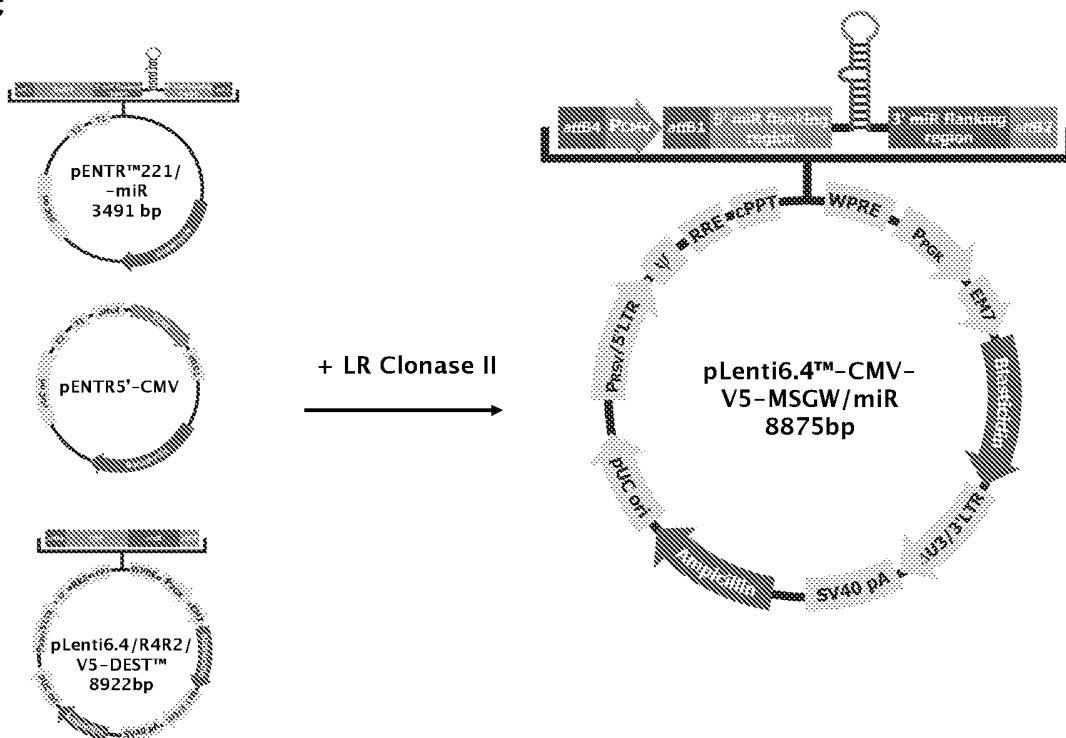


Fig. 5

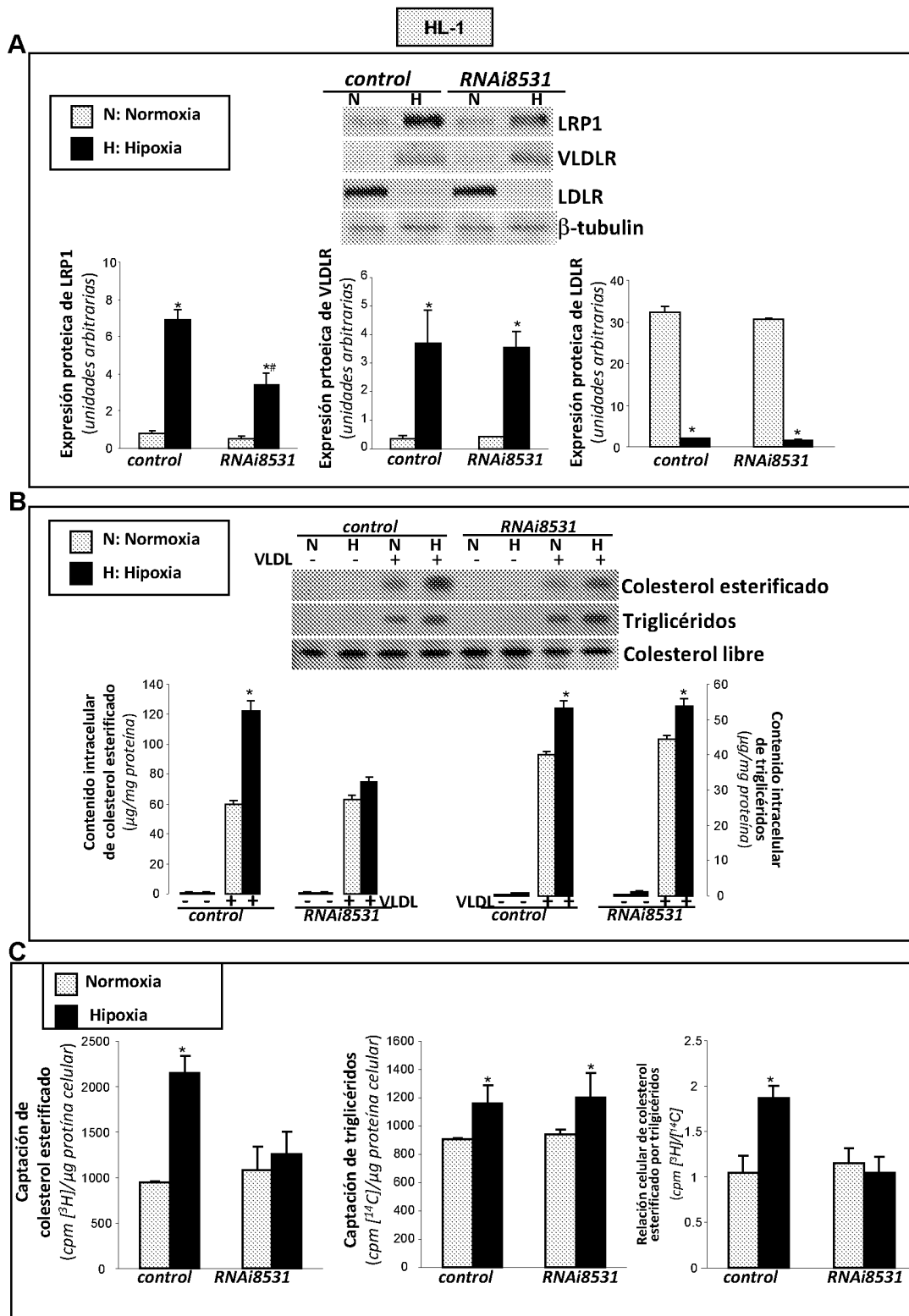


FIG. 6

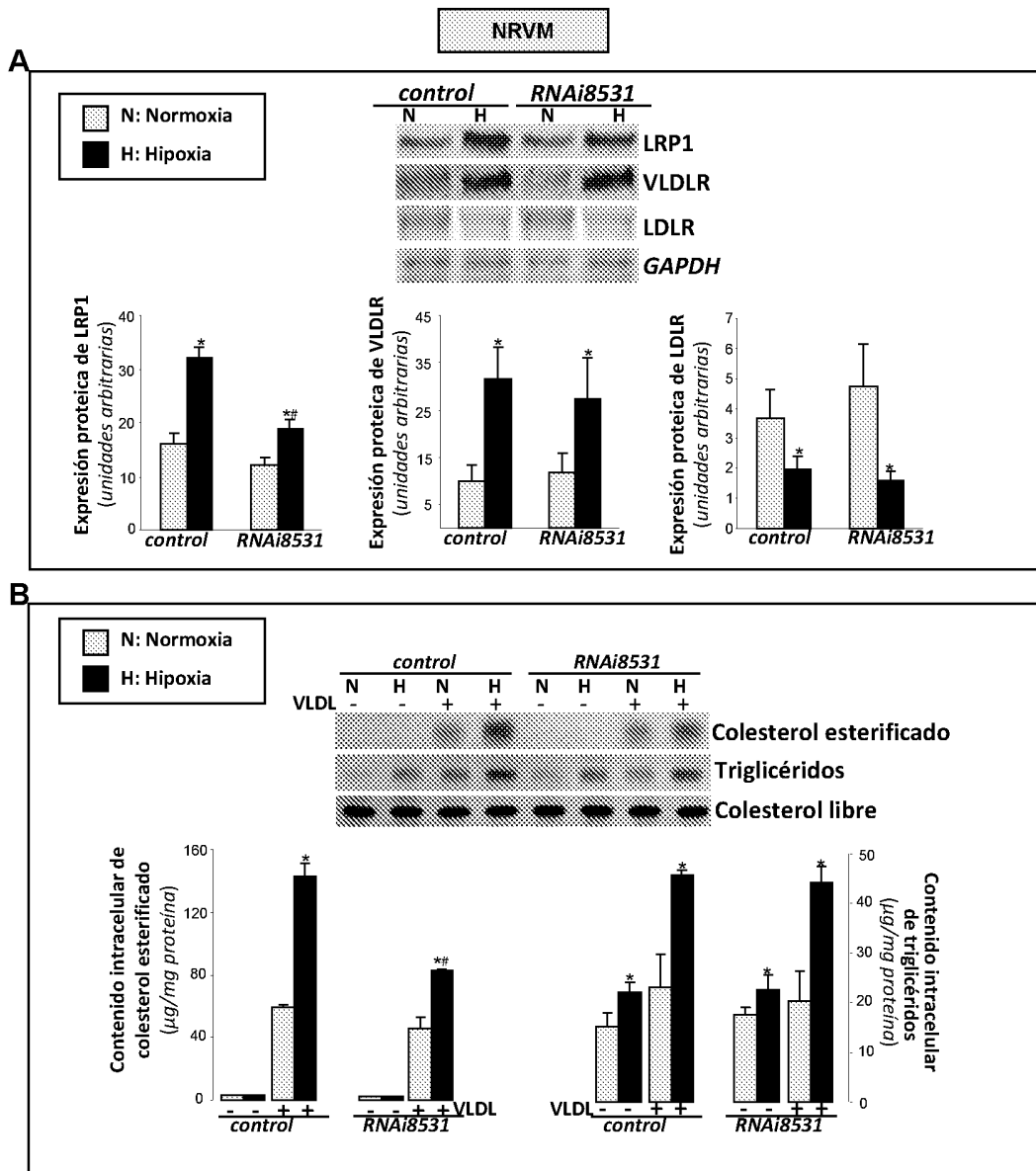


Fig. 7

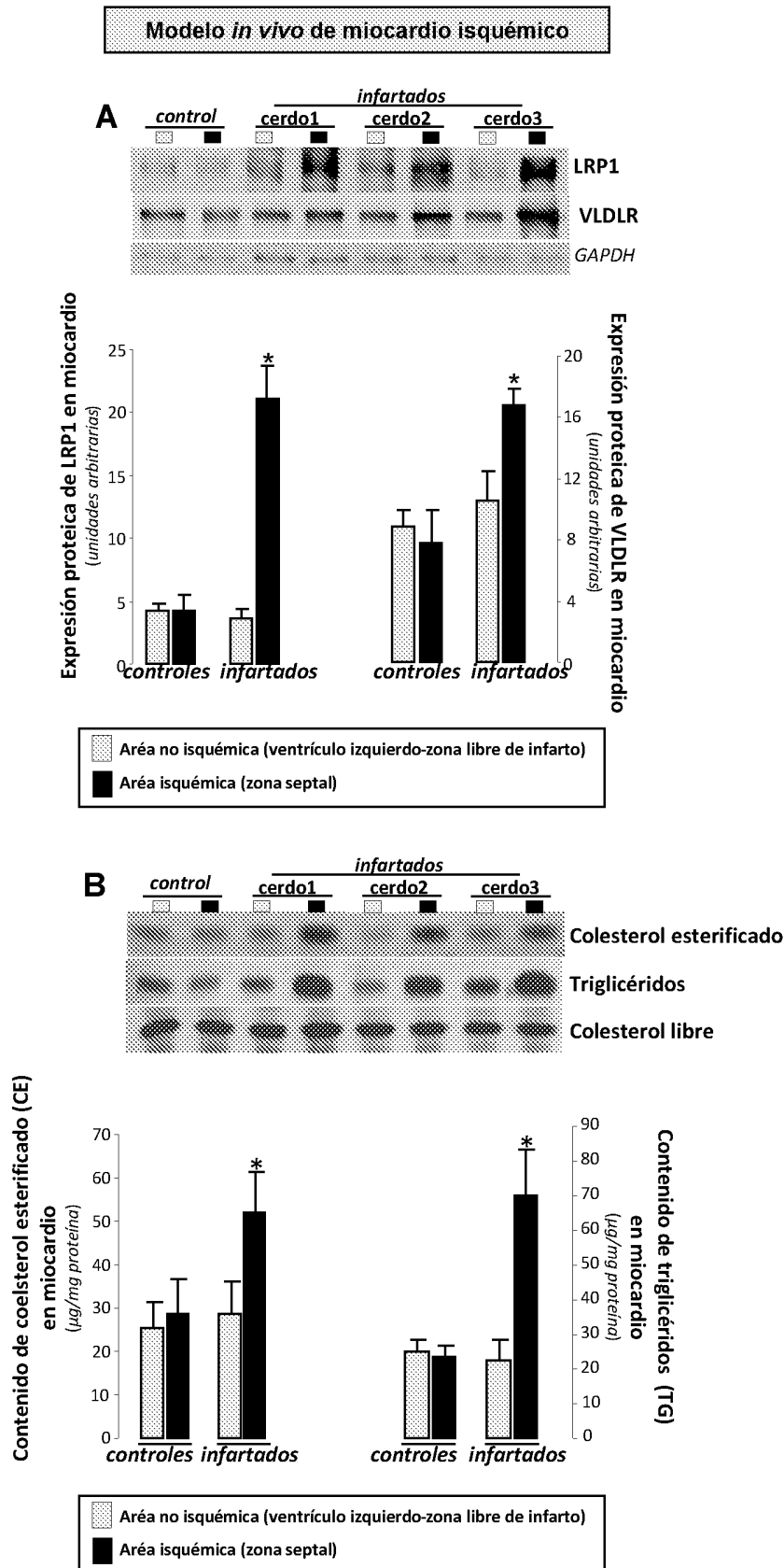
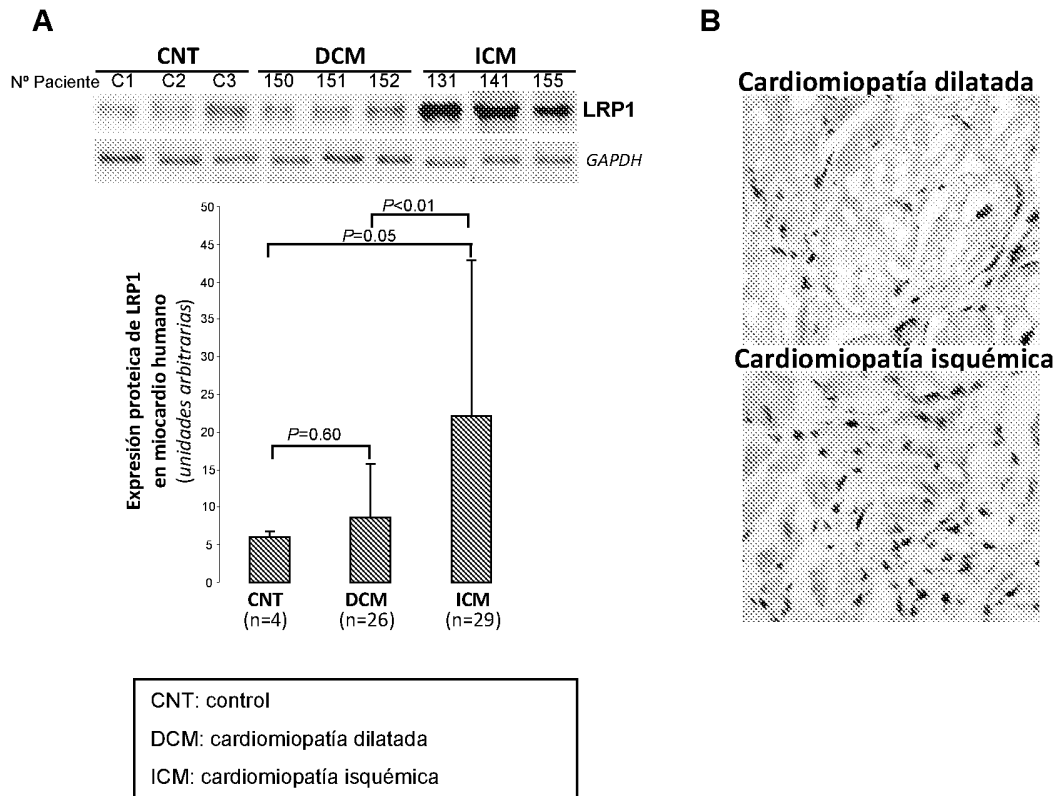
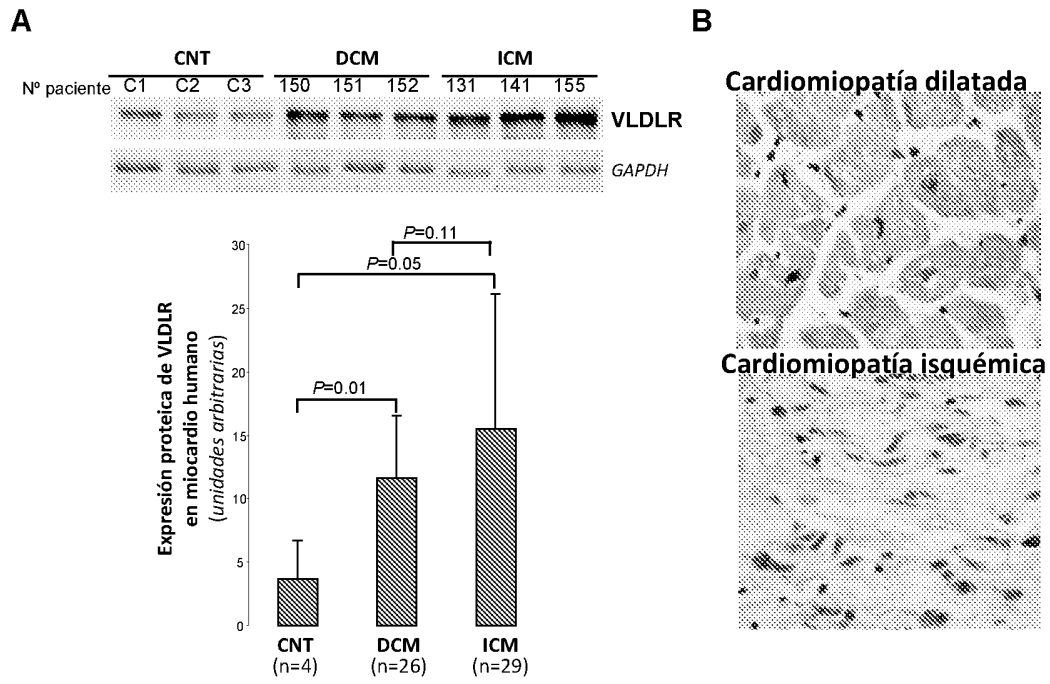


Fig. 8



**Fig. 9**



CNT: control  
 DCM: cardiomiopatía dilatada  
 ICM: cardiomiopatía isquémica



Fig. 10

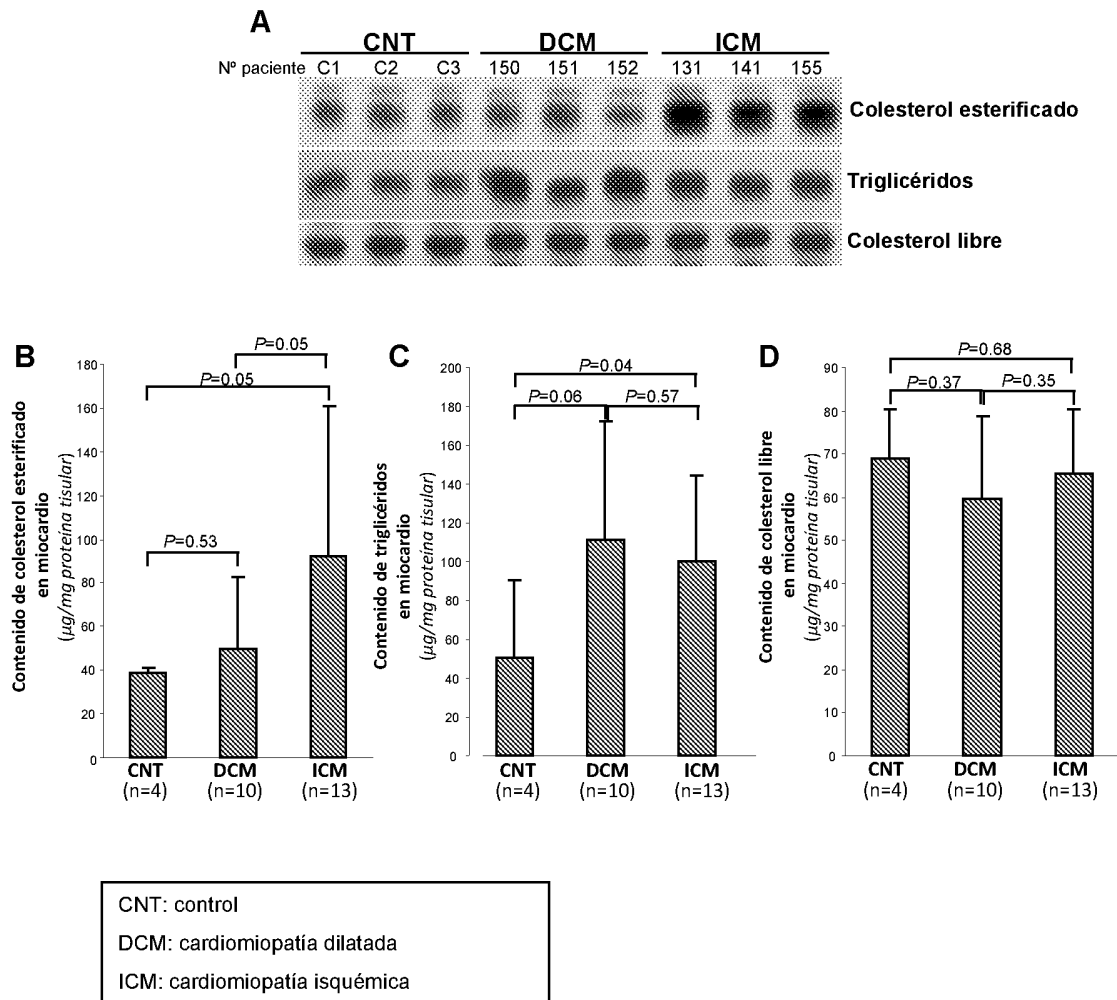


Fig. 11

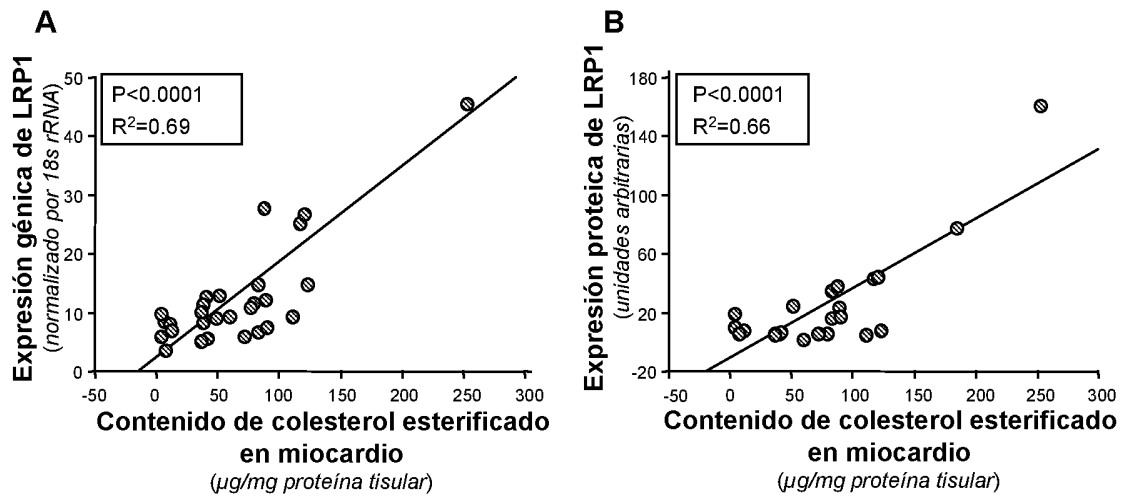


Fig. 12

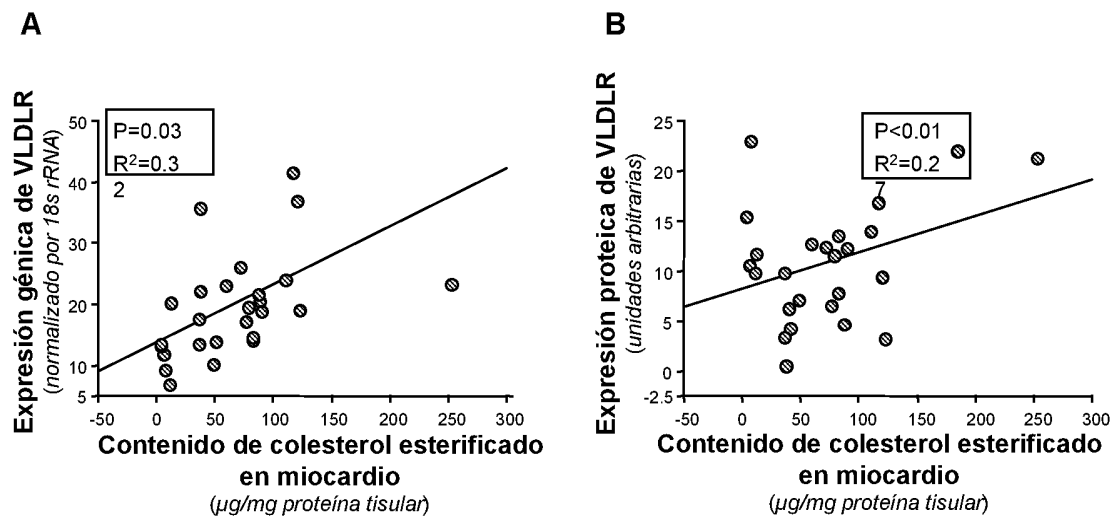
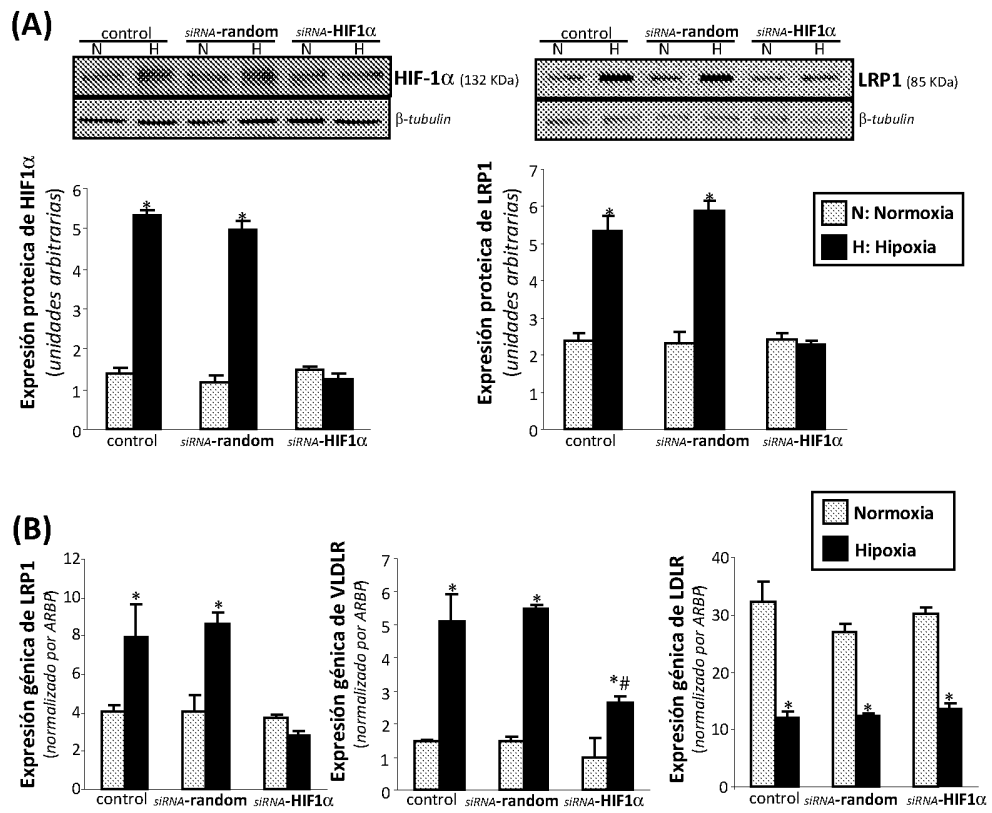


Fig 13



**Fig. 14**

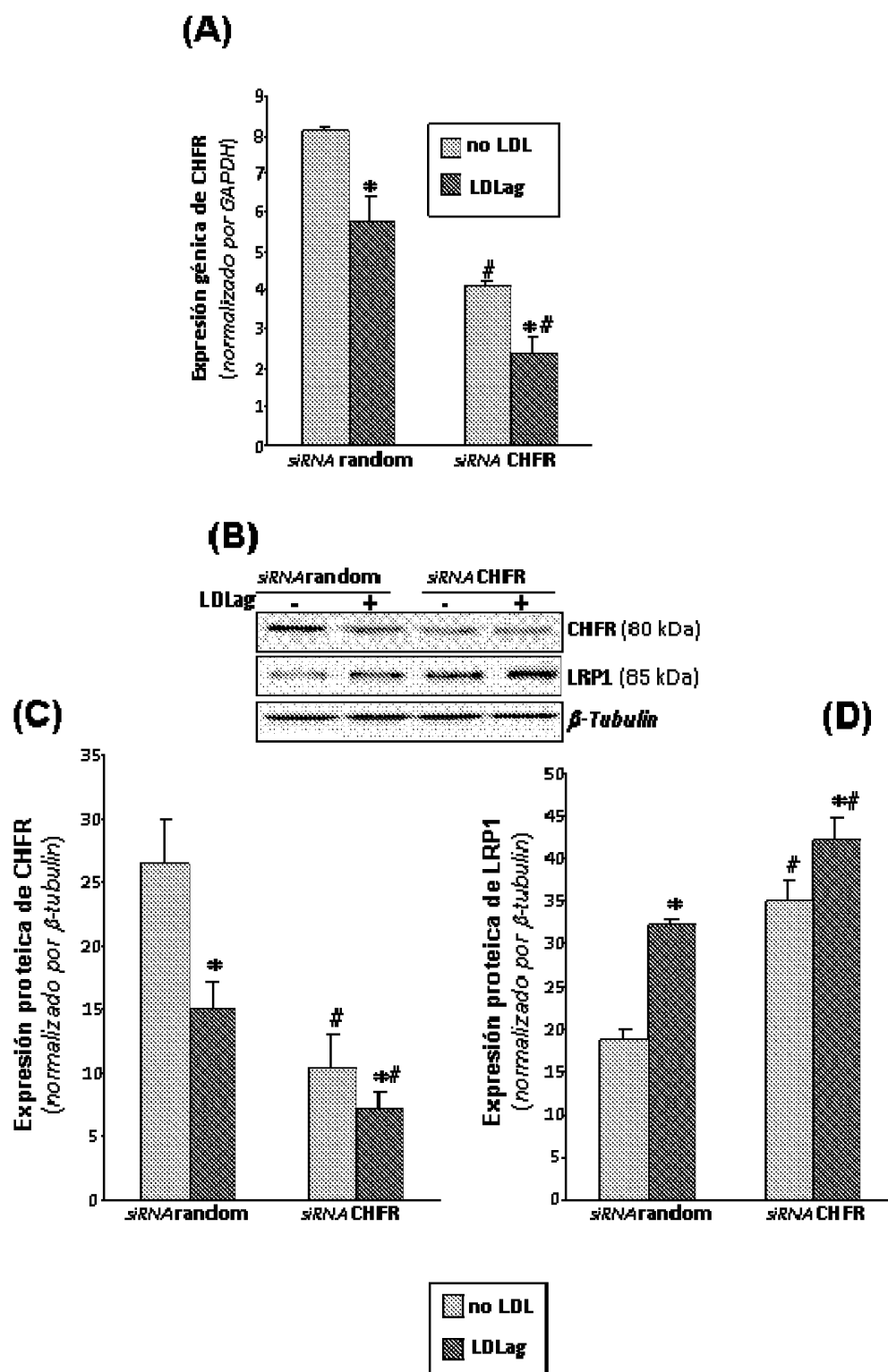


Fig. 15

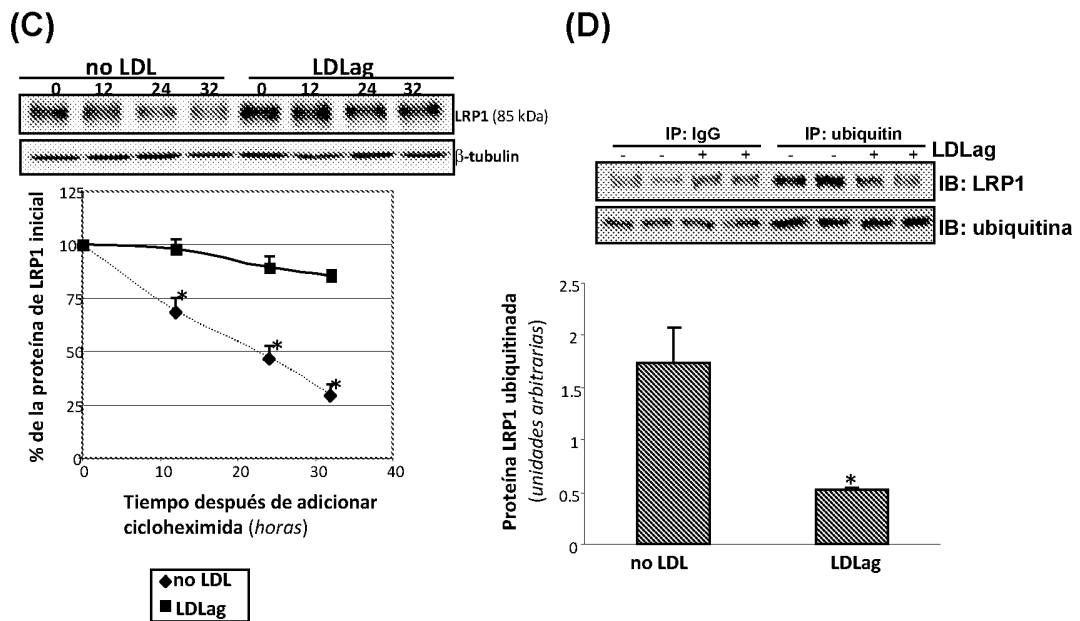
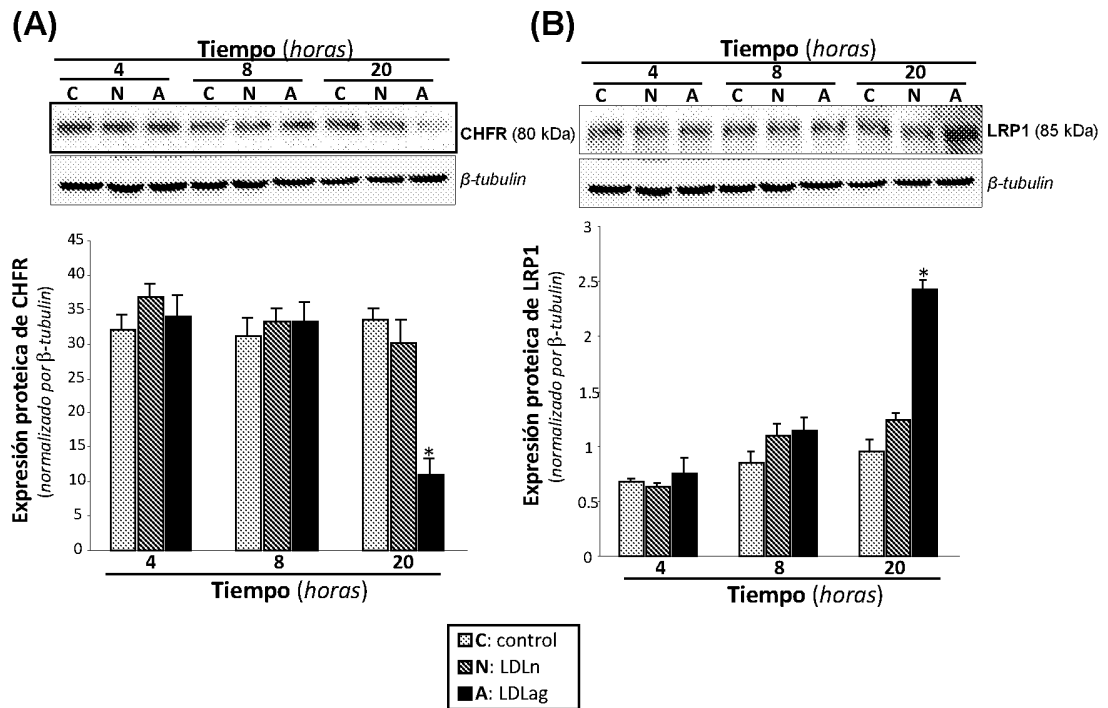


Fig. 16

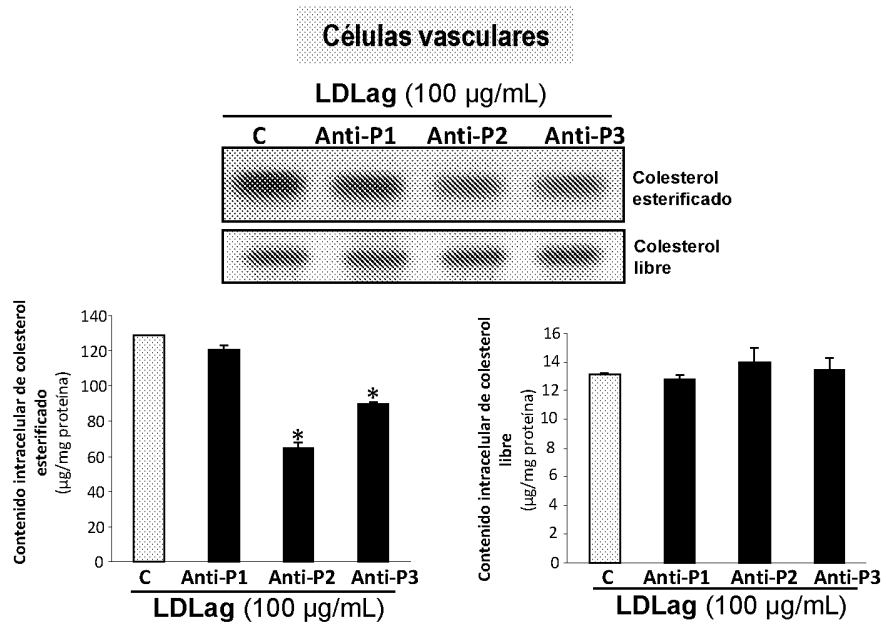
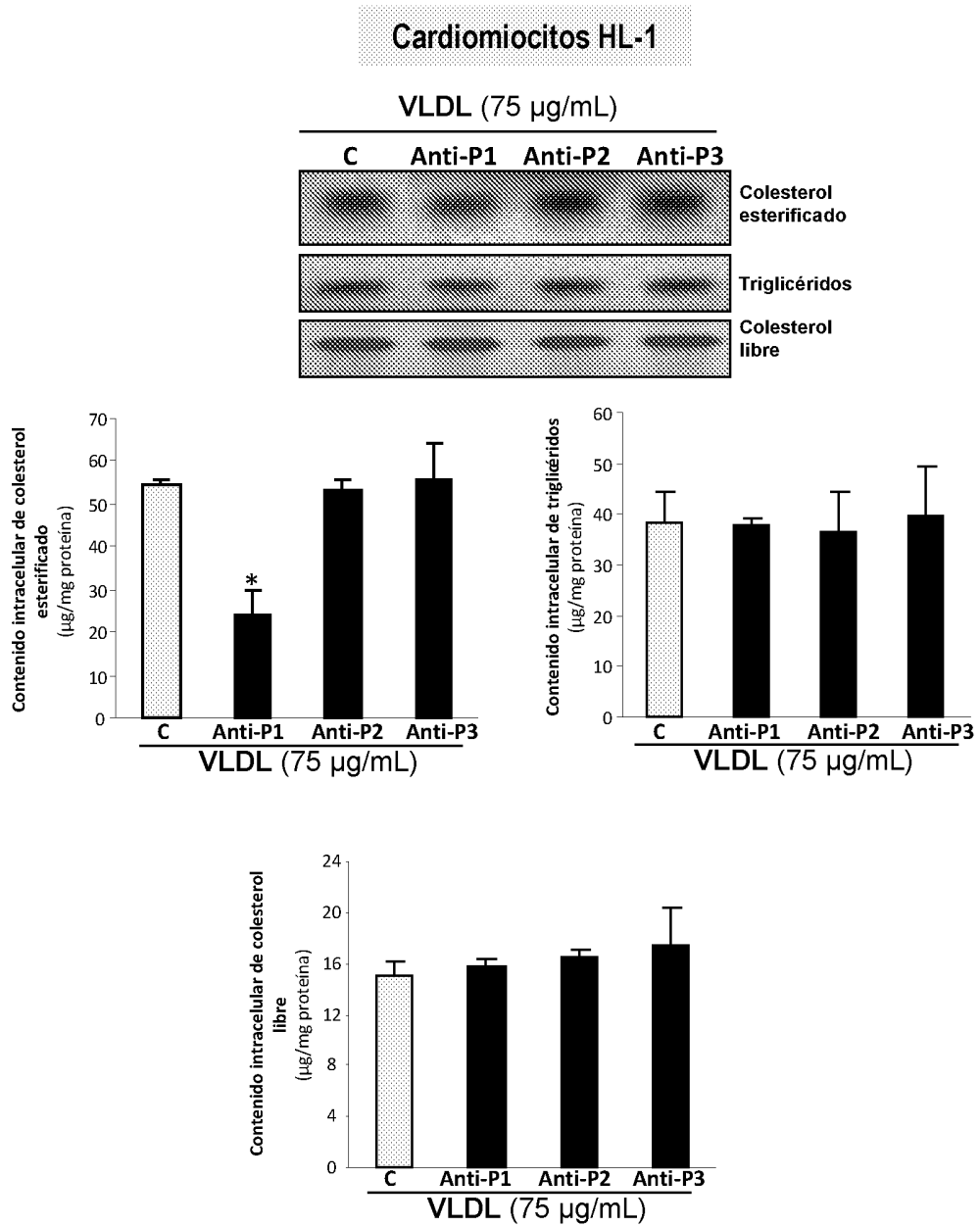


Fig. 17



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070483

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**See extra sheet**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12N, C07K, A61P, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CAPLUS**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	CAL R. ET AL., "Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesterol ester uptake and accumulation in cardiomyocytes", Cardiovascular Research (2012) 94, 469-479 (publicado in línea 27 March 2012), the whole document.	1-7, 13-15
A	LLORENTE-CORTÉS V. ET AL., "LDL Receptor-Related Protein Mediates Uptake of Aggregated LDL in Human Vascular Smooth Muscle Cells", Arterioscler Thromb Vasc Biol (2000), 20:1572-1579. todo el document.	1-7, 13-15
A	LLORENTE-CORTÉS V. ET AL., "Cholesterol Esters of Aggregated LDL Are Internalized by Selective Uptake in Human Vascular Smooth Muscle Cells", Arterioscler Thromb Vasc Biol. (2006), 26:117-123. Citado in the application. the whole document.	1-7, 13-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
30/10/2012

Date of mailing of the international search report  
(06/11/2012)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
M. Hernandez Cuellar

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498409



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070483

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LLORENTE-CORTÉS V. ET AL., "Adipocyte differentiation-related protein is induced by LRP1-mediated aggregated LDL internalization in human vascular smooth muscle cells and macrophages" Journal of Lipid Research (2007), 48, 2133-2140. Citado in lasolicitud. the whole document.	1-7, 13-15
A	CASTELLANO J. ET AL., "Hypoxia Stimulates Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Expression Through Hypoxia-Inducible Factor-1 in Human Vascular Smooth Muscle Cells" Arterioscler Thromb Vasc Biol. (2011) 31:1411-1420. (publicado en línea 31 March 2011), the whole document.	1-7, 13-15
A	FUENTEALBA R. ET AL., "Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 Promotes Anti-apoptotic Signaling in Neurons by Activating Akt Survival Pathway" Journal of Biological Chemistry (2009) vol. 284, n° 49, pág. 469-479. the whole document.	1-7, 13-15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070483

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12N15/113* (2010.01)

*C07K14/705* (2006.01)

*A61P9/10* (2006.01)

*A61K48/00* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070483

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

### Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C07K, A61P, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CAPLUS

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	CAL R. ET AL., "Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesterol ester uptake and accumulation in cardiomyocytes", Cardiovascular Research (2012) 94, 469-479 (publicado en línea 27 Marzo 2012), todo el documento.	1-7, 13-15
A	LLORENTE-CORTÉS V. ET AL., "LDL Receptor-Related Protein Mediates Uptake of Aggregated LDL in Human Vascular Smooth Muscle Cells", Arterioscler Thromb Vasc Biol (2000), 20:1572-1579. todo el documento.	1-7, 13-15
A	LLORENTE-CORTÉS V. ET AL., "Cholesterol Esters of Aggregated LDL Are Internalized by Selective Uptake in Human Vascular Smooth Muscle Cells", Arterioscler Thromb Vasc Biol. (2006), 26:117-123. Citado en la solicitud. todo el documento.	1-7, 13-15

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
30/10/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**06 de noviembre de 2012 (06/11/2012)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
M. Hernandez Cuellar  
Nº de teléfono 91 3498409

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070483

## Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones n°s:  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
  
2.  Las reivindicaciones n°s: **1-7 y 13-15 (en parte)**  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

**(Ver hoja adicional)**

3.  Las reivindicaciones n°s:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

## Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

**(Ver hoja adicional)**

1.  Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4.  Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s: **1-7 y 13-15 (parcialmente)**

### Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070483

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	<p>LLORENTE-CORTÉS V. ET AL., “Adipocyte differentiation-related protein is induced by LRP1-mediated aggregated LDL internalization in human vascular smooth muscle cells and macrophages” Journal of Lipid Research (2007), 48, 2133-2140. Citado en la solicitud. todo el documento.</p>	1-7, 13-15
A	<p>CASTELLANO J. ET AL., “Hypoxia Stimulates Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Expression Through Hypoxia-Inducible Factor-1 in Human Vascular Smooth Muscle Cells” Arterioscler Thromb Vasc Biol. (2011) 31:1411-1420. (publicado en línea 31 marzo 2011), todo el documento.</p>	1-7, 13-15
A	<p>FUENTEALBA R. ET AL., “Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 Promotes Anti-apoptotic Signaling in Neurons by Activating Akt Survival Pathway” Journal of Biological Chemistry (2009) vol. 284, nº 49, pág. 469-479. todo el documento.</p>	1-7, 13-15

**CLASIFICACIONES DE INVENCION**

*C12N15/113* (2010.01)

*C07K14/705* (2006.01)

*A61P9/10* (2006.01)

*A61K48/00* (2006.01)

**CONTINUACION DE RECUADRO II**

Las reivindicaciones, tal y como se encuentra redactadas, no cumplen los requisitos establecidos en el Art.6 PCT.El término agente modulador de la expresión y/la función de LRP1 es un término ambiguo que no define con claridad el objeto de la reivindicaciones.

Los productos de la presente solicitud están caracterizados funcionalmente. El solicitante debe tener en cuenta que un producto en la medida de lo posible, como es el caso, debe definirse por sus características estructurales. El alcance de la materia reivindicada excede el alcance de la materia divulgada en la descripción. En este sentido se ha realizado una búsqueda de las reivindicaciones 1-7 y 13-15 en la medida en que se refieren al lentivirus RNAi1919, que incorpora las secuencias SEQ ID No: 1 y SEQ ID No: 2 ; el lentivirus RNAi8223 que incorpora las secuencias SEQ ID No: 3 y SEQ ID No: 4; y el lentivirus RNAi8531 que incorpora las secuencias SEQ ID No: 5 y SEQ ID No: 6.

**CONTINUACIÓN DE RECUADRO III**

La presente solicitud de patente internacional no satisface el requisito de unidad de invención. En esta solicitud se reivindican tres tipos de productos diferentes caracterizados por ser moduladores de la expresión y/o de la función de LRP1. En primer lugar los productos de la presente solicitud está caracterizados funcionalmente. El solicitante debe tener en cuenta que un producto en la medida de lo posible, como es el caso, debe definirse por sus características estructurales. En cualquier caso, la actividad comun de estos productos no se puede considerar el único objeto inventivo comun bajo el cual se pretenden reivindicar los diferentes productos.

En este sentido se han identificado 3 grupos de invenciones:

I) Reivindicaciones 1-7 y 13-15 en la medida en que se refieren al lentivirus RNAi1919, que incorpora las secuencias SEQ ID No: 1 y SEQ ID No: 2 ; el lentivirus RNAi8223 que incorpora las secuencias SEQ ID No: 3 y SEQ ID No: 4; y el lentivirus RNAi8531 que incorpora las secuencias SEQ ID No: 5 y SEQ ID No: 6.

II) Reivindicaciones 1-4, 8-9 y 13-15 en la medida en que se refieren al anticuerpo monoclonal

III) Reivindicaciones 1-4, 10-15, en la medida en que se refieren al siRNA