

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 487**

51 Int. Cl.:

A61K 31/711 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 38/29 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2018** **PCT/EP2018/058828**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2018** **WO18185270**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2018** **E 18717883 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024** **EP 3606537**

54 Título: **Inhibidores de microARN 19a/19b para su uso en el tratamiento de una afección patológica asociada con pérdida ósea o función muscular reducida**

30 Prioridad:

06.04.2017 LU 100182

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

03.12.2024

73 Titular/es:

SIRANA PHARMA GMBH (100.0%)
Goethestrasse 52
80336 München, DE

72 Inventor/es:

HESSE, ERIC;
TAIPALEENMÄKI, HANNA y
SAITO, HIROAKI

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 991 487 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de microARN 19a/19b para su uso en el tratamiento de una afección patológica asociada con pérdida ósea o función muscular reducida

- 5 La invención se relaciona con inhibidores de los microARN 19a y 19b y su uso para tratar o prevenir condiciones o enfermedades las cuales están asociadas con pérdida ósea, en particular osteoporosis y osteogénesis imperfecta (OI, por sus siglas en inglés). Los inhibidores también son útiles para inducir un efecto anabólico en hueso, ya sea solo o cuando se administran en combinación con hormona paratiroidea o un fragmento recombinante de la misma. La invención se relaciona adicionalmente con inhibidores de los microARN 19a y 19b y su uso para tratar o prevenir condiciones o enfermedades las cuales están asociadas con función muscular reducida, en particular degeneración muscular y atrofia muscular. Los inhibidores también son útiles para estabilizar y/o reforzar la función muscular. Además, los inhibidores de los microARN 19a y 19b se pueden usar para tratar o prevenir destrucción ósea relacionada con cáncer o metástasis ósea.

CAMPO DE LA INVENCION

- 15 La osteoporosis es la enfermedad más prevalente del sistema músculo esquelético en mujeres y hombres, con frecuencia dando como resultado fracturas por fragilidad. Estas fracturas con frecuencia incrementan la morbilidad y mortalidad especialmente en ancianos y por lo tanto representan una gran carga médica y socioeconómica. Aunque el hueso es un tejido altamente dinámico constantemente desmantelado y reconstruido durante la vida por osteoclastos de resorción ósea y osteoblastos formadores de hueso, estos procesos están estrechamente acoplados y equilibrados para mantener constante la masa ósea. Al aumentar la edad, la resorción ósea aumenta mientras que la formación ósea disminuye, lo que da como resultado una reducción de la masa ósea y, finalmente, osteoporosis.

- 20 Los medicamentos que bloquean la resorción bien establecidos como los bifosfonatos o un anticuerpo neutralizante de RANKL (Denosumab^{MR}) proporcionan soluciones terapéuticas a la osteoporosis al inhibir la actividad de los osteoclastos, para de esta manera evitar pérdida adicional de la masa ósea. En contraste, la administración de un fragmento recombinante de la hormona paratiroidea (denominado como PTH 1-34 o teriparatida (Forteo^{MR}/Forsteo^{MR}) en la literatura) actualmente es el único tratamiento osteoanabólico disponible. No obstante, la terapia de PTH requiere inyecciones diarias del fragmento 1-34 de PTH, y el tratamiento se limita a un periodo de tiempo general de 24 meses debido a preocupaciones por seguridad. En consecuencia, existe la necesidad de terapias adicionales que eviten la pérdida ósea y/o que resulten en un incremento de la masa ósea y la densidad de los huesos.

- 30 Los microARN (miARN) son ARN no codificantes que pueden bloquear la expresión de genes que codifican para proteínas. Se ha encontrado que los miARN son codificados en el genoma de numerosos organismos, que incluyen animales mamíferos y que no son mamíferos. Los miARN son capaces de unión a la región no traducida 3' (3'-UTR) del ARNm de un gen objetivo debido a su complementariedad de bases. Con base en la complementariedad de la secuencia de unión y las proteínas involucradas, los miARN inhiben la traducción del ARNm o inducen la descomposición del ARNm. La complementariedad parcial de bases entre el miARN y el ARNm similar normalmente resulta en inhibición de la traducción del ARNm, mientras que la complementariedad perfecta de bases induce degradación de ARNm.

- 35 Los miARN habitualmente tienen una longitud de 18 a 24 nucleótidos y son producidos por procesamiento paulatino de moléculas precursoras. Los miARN son transcritos por polimerasa II o III ya sea a partir de genes codificantes o intrones. El transcrito primario que resulta de la transcripción de los genes se denomina como microARN primario (pri-miARN). Tiene una longitud de 500 a 3000 nucleótidos y transporta un remate de 7-metilguanosina en el extremo 5' y una cola poli-A en el extremo 3'. El pri-miARN es procesado por la enzima ribonucleasa III Drosha y la proteína de unión a dsARN, DGCR8 en el núcleo de la célula a un microARN precursor (pre-miARN) de una longitud de 70 a 80 nucleótidos. El pre-miARN forma una estructura de horquilla característica y se exporta a través de los poros nucleicos al citoplasma en donde es procesado por la enzima ribonucleasa III Dicer en los ds-miARN de una longitud entre 17 a 24 nucleótidos. Dicer interactúa con una proteína que une específicamente a ds-miARN para desenrollar estas cadenas dobles. Los ss-miARN resultantes pueden interferir con la expresión del ARNm objetivo respectivo.

- 45 Se ha reportado que varios miARN están involucrados en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y de desarrollo. Recientemente, los miARN han adquirido atención considerable como objetivos terapéuticos potenciales para tratar enfermedades como hepatitis C [1], leucemia linfocítica crónica [2], cáncer colorrectal [3], obesidad [4] o esquizofrenia [5].

- 50 La presente invención se basa en la percepción de que miARN-19a y miARN-19b están involucrados en la regulación de formación de hueso y que la inhibición de estos miARN es una manera altamente eficiente de evitar o reducir pérdida ósea. En consecuencia, la inhibición de estos miARN es útil para tratar enfermedades como osteoporosis las cuales están asociadas con una pérdida de la masa ósea. Los inhibidores de miARN-19a y miARN-19b ejercen un efecto anabólico y pueden ser usados solos o en combinación entre sí. En una realización preferida, uno o más inhibidores de miARN-19a y/o miARN-19b se usan en combinación con la hormona paratiroidea o un fragmento de la misma, como por ejemplo PTH 1-34 para un efecto anabólico óseo incrementado. La invención muestra adicionalmente que miARN-19a y miARN-19b

están involucrados en la regulación de regeneración de músculo, y en particular en la prevención de masa muscular reducida, fuerza y/o desempeño. Como se muestra en los ejemplos más adelante, la inhibición de estos miARN es eficaz para evitar la pérdida en la función muscular bajo diversas condiciones. La inhibición de estos miARN por lo tanto es útil para tratar enfermedades como distrofia muscular, atrofia muscular, sarcopenia o caquexia, como por ejemplo caquexia inducida por cáncer. La invención muestra adicionalmente que los inhibidores de miARN-19a y miARN-19b se pueden usar para la prevención o tratamiento de destrucción ósea inducida por cáncer y metástasis ósea, en particular metástasis por cáncer de mama a hueso.

SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención proporciona un inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b para uso en un procedimiento para tratar una enfermedad que está asociada con pérdida ósea. Una enfermedad la cual está asociada con un grado patológico de pérdida ósea puede ser, por ejemplo, una enfermedad que está caracterizada por formas anormales de resorción ósea y/o formación de hueso en condiciones de un recambio óseo elevado. En la presente se demuestra más adelante que la inhibición de microARN 19a y/o microARN 19b resulta en un fuerte efecto anabólico óseo lo cual demuestra la utilidad de los inhibidores de microARN 19a y/o microARN 19b para tratar enfermedades y condiciones en las cuales se produce un nivel patológico de pérdida ósea. Estas enfermedades y condiciones incluyen en particular osteoporosis y osteogénesis imperfecta (OI). De esta manera, en un aspecto preferido, la enfermedad y condición que va a ser tratada por los inhibidores de microARN 19a y/o microARN 19b es osteoporosis. Como se usa en la presente, el término "osteoporosis" incluye todas las formas de osteoporosis, como por ejemplo osteoporosis primaria, secundaria y postmenopáusica. También se incluyen osteoporosis inducida por deficiencia de esteroide sexual y osteoporosis inducida por glucocorticoide. Los inhibidores también son útiles para tratar condiciones las cuales requieren un efecto anabólico óseo. Por ejemplo, el uso temporal de los inhibidores en pacientes con fracturas óseas pueden ayudar al proceso de sanado natural por inducción de masa ósea. En un aspecto preferido, el inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b se usa solo, es decir, sin ningún otro ingrediente activo adicional. En otro aspecto preferido, el inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b se usa en combinación con hormona paratiroidea o un fragmento de la misma, como por ejemplo PTH 1-34. El inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b aumenta eficazmente el efecto anabólico óseo conferido por PTH 1-34.

En otro aspecto, la invención proporciona un inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b para uso en un procedimiento para tratar una enfermedad que está asociada con la pérdida en la masa o función muscular. Se ha encontrado por los presentes inventores que inhibir la expresión de microARN 19a y/o microARN 19b incrementa de manera significativa o restaura la función muscular. Por lo tanto, los inhibidores de microARN 19a y/o microARN 19b de igual manera son adecuados para uso terapéutico en el tratamiento de enfermedades como distrofia muscular o atrofia muscular. En un aspecto preferido, los inhibidores de microARN 19a y/o microARN 19b se usan para tratamiento de distrofia muscular, sarcopenia, caquexia, como por ejemplo caquexia inducida por cáncer o atrofia muscular. En otro aspecto preferido, los inhibidores de microARN 19a y/o microARN 19b se usan para tratar una pérdida de la función muscular que está asociada con osteoporosis, como por ejemplo osteoporosis inducida por deficiencia de esteroide sexual o inducida por glucocorticoide. En otro aspecto preferido, los inhibidores de microARN 19a y/o microARN 19b se usan para tratar la pérdida de la función muscular que está asociada con metástasis a hueso de cáncer de mama. En otro aspecto preferido adicional, los inhibidores de microARN 19a y/o microARN 19b se usan para tratar la pérdida de la función muscular que está asociada con osteogénesis imperfecta (OI). En otro aspecto preferido adicional, los inhibidores de microARN 19a y/o microARN 19b se usan para tratar la pérdida de la función muscular que está asociada con una distrofia muscular, en particular distrofia muscular hereditaria debido a una mutación del gen distrofina, por ejemplo, de tipo Duchenne o de tipo Becker-Kiener.

En otro aspecto, la invención proporciona un inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b para uso en un procedimiento para prevenir o tratar destrucción ósea relacionada con cáncer. Se ha encontrado en la presente que los inhibidores de microARN 19a y/o microARN 19b inhiben eficazmente la proliferación de células de cáncer de mama metastásicas MDA-MB-231 destructoras de hueso. En consecuencia, los inhibidores de microARN 19a y/o microARN 19b se pueden usar para el tratamiento terapéutico o la prevención de osteólisis relacionada con cáncer, el tratamiento o prevención de metástasis ósea, como por ejemplo metástasis ósea que se origina de cáncer de mama.

En una realización preferida particular, la invención proporciona un inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b para uso en un procedimiento para tratar osteogénesis imperfecta (OI). La osteogénesis imperfecta, también conocida como enfermedad de huesos quebradizos, es un trastorno genético raro que afecta los huesos, la cual es causada por una o más mutaciones en el gen que codifica para colágeno tipo I. Se han identificado varias mutaciones y subtipos que provocan OI. Las personas con OI pueden presentar huesos rotos con poco o nulo traumatismo. La OI puede variar desde muy grave a ligera. Los individuos con el tipo más grave de OI pueden morir al nacer. Las personas con OI grave quienes sobreviven pueden tener brazos y piernas curvados, estatura muy corta y ser incapaces de caminar. Las personas con la forma más ligera de OI únicamente se rompen los huesos ocasionalmente y tienen una altura y una duración de vida normales. Las rupturas pueden presentarse en cualquier hueso, pero son más comunes en los brazos y las piernas. La norma de

cuidado actual para los tipos graves de OI involucra el uso de biofosfonatos y cirugía para colocar varillas en los huesos para volverlos más resistentes. El tratamiento contra la resorción por medio de bifosfonatos se dirige a una reducción de la resorción ósea dependiente de osteoclastos. Al reducir la resorción, se obtiene una masa ósea superior. Aunque la calidad del hueso permanece pobre, una masa ósea más grande significa reducción en el riesgo de fracturas. Además, se ha demostrado que los agentes formadores de hueso son eficaces en incrementar aún más la masa ósea y actualmente se están examinando en ensayos clínicos. Puesto que los inhibidores de microARN 19a y/o microARN 19b se han mostrado en la presente que mejoran la formación ósea y la masa ósea bajo diversas condiciones, serán adecuadas para el tratamiento de OI.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se sabe que microARN 19a y/o 19b se expresan a partir del grupo policistrónico miR-17~92, el cual contiene los miARN 17, 18, 19a, 20a, 19b-1 y 192. algunos de estos microARN previamente se han relacionado con cáncer en humanos.

La invención propone el uso de inhibidores de microARN 19a y/o 19b para tratar enfermedades que estén asociadas ya sea con pérdida ósea o función muscular reducida. Aunque la invención no está limitada en este aspecto, se prefiere que el sujeto quien padece de enfermedades o condiciones sea un sujeto humano. Preferiblemente, el sujeto tendrá por lo menos 30 años de edad, preferiblemente por lo menos 40 años de edad, por lo menos 45 años de edad, por lo menos 50 años de edad, por lo menos 55 años de edad, por lo menos 60 años de edad o por lo menos 65 años de edad.

En principio, cualquier tipo de molécula se puede usar la cual interfiera con microARN 19a y/o microARN 19b en o sus pre-miARN para reducir o bloquear la expresión o la función de cualquiera de estos microARN o sus pre-miARN correspondientes. Se prefiere que los inhibidores usados en la presente sean moléculas de ácido nucleico, como por ejemplo moléculas de ácido ribonucleico (ARN) o de ácido desoxirribonucleico (ADN) o derivados de los mismos los cuales han sido modificados como se explica más adelante. Se prefiere particularmente que los inhibidores sean oligonucleótidos de ADN o ARN que comprenden o que consisten de una secuencia que permite que hibridicen a sus miARN similares, es decir, microARN 19a y/o microARN 19b, para formar un duplex que evita la unión de los microARN a su ARNm objetivo. Se conocen por las personas expertas en el ámbito otras técnicas para la inhibición de microARN 19a y/o microARN 19b o sus pre-miARN e incluyen esponjas de microARN, anti-microARN basados en Lentivector (miRZip) en inhibidores de señuelo fuerte.

Como se usa aquí, el término "oligonucleótido" se refiere aun oligómero o polímero de monómeros nucleotídicos. De acuerdo con la invención, el oligonucleótido puede ser de cualquier longitud, pero de modo preferible tendrá una longitud de 8 a 50 nucleótidos, de manera más preferible de 10 a 40 nucleótidos, de 12 a 30 nucleótidos, de 15 a 25 nucleótidos y, de manera más preferible, de 18 a 24 nucleótidos. Por ejemplo, el oligonucleótido puede tener una longitud de 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 o 50 nucleótidos. Para algunas aplicaciones, el oligonucleótido también puede comprender más de 50 nucleótidos, por ejemplo 60, 70, 80, 90 o 100 nucleótidos. El oligonucleótido puede ser una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla, de cadena doble o parcialmente de cadena doble. Los procedimientos para producir oligonucleótidos se conocen ampliamente y comprenden síntesis química o procedimientos basados en PCR.

El oligonucleótido preferiblemente consistirá de monómeros nucleotídicos que se unan juntos por puentes fosfodiéster. No obstante, también es posible usar oligómeros o polímeros en los cuales la estructura principal azúcar-fosfato ha sido sustituida con estructuras funcionalmente similares, por ejemplo, con una estructura principal peptídica o con una estructura principal fósforoamida, tiofosfato, metil-fosfonato o ditiofosfato. En algunos casos, estas modificaciones resultan en una resistencia aumentada del oligonucleótido contra la descomposición enzimática por nucleasas después de administración en el sujeto que va a ser tratado.

Además, los oligonucleótidos que tienen uno o más residuos azúcar modificados también están cubiertos por la invención. Por ejemplo, uno o más grupos hidroxilo pueden estar sustituidos con halógenos o grupos alifáticos o pueden ser funcionalizados con éteres, aminas o estructuras similares. En una realización preferida, el oligonucleótido comprende uno o más azúcares en los cuales el hidroxilo 2' ha sido modificado mediante la adición de un grupo metilo (OMe) o un grupo metoxi-etilo (MOE). Estas modificaciones de azúcar proporcionan una estabilidad y resistencia mayores contra la descomposición enzimática.

El oligonucleótido de la invención también puede comprender bases modificadas, junto con o en vez de las bases que se presentan de modo natural adenina, guanina, timina, citosina y uracilo. Estas bases modificadas comprenden, por ejemplo, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metiladenina, 6-metilguanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 2-tiocitocina, 5-halouracilo, 5-halocitosina, 5-propionil-uracilo, 5-propionilcitosina, 6-azouracilo, 6-azocitocina, 6-azotimina, 5-uracilo, 4-tiouracilo, 8-tioalquiladenina, 8-hidroxiladeninas, 8-tioladenina, tioalquilguanina, 8-hidroxilguanina, 8-tiolguanina, 7-metilguanina, 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, 3-desazaguanina y/o 3-desazaadenina.

Además de los anteriores, los oligonucleótidos de la invención también pueden comprender una o más modificaciones en sus partes terminales 3' y/o 5'. Por ejemplo, uno o ambos de las partes terminales pueden estar enlazadas a grupos de protección que vuelven a los oligonucleótidos menos susceptibles a descomposición enzimática por nucleasas.

5 Preferiblemente, los inhibidores de microARN 19a y/o microARN 19b son sustancialmente complementarios a microARN 19a y/o microARN 19b. La secuencia de los inhibidores microARN 19a (5'-TGCATAGATTTCAC-3') y anti-microARN 19b (5'-TGCATGGATTTCAC-3') se establecen en la SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2, respectivamente. La secuencia del microARN 19a y microARN 19b se establecen en la SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4, respectivamente. Un oligonucleótido es sustancialmente complementario a cualquiera de estas secuencias si comprende por lo menos 70% de identidad de secuencia sobre un tramo de por lo menos 10, 12, 14, 16, 18 o 20 nucleótidos. Preferiblemente, el oligonucleótido tiene
10 por lo menos 70% de identidad de secuencia sobre un tramo de 20 nucleótidos. Preferiblemente, la identidad de secuencia es por lo menos 80%, por lo menos 90% o por lo menos 95%. Se prefiere particularmente que el oligonucleótido sea completamente complementario sobre un tramo de por lo menos 10, 12, 14, 16, 18, o 20 nucleótidos. En una realización, la región de complementariedad tendrá menos de 5 discrepancias, por ejemplo 4, 3, 2 o 1 discrepancias.

En un aspecto particularmente preferido, el inhibidor de microARN 19a y/o microARN es un ADN que comprende:

- 15 (a) la secuencia de la SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2, o
- (b) el complemento de la secuencia de la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2, o
- (c) una variante de cualquiera de las secuencias de los incisos (a) o (b) el cual tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia con el mismo y es capaz de hibridizar con microARN 19a y/o microARN 19b.

20 Los inhibidores descritos en lo anterior preferiblemente se administran como una composición farmacéutica. Así, en otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden: (a) un inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b, como por ejemplo un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico, y (b) un portador farmacéuticamente aceptable. Como se describe en lo anterior, el inhibidor preferiblemente será una molécula de ADN o ARN. En un aspecto, la composición farmacéutica preferiblemente es para uso en un procedimiento para tratar una enfermedad que está asociada con pérdida ósea. En otro aspecto, la composición farmacéutica preferiblemente es para
25 uso en un procedimiento para tratar una enfermedad que está asociada con la pérdida de la función muscular.

La preparación de las composiciones farmacéuticas que comprenden inhibidores basados en ácido nucleico es bien conocido por aquellos quienes trabajan en el campo del ámbito farmacéutico. Típicamente, estas composiciones se preparan para inyección ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. El inhibidor farmacéuticamente activo se puede mezclar con excipientes que sean compatibles con los inhibidores cuando se usan en pacientes humanos.
30 Las composiciones farmacéuticas de la invención normalmente comprenden un portador fisiológicamente aceptable junto con las moléculas inhibidoras de microARN disueltas o dispersadas en los mismos, como un ingrediente activo.

Los portadores farmacéuticamente aceptables comprenden, por ejemplo, agua, solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa. Los portadores adecuados adicionales para composiciones que comprenden los inhibidores de microARN se describen en libros de texto convencionales, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack
35 Pub. Co., New Jersey (1991). Además de un portador, la composición farmacéutica de la invención también puede comprender agentes humectantes, agentes amortiguadores, estabilizantes, tintes, conservadores y similares en cualquiera concentración con la condición de que estos compuestos no interfieran con la actividad inhibidora de los inhibidores de microARN de la invención.

40 Diversas vías de administración son factibles para proporcionar los inhibidores de microARN al sitio que requiere tratamiento. La composición farmacéutica se puede formular, por ejemplo, para administración parenteral. La administración parenteral incluye la administración intravenosa, intradérmica, intraarterial, subcutánea, tópica, transmucosal, transdérmica o rectal. De acuerdo con una realización preferida particularmente, la composición farmacéutica se formula para inyección o infusión.

45 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección normalmente incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La composición de modo adicional puede ser más estable bajo condiciones regulares de fabricación y almacenamiento. Para mantener la esterilidad, la composición farmacéutica normalmente incluye conservadores como por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares, para suprimir el crecimiento microbiano en el producto. Para administración intravenosa o intraarterial, los portadores adecuados pueden incluir solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL^{MR} (BASF) o solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). El
50 portador también puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Una absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede obtener al incluir en la composición un agente que retrase la

- absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles al incorporar los inhibidores de microARN en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o más de los ingredientes mencionados en lo anterior seguido por esterilización por filtración. De modo similar, se preparan dispersiones al incorporar los inhibidores de microARN dentro de un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión y
- 5 proporcionar los inhibidores de microARN en forma de un polvo estéril por procedimientos conocidos en el ámbito como por ejemplo secado al vacío o liofilizado, y reconstitución del polvo con un líquido estéril para proporcionar la solución final para inyección. De manera alternativa, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención también se puede administrar por infusión continua.
- 10 La administración de la composición farmacéutica también se puede llevar a cabo por suministro a través de la mucosa o transdérmico. Para administración a través de la mucosa o transdérmico, la composición farmacéutica que comprende los inhibidores de microARN de la invención comprenderá materiales penetrantes los cuales son apropiados para reticulados de la piel o la barrera de mucosa. Estos penetrantes se conocen en el ámbito e incluyen, por ejemplo, para administración a través de la mucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración a través de la mucosa
- 15 se puede completar mediante el uso de aspersiones nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas, como se conoce de manera general en el ámbito. Las composiciones transdérmicas pueden ser administradas, por ejemplo, por parches o microagujas. Preferiblemente, los compuestos se preparan en forma de supositorios, con base de supositorio convencionales como por ejemplo manteca de cacao u otros glicéridos para suministro rectal.
- 20 En una realización, los inhibidores de microARN se preparan con portadores que protegerán a los inhibidores contra la eliminación del cuerpo, como por ejemplo una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como vinil acetato de etileno, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para preparación de formulaciones de liberación controlada son bien conocidos en el ámbito. Además, se pueden preparar
- 25 composiciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos, matrices las cuales están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables y similares.
- 30 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad o condición la cual está asociada con un nivel patológico de pérdida ósea, como por ejemplo osteoporosis y OI, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b o una composición farmacéutica como se define en lo anterior que comprende estos inhibidores. En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad o condición la cual se asocia con una pérdida
- 35 en la función muscular, como por ejemplo distrofia muscular, sarcopenia, caquexia como por ejemplo caquexia inducida por cáncer o atrofia muscular, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de microARN 19a o microARN 19b o una composición farmacéutica como se define en lo anterior que comprende estos inhibidores.
- 40 Una cantidad terapéuticamente eficaz de los inhibidores de microARN típicamente es una cantidad la cual -cuando se administra- es suficiente para bloquear efectivamente o reducir la expresión de microARN 19a y/o microARN 19b o sus pri-miARN o pre-miARN respectivos. En principio, cualquier tipo de molécula se puede usar con el propósito de la invención el cual interfiere con la expresión de microARN 19a y/o microARN 19b.
- Se apreciará por aquellos expertos en el ámbito que la cantidad de inhibidor la cual se va a administrar al paciente dependerá de varios factores como por ejemplo la edad y peso del paciente así como la naturaleza y gravedad de los
- 45 síntomas que van a ser tratados. La cantidad de inhibidor la cual ejerce el efecto terapéutico deseado se puede determinar en cada caso de paciente mediante el uso de experimentación sistemática. Típicamente, la dosificación del inhibidor de microARN por peso corporal varía de aproximadamente 0.1 mg por kg de peso corporal del paciente a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal del paciente, y de manera más preferible de aproximadamente 0.5 mg por kg de peso corporal del paciente a aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal del paciente, e incluso de manera más preferible
- 50 de 1 mg por kg de peso corporal del paciente a aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal del paciente. El régimen de administración puede incluir una o más administraciones del inhibidor diariamente.
- Por ejemplo, el tratamiento puede continuar durante por lo menos 2 semanas, por lo menos 3 semanas, por lo menos 4 semanas, por lo menos 5 semanas, por lo menos 6 semanas, por lo menos 7 semanas, por lo menos 8 semanas, por lo menos 9 semanas, por lo menos 10 semanas, por lo menos 11 semanas o por lo menos 12 semanas. Para algunas
- 55 indicaciones, el tratamiento puede continuar durante por lo menos 4 meses, por lo menos 5 meses, por lo menos 6 meses, por lo menos 7 meses, por lo menos 8 meses, por lo menos 9 meses, por lo menos 10 meses, por lo menos 11 meses,

por lo menos 12 meses o por lo menos 18 meses. El periodo de tratamiento estará determinado por el profesional de la salud considerando diversos factores como por ejemplo la naturaleza y gravedad de los síntomas que van a ser tratados, la vía de administración y similares.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 La figura 1 muestra el incremento en la masa ósea *in vivo* por inhibición de miR-19a/b. (a) muestra el diagrama de Venn de los miARN que son reducidos por tratamiento de ratones con PTH o un anticuerpo contra esclerostina, respectivamente. (b) muestra la expresión de miR-19a y miR-19b en huesos de ratones tratados con PTH o Scl-Ab. (c) muestra la expresión de miR-19a y miR-19b en osteoblastos de la bóveda craneal estimulados *in vitro* con PTH o Wnt3a. (d) muestra la diferenciación de osteoblastos de bóveda craneal transfectados con un inhibidor de miARN control codificado (Scr), inhibidores (anti-miR) de miR-19a o miR-19b o una combinación de anti-miR-19a y -19b (19a/b) evaluados por tinción de actividad de fosfatasa alcalina. (e) muestra la tinción de Von Kossa de las tibias proximales, y el marcado por fluorescencia doble de formación ósea (recuadros). (f) muestra el análisis histomorfométrico de las tibias proximales. (g) muestra la tinción de Von Kossa de la cuarta vértebra lumbar de los mismos animales que en las figuras 1e a 1f. La figura 1h muestra BV/TV de la cuarta vértebra lumbar de los mismos animales que en las figuras 1e a la figura 1f. Media de valores $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ *versus* vehículo # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ *versus* recombinado. Las figuras 1i a 1k muestran exploraciones de tomografía microcomputarizadas (μ CT) del fémur distal (figuras 1i a 1j) y de las secciones transversales femorales del tallo medio (figura 1k) de los mismos animales que en la figura 1e, después de finalización del tratamiento. La figura 1l muestra la cuantificación de los análisis μ CT del fémur distal de los mismos animales que en la figura 1e. Media de valores $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ *versus* mezclado. Abreviaturas: BV/TV, volumen óseo/volumen de tejido; MS/BS, superficie mineralizante/superficie ósea; BFR/BS, tasa de formación ósea/superficie ósea; MAR, tasa de aposición mineral; OS/BS, superficie osteoide/superficie ósea; Ob.S/BS, superficie de osteoblasto/superficie ósea; N.Ob/BS, número de osteoblastos/superficie ósea; ES/BS, superficie erosionada/superficie ósea; Oc.S/BS, superficie de osteoclasto/superficie ósea; N.Oc/BS, número de osteoclastos/superficie ósea; Tb.Th, espesor trabecular; Tb.Sp, separación trabecular; Tb.N, número trabecular; SMI, índice de modelado estructural.
- 25 La figura 2 muestra que la inhibición de miR-19a y miR-19b incrementa el efecto anabólico óseo del tratamiento con iPTH y restaura la masa ósea en un modelo en ratón de osteoporosis. La figura 2a muestra la tinción de Von Kossa, la figura 2b muestra el análisis histomorfométrico de las tibias proximales de ratones macho de 12 semanas de edad del genotipo Dmp1-Cre^{-/-}; Tgfr1^{fl/fl} después del tratamiento por PTH intermitente y/o inyecciones semanales de anti-miR-19a/b durante cuatro semanas. Para las abreviaturas véase la leyenda de la figura 1. La barra de escala indica 1 mm. La figura 2c muestra el curso de tiempo de BV/TV relativo de las tibias de ratones hembra en los cuales se indujo osteoporosis por extirpación de los ovarios (OVX) 21 días antes del inicio del tratamiento semanal con anti-miR-19a/b. Las figuras 2d a 2f muestran exploraciones μ CT de los fémures distales (figuras 2d, 2e) y de las secciones transversales femorales del tallo medio (figura 2f) de los mismos animales que se muestran en la figura 2c, después de finalización del tratamiento. Las figuras 2g a 2i muestran el análisis μ CT de BV/TV trabecular en los fémures (figura 2g), las tibias (figura 2h) y las cuartas vértebras lumbares (figura 2i) 70 días después de la extirpación de los ovarios. La figura 2j muestra un modelo de acción de miR-19a/b. Media de valores $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ *versus* mezclado, vehículo; ## $p < 0.01$ *versus* anti-miR-19a/b, vehículo; §§§ $p < 0.001$ *versus* mezclado, iPTH. * $p < 0.05$, *versus* en falso; mezclado # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ *versus* OVX; mezclado.
- 40 La figura 3 muestra el efecto de anti-miR-19a/b en pérdida de la función muscular inducida por extirpación de ovarios en ratones. La figura 3a muestra el análisis histológico de M. tibia anterior de ratones macho de tipo silvestre C56B1/6 que se inyectaron con oligonucleótidos marcados con FAM mezclados o anti-miR-19a/b. Las flechas indican los núcleos centrales. La figura 3b muestra la capacidad de contracción *ex vivo* del músculo largo digital extensor en ratones C57B1/6J hembra en los que se extirparon los ovarios u operados en falso después de administración de oligonucleótidos mezclados (Scr) o anti-miR-19a/b. La figura 3c muestra la capacidad de contracción *ex vivo* del músculo soleo en ratones C57B1/6J hembra en los que se han extirpado los ovarios u operados en falso después de la administración de oligonucleótidos Scr o anti-miR-19a/b. La figura 3d muestra la fatiga *ex vivo* del músculo largo digital extensor en ratones C57B1/6J hembra en los que se han extirpado los ovarios u operados en falso después de administración de oligonucleótidos Scr o anti-miR-19a/b. La figura 3e muestra la fatiga *ex vivo* del músculo soleo en ratones C57B1/6J hembra en los que se han extirpado los ovarios u operados en falso después de administración de oligonucleótidos Scr o anti-miR-19a/b. * $p < 0.05$ *versus* OVX; scr.
- 50 La figura 4 muestran el efecto de anti-miR-19a/b sobre el crecimiento *in vitro* de células de cáncer de mama MDA-MB-231 metastásicas en hueso. La figura 4a muestra la proliferación de células MDA-MB-321 transfectadas con oligonucleótidos Scr o anti-miR-19a/b. La figura 4b muestra la proliferación de células MDA-MB-231 transfectadas con oligonucleótidos Scr o miR-19a/b. ** $p < 0.01$ *versus* Scr.
- 55 La figura 5 muestra que la inhibición de miR-19a y miR-19b reduce las metástasis óseas de cáncer de mama y restaura la pérdida de masa ósea y la función muscular inducida por cáncer de mama. La figura 5a muestra la cuantificación de señal

de bioluminiscencia en ratones que portan el tumor tratados con oligonucleótidos mezclados (Scr, rectángulos) o anti-miR-19a/b (triángulos) durante cuatro semanas. La figura 5b muestra el análisis μ CT de las tibias proximales de los ratones que no presentan tumor (control) y de los ratones con metástasis ósea después del tratamiento con Scr u oligonucleótidos anti-miR-19a/b. La figura 5c muestra la capacidad de contracción *ex vivo* del músculo soleo en ratones que no presentan tumor (control) y en ratones que presentan tumor después de la administración de oligonucleótidos Scr o anti-miR-19a/b. La figura 5d muestra la fatiga *ex vivo* de músculo soleo en ratones que no presentan tumor (control) y en ratones que presentan tumor en quienes se administró oligonucleótidos Scr o anti-miR-19a/b. Media de valores $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ *versus* ratones que no presentan tumor.

La figura 6 muestra el efecto de anti-miR-19a/b sobre pérdida de masa ósea y función muscular, inducida por glucocorticoide, en ratones. La figura 6a muestra la masa grasa en ratones ante el tratamiento con placebo o con glucocorticoide (prednisolona) y el suministro de oligonucleótidos mezclados (Scr) o anti-miR-19a/b medido por absorciometría de rayos X de energía doble (DXA, por sus siglas en inglés). La figura 6b muestra el peso corporal medido por DXA. Las figuras 6c a 6e muestra el análisis de DXA de la densidad de mineral en hueso en ratones bajo tratamiento con placebo o con prednisolona, y el suministro de oligonucleótidos Scr o anti-miR-19a/b en el cuerpo total (figura 6c) en los fémures (figura 6d) y en la columna (figura 6e). Las figuras 6f a 6h muestran el peso húmedo del músculo del gastrocnemio (figura 6f), el cuadriceps (figura 6g) y el tibial anterior (figura 6h) en ratones tratados con placebo o con prednisolona y oligonucleótidos Scr o anti-miR-19a/b. La figura 6i muestra la fuerza muscular *in vivo* determinada después de dos semanas de tratamiento con placebo o prednisolona y oligonucleótidos Scr o anti-miR-19a/b usando la prueba de resistencia de agarre de la extremidad anterior vertical. La figura 6j muestra la prueba de músculo funcional *in vivo* (torque de flexión plantar) en ratones tratados con placebo o prednisolona y oligonucleótidos Scr o anti-miR-19a/b. Media de valores $\pm$ SEM. + $p < 0.05$ *versus* ratones tratados con placebo correspondientes, # $p < 0.05$ *versus* ratones tratados con prednisolona y Scr.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Análisis *in vivo* de la expresión de miARN

Para identificar los miARN que son regulados en respuesta a un estímulo anabólico óseo, se inyectaron a ratones de 8 semanas de edad con un fragmento recombinante de hormona para tiroidea humana (PTH1-34) o un anticuerpo contra esclerostina (Scl-Ab). De manera específica, se inyectó a ratones macho de tipo silvestre con vehículo, 100 μ g/kg de PTH1-34 (Bachem) o 100 μ g/kg de Scl-Ab. Después de 4 horas, el ARN total incluidos los ARN pequeños se aísla de los huesos de ratón usando Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Para análisis de expresión se sintetizó ADNc de a partir de 1 μ g de ARN total usando el kit de síntesis de ADNc ProtoScript First Strand (NEBioLabs). Se realizó PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR, por sus siglas en inglés) con el sistema de detección CFX96 (BioRad) usando SYBR Green Master Mix (BioRad). Después de normalización al ARNm de proteína de unión a TATA (Tbp, por sus siglas en inglés), los niveles de expresión relativa y los múltiplos de inducción de cada gen objetivo se calcularon usando el procedimiento CT comparativo ($\Delta\Delta$ CT). Los ARN pequeños se aislaron de diversos tejidos de ratón con Trizol. Se usó el QuantimiR-kit (SBI System Biosciences) para agregar una cola poliA a los ARN pequeños para síntesis de ADNc de acuerdo con las líneas de guía del fabricante. Se determinó la expresión de miARN relativo por detección de SYBR Green (BioRad) usando un cebador inverso universal y un cebador directo específico diseñado para cada miARN de interés. Se usó la expresión U6 como un control interno y se calculó la expresión de miARN relativa usando el procedimiento $\Delta\Delta$ CT.

Resultados: La exposición de los ratones a PTH o tratamiento con Scl-Ab reduce la expresión de los miARN 35 o 129 en hueso, respectivamente. Se encontró que 22 miARN son regulados por disminución por ambos tratamientos (figura 1a). Entre los miARN regulados por disminución comúnmente, se identificaron miR-19a y miR-19b. La cuantificación directa de la expresión de miR-19a/b en hueso confirmó su regulación negativa por PTH y Scl-Ab (figura 1b).

Ejemplo 2: Análisis *in vitro* de expresión de miARN

Para probar el efecto de una estimulación de osteoblastos de bóveda craneal con PTH 1-34 y Wnt3a, se llevó a cabo un ensayo *in vitro*. Los osteoblastos de bóveda craneal se aislaron de ratones de 2 a 3 días de edad y se expandieron en α -MEM que contiene FBS 10% y P/S. Los osteoblastos se estimularon con vehículo, PTH 1-34 (100 μ M) o con Wnt3a (100 mg/ml) durante 4 horas y los ARN pequeños se extrajeron de las células usando el kit miRNEasy (Qiagen). Después de síntesis de ADNc, se analizó la expresión de miR-19a y miR-19b usando qRT-PCR. Se usó la expresión U6 como un control interno y se calculó la expresión de miARN relativa usando el procedimiento $\Delta\Delta$ CT.

Resultados: Tanto la estimulación con PTH 1-34 como con Wnt3a indujo una reducción en la expresión de miR-19a/b en osteoblastos de bóveda craneal (figura 1c).

Ejemplo 3: Análisis *in vitro* de diferenciación de osteoblastos

Para probar si la diferenciación de los osteoblastos de bóveda craneal puede ser alterada por interferencia con la expresión de miR-19a/b, se transfectaron células con los oligonucleótidos que se han diseñado para unirse e inhibir miR-19a endógeno (anti-miR-19a: 6-FAM/TGCATAGATTTGCAC) y miR-19b (anti-miR-19b: 6-FAM/TGCATGGATTTGCAC). Estos oligonucleótidos sintéticos contienen enlaces de estructura principal de fosforotioato para uso óptimo en estudios funcionales así como propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas optimizadas y toxicidad mínima. Además, la marca de FAM de fluoresceína 5' permite el monitoreo de la eficiencia de transfección *in vitro* y el suministro de tejido *in vivo*. Las células se transfectaron con anti-miR-19a/b (50 nM) usando el sistema de electroporación Neon (Invitrogen). Se indujo diferenciación de osteoblastos por suplementado de α -MEM con ácido L-ascórbico 0.2 mM y β -glicerofosfato 10 mM (ambos de Millipore). La diferenciación de osteoblasto se determinó por tinción con fosfatasa alcalina (ALP, por sus siglas en inglés) después de fijación de las células en solución de formaldehído amortiguada de manera neutra 4%. Para la tinción de ALP, las células se incubaron con naftol AS-MX/Fast Blue (ambos de Sigma-Aldrich) en una solución de Tris-HCl durante 15 min a temperatura ambiente.

Resultados: Se ha encontrado que la diferenciación de osteoblastos de la bóveda craneal se incrementa por transfección con inhibidores contra miR-19a y miR-19b de una manera sinérgica (figura 1d).

Ejemplo 4: Análisis óseo en ratones tratados con anti-miR-19a/b

Para probar si el tratamiento con una combinación de inhibidores contra miR-19a y miR-19b (anti-miR-19a/b) puede ejercer un efecto anabólico óseo *in vivo*, se trataron ratones de 8 semanas de edad durante 28 días mediante inyecciones intravenosas (semanales) de anti-miR-19a/b y determinación subsecuente de masa ósea. Los ratones fueron inyectados 7 y 2 días antes de matarlos con calceína (40 mg/kg) y demociclina (20 mg/kg, Sigma-Aldrich), respectivamente. Las tibias y los cuerpos de la cuarta vértebra lumbar (L4) se recolectaron y fijaron en formaldehído amortiguado con PBS 3.7%. Para análisis histomorfométrico las tibias y L4 se incrustaron en metacrilato de metilo y azul de toluidina. Se llevaron a cabo las tinciones de Von Kossa y fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP, por sus siglas en inglés) usando secciones sagitales de 4 μ m. Las mediciones histomorfométricas óseas cuantitativas se realizaron de acuerdo con protocolos estandarizados (normas ASBMR) [6] usando un sistema OsteoMeasure (OsteoMetrics). La tomografía microcomputarizada (μ CT) se usa para análisis tridimensional de huesos largos y las propiedades de hueso del cuerpo vertebral. Los cuerpos de la cuarta vértebra lumbar (L4) de los ratones se analizaron usando tomografía microcomputarizada de alta resolución con un tamaño de voxel isotrópico fijo 10 μ m (70 kV pico a X μ A 400 ms de tiempo de integración; Viva80 micro-CT; Scanco Medical AG). Este umbral se verificó al evaluar manualmente 10 cortes tomográficos únicos de cuatro muestras por grupo para aislar el tejido mineralizado y para preservar su morfología mientras se excluyen tejidos no mineralizados. Todos los análisis se realizaron sobre tejido óseo extraído digitalmente usando técnicas de distancia 3D (Scanco Medical AG).

Resultados: El tratamiento con anti-miR-19a/b incrementó la masa ósea trabecular de la tibia proximal. El análisis histomorfométrico mostró que el tratamiento con anti-miR-19a/b activa el remodelado óseo al aumentar los parámetros de osteoblastos y osteoclastos con una formación ósea mejorada que dio como resultado en un incremento neto en la masa ósea (figuras 1e y 1f). El efecto anabólico óseo del tratamiento anti-miR-19a/b se confirmó en los cuerpos vertebrales L4 (figuras 1g y 1h) y en donde el fémur distal usando análisis de tomografía microcomputarizada (μ CT) (figuras 1i - 1l).

Ejemplo 5: Tratamiento conjunto con inhibidores de miR-19a/b y PTH (1-34) intermitente

Puesto que ambos, PTH y anti-miR-19a/b incrementan la masa ósea, se evaluó un tratamiento conjunto. Un fragmento recombinante de hormona paratiroidea humana (PTH 1-34; 100 μ g/kg de peso corporal, Biochem) o vehículo se administró intraperitonealmente cinco veces a la semana durante tres semanas a ratones macho de 8 semanas de edad. Anti-miR-19a/b o Scr control se administró una vez a la semana como tratamiento conjunto.

Resultados: Anti-miR-19a/b aumentó el incremento, mediado por PTH, en la masa ósea en tibias de ratones macho (figuras 2a y 2b).

Ejemplo 6: Inhibidores de miR-19a/b en un modelo de osteoporosis

Puesto que una masa ósea reducida es la marca distintiva de osteoporosis, se probó si un incremento en la masa ósea por administración de anti-miR-19a/b también puede ser útil para el tratamiento de osteoporosis femenina. Por lo tanto, se extirparon los ovarios de ratones hembra de 8 semanas de edad para suprimirles sus esteroides sexuales lo que resultó en una pérdida grave de masa ósea trabecular en la tibia. Para imitar la situación clínica, el tratamiento anti-miR-19a/b se inició después de que la osteoporosis se estableció completamente 21 días después de la extirpación de los ovarios mediante inyecciones semanales de anti-miR-19a/b o control mezclado.

Resultados: Esta terapia evita la pérdida ósea adicional 14 días después del primer tratamiento, y de esta manera se alivia la pérdida ósea en este modelo de osteoporosis. La cuantificación de la masa ósea trabecular del fémur distal, la tibia proximal y los cuerpos de la vértebra L4 después de finalización del tratamiento confirmaron que el tratamiento anti-miR-

19a/b tiene un efecto protector contra la pérdida ósea en osteoporosis.

Ejemplo 7: Análisis histológico del músculo

Se analizó el efecto de anti-miR-19a/b en la pérdida inducida por extirpación de los ovarios de la función muscular. Se realizó un análisis histológico mediante FAM inyectado, marcado y mezclado o de oligonucleótidos anti-miR-19a/b una vez a la semana (10 mg/kg, i.v.) durante 4 semanas en ratones macho tipo silvestre C56Bl/6 de 8 semanas de edad. Una semana después del último tratamiento se mató a los animales y se recolectaron músculos (músculo tibial anterior). Los músculos se incrustaron en compuesto de temperatura de corte óptima (OCT, por sus siglas en inglés) antes de congelar los cortes con un criostato. Los cortes de tejido se tiñeron con ácido peryódico-Schiff (PAS) y soluciones de hematoxilina.

Resultados: Bajo condiciones en estado estable, los núcleos se localizan en el borde de las fibras musculares. De manera interesante, en miofibras tratadas con anti-miR-19a/b se observa un desplazamiento de los núcleos desde la periferia hacia una posición central (figura 3A) lo que sugiere un remo del lado de tejido muscular espontáneo activo en respuesta a inhibición de miR-19a/b.

Ejemplo 8: Análisis funcional de músculo

Para investigar la implicación funcional del hallazgo observado en el ejemplo 7, se llevaron a cabo pruebas funcionales *ex vivo* usando músculos recién cosechados (músculo extensor digital largo y el músculo soleo). Se extirpó los ovarios o se sometieron a operación en falso a ratones C57Bl/6J hembra de 8 semanas de edad y se trataron después de tres semanas con mezclado (Scr) o anti-miR-19a/b (10 mg/kg, i.v.) una vez a la semana durante siete semanas. Una semana después de la última inyección se mató a los ratones y se analizó la capacidad de contracción *ex vivo* del extensor digital largo (EDL, por sus siglas en inglés) y el músculo soleo usando un dispositivo especial diseñado para la medición de las propiedades de músculo de ratón *in situ*, *ex vivo* e *in vivo* (Aurora Scientific). Para este propósito, el EDL y el músculo soleo se extirparon de la extremidad posterior, se colocaron ganchos de acero en los tendones de los músculos y los músculos se montaron entre un transductor de fuerza. Los músculos se estimularon para contracción usando el estímulo supramáximo entre los dos electrodos. Para estudio de fatiga, el músculo extensor digital largo y el músculo soleo se estimularon con 70 Hz durante 50 repeticiones y se detectó la fuerza tetánica máxima. Se recolectaron los datos y se analizaron usando control de músculo dinámico/adquisición de datos (DMC, por sus siglas en inglés) y los programas de análisis de datos de control de músculo dinámico (DMA, por sus siglas en inglés) (Aurora Scientific).

Resultados: las pruebas funcionales mostraron que la extirpación de los ovarios disminuye de modo significativo a la fuerza (figuras 3b y 3c) y la resiliencia (figuras 3d y 3e) del músculo extensor digital largo y del músculo soleo. Anti-miR-19a/b (10 mg/kg, i.v., una vez a la semana durante siete semanas) restauró tanto la fuerza como la resiliencia a un nivel del control operado en falso (figuras 3b a 3e). Esto sugiere fuertemente que el antagonizante de miR-19a/b protege contra pérdida de la función muscular inducida por extirpación de los ovarios. Estos resultados indican que miR-19a/b es un objetivo novedoso para el tratamiento de función muscular reducida.

Ejemplo 9: Crecimiento de células de cáncer de mama metastásicas óseas

Los hallazgos anteriores fundamentan el concepto de que antagonizar miR-19a/b resulta osteoprotector. Por lo tanto, se probó si el tratamiento anti-miR-19a/b puede atenuar la actividad de destrucción de hueso por células de cáncer de mama MDA-MB-231. Para probar esta hipótesis, se transfectaron células de cáncer de mama MDA-MB-231 con anti-miR-19a/b, nucleótido de miR-19a/b o controles Scr respectivos. Las células se hacen crecer 4 días *in vitro* y se determinó proliferación celular por el ensayo MTS cada día hasta la finalización del experimento.

Resultados: el tratamiento de la destrucción por células de cáncer de mama MDA-MB-231 con nucleótidos anti-miR-19a/b reduce de modo significativo la proliferación de células cancerosas en los días 3 y 4 mientras que el suministro de nucleótidos miR-19a/b incrementa la proliferación de células cancerosas en los mismos puntos de tiempo, en comparación con el control. Estos datos sugieren fuertemente que la inhibición de miR-19a/b endógena en células de cáncer de mama MDA-MB-231 puede evitar la capacidad destructiva de hueso en el contexto de enfermedad de cáncer de mama metastásico.

Ejemplo 10: Tratamiento de enfermedad ósea metastásica

Se probó si el tratamiento anti-miR-19a/b puede atenuar la actividad de destrucción de hueso por células de cáncer de mama MDA-MB-231 y proteger de enfermedad osteolítica inducida por cáncer de mama *in vivo*. Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 que expresan de manera estable el gen para luciferasa se inyectaron en el ventrículo izquierdo de ratones SCID inmunodeteriorados hembra de 8 semanas de edad. Se detectaron micrometástasis dos semanas después de la inyección de las células de cáncer de mama por generación de imágenes por bioluminiscencia (BLI, por sus siglas en inglés) y los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en dos brazos de tratamiento. Un grupo recibió oligonucleótido mezclado (Scr; 10 mg/kg) y el otro grupo recibió anti-miR-19a/b (10

mg/kg) por vía intravenosa (i.v) una vez a la semana durante cuatro semanas. La carga de tumor se midió semanalmente por BLI. Una semana después de la última inyección se mató a los ratones y se analizó la capacidad de contracción *ex vivo* del músculo soleo usando un dispositivo especial diseñado para medición de las propiedades de músculo de ratón *in situ*, *ex vivo*, e *in vivo* (Aurora Scientific). Para este propósito se extirpó el músculo soleo de la extremidad posterior, se colocaron ganchos en los tendones de los músculos y los músculos se montaron entre un transductor de fuerza. Los músculos fueron estimulados para contraerse usando el estímulo supramáximo entre dos electrodos. Para estudios de fatiga, el músculo soleo se estimuló con 70 Hz durante 50 repeticiones y se detectó la fuerza tetánica máxima. Los datos se recolectaron y analizaron usando el control de músculo dinámico/adquisición de datos (DMC) y los programas de análisis de datos de control de músculo dinámico (DMA) (Aurora Scientific). La tomografía microcomputarizada (μ CT) se usó para análisis tridimensional de huesos largos. Los huesos largos de ratones se analizaron usando tomografía microcomputarizada de alta resolución con un tamaño de voxel isotrópico fijo de 10 μ m (70 kV pico a X μ A 400 ms de tiempo de integración; Viva80 micro-CT; Scanco Medical AG). Este umbral se verificó al evaluar manualmente 10 cortes tomográficos únicos de cuatro muestras por grupo para aislar el tejido mineralizado y preservar su morfología mientras se excluyen tejidos no mineralizados. Todos los análisis se realizan sobre el tejido de hueso extraído digitalmente usando técnicas de distancia 3D (Scanco Medical AG).

Resultados: la generación de imagen BLI mostró un crecimiento de tumor reducido de modo significativo en los huesos de ratones tratados con anti-miR-19a/b en comparación con los controles tratados con Scr (figura 5a). El cáncer de mama induce pérdida de hueso significativa en ratones tratados con Scr lo cual se evitó por tratamiento semanal con anti-miR-19a/b (figura 5b). Las pruebas de músculo funcional mostraron que anti-miR-19a/b (10 mg/kg, i.v., una vez a la semana durante cuatro semanas) restauró la pérdida inducida por cáncer de la fuerza y el desempeño del músculo soleo (figuras 5c y 5d). Esto sugiere fuertemente que antagonizar miR-19a/b reduce la carga metastásica ósea y protege contra pérdida de masa ósea y función muscular inducida por cáncer de mama.

Ejemplo 11: Tratamiento de osteoporosis inducida por glucocorticoide

Para investigar si anti-miR-19a/b está implicado en osteoporosis inducida por glucocorticoides, se implantaron subcutáneamente pellas de placebo o prednisolona (2.1 mg/kg/d) en ratones C57Bl/6J hembra de 4 meses de edad. Un día antes de la implantación de la pella y subsecuentemente, una vez a la semana, a los ratones se les trató con mezclado (Scr) o anti-miR-19a/b (10 mg/kg, i.v.). La densidad mineral ósea (BMD, por sus siglas en inglés) y la masa grasa corporal se midieron antes y después de 4 semanas de tratamiento usando absorciometría de rayos X de energía doble (DEXA, Piximus). La fuerza muscular *in vivo* se determinó después de 2 semanas de tratamiento usando la prueba de resistencia de agarre de las extremidades anteriores vertical. Las pruebas de músculo funcional *in vivo* (torque de flexión plantar) se realizaron usando el dispositivo especial diseñado para medición de las propiedades de músculo de ratón *in vivo* (Aurora Scientific). La fuerza de contracción de músculo máxima se normalizó con respecto al peso corporal. Después de 4 semanas de tratamiento se mató a los animales y se midió el peso húmedo de los músculos gastrocnemio, cuádriceps y tibial anterior (TA).

Resultados: la medición de absorciometría por rayos X de energía doble mostró una masa grasa aumentada ante el tratamiento con glucocorticoide (prednisolona), lo cual se evitó por suministro semanal de anti-miR-19a/b (figura 6a). No se observó cambio en el peso corporal total (figura 6b). Además, se redujo de manera significativa BMD en los fémur y en la columna de ratones que recibieron prednisolona (figuras 6c a e). Los ratones tratados con anti-miR-19a/b se protegieron de la pérdida de BMD inducida por glucocorticoide (figuras 6c a e). Aunque los glucocorticoides reducen la masa muscular tanto en ratones tratados con Scr como con anti-miR-19a/b, la masa de los músculos gastrocnemio, cuádriceps y tibial anterior es significativamente mayor en ratones tratados con anti-miR-19a/b en comparación con controles tratados con Scr (figura 6f a h). De manera importante, el tratamiento con anti-miR-19a/b evita la pérdida de función muscular inducida por glucocorticoides, determinado por la fuerza de agarre y las pruebas de torque de flexión plantar (figuras 6i a j).

LITERATURA

1. Janssen, H. L. A. *et al.*, Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA, N. Engl. J. Med. 368, 1685-1694 (2013).
2. Musilova K. & Mraz M., MicroRNAs in B cell lymphomas: How a complex biology gets more complex", Leukemia, 2015 29 (5), 1004-17 (2015).
3. Nielsen B.S., *et al.*, High levels of microRNA-21 in the stroma of colorectal cancers predict short disease-free survival in stage II colon cancer patients, Clin Exp Metastasis 28 (1): 27-38 (2010).
4. Romao J.M. *et al.*, MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis, Exp. Biol. Med. 236 (9), 997-1004 (2011).
5. Hommers L.G. *et al.*, Heterogeneity and Individuality: microRNAs in Mental Disorders, J Neural Transm. 122 (1): 79-97 (2015).

6. Parfitt, A.M. *et al.*, Bone histomorphometry: standarization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Comittee. J. Bone Miner. Res. 2, 595-610 (1987).

SECUENCIAS

SEC ID NO: 1 - 5'-TGCATAGATTTGCAC-3' (anti-miR-19a)

5 SEC ID NO: 2 - 5'-TGCATGGATTTGCAC-3' (anti-miR-19b)

SEC ID NO: 3 - 5'-UGUGCAAUAUGCAAACUGA-3' (miR-19a)

SEC ID NO: 4 - 5'-UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA-3' (miR-19b)

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección patológica que está asociada con la pérdida ósea o la reducción de la función muscular, o para el tratamiento o la prevención de la destrucción ósea relacionada con el cáncer.
- 5 2. Inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b para su uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en el que la enfermedad que está asociada con la pérdida ósea es osteoporosis u osteogénesis imperfecta (OI).
3. Inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b para su uso en un procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho procedimiento también incluye la administración de hormona paratiroidea o un fragmento de la misma, en el que dicho fragmento es PTH 1-34.
- 10 4. Inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b para uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad que está asociada con una función muscular reducida es distrofia muscular, atrofia muscular, sarcopenia o caquexia, tal como caquexia inducida por cáncer.
5. Inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b para su uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha destrucción ósea relacionada con el cáncer está causada por metástasis ósea.
- 15 6. Inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b para su uso en un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho inhibidor es un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, o un análogo de ácido nucleico.
7. Inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b para su uso en un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho inhibidor se administra por vía intravenosa, subcutánea, transdérmica o transmucosa.
- 20 8. Inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b para su uso en un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho inhibidor comprende una secuencia de ADN o ARN que se une a o reduce la expresión de microARN 19a y/o microARN 19b.
9. Inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b para su uso en un procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicho inhibidor es un ADN que comprende
 - (a) la secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, o
 - 25 (b) el complemento de la secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, o
 - (c) una variante de cualquiera de las secuencias de (a) o (b) que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las mismas y es capaz de hibridarse con microARN 19a y/o microARN 19b.
10. Composición farmacéutica que comprende (a) un inhibidor de microARN 19a y/o microARN 19b y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o condición patológica que está asociada con pérdida ósea, o una enfermedad o condición patológica que está asociada con una función muscular reducida.
- 30 11. Composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de la reivindicación 10, en la que dicho inhibidor es un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico.
12. Composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en la que dicho inhibidor es un ADN o ARN.
- 35 13. Composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que dicho inhibidor se administra por infusión o inyección.
14. Composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en la que dicho inhibidor comprende una secuencia de ADN o ARN que se une a e inhibe o reduce la expresión de microARN 19a y/o microARN 19b.
- 40 15. Composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en la que dicho inhibidor es un ADN que comprende
 - (a) la secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, o
 - (b) el complemento de la secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, o

(c) una variante de cualquiera de las secuencias de (a) o (b) que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la misma y es capaz de hibridar con microARN 19a y/o microARN 19b.

Figura 1

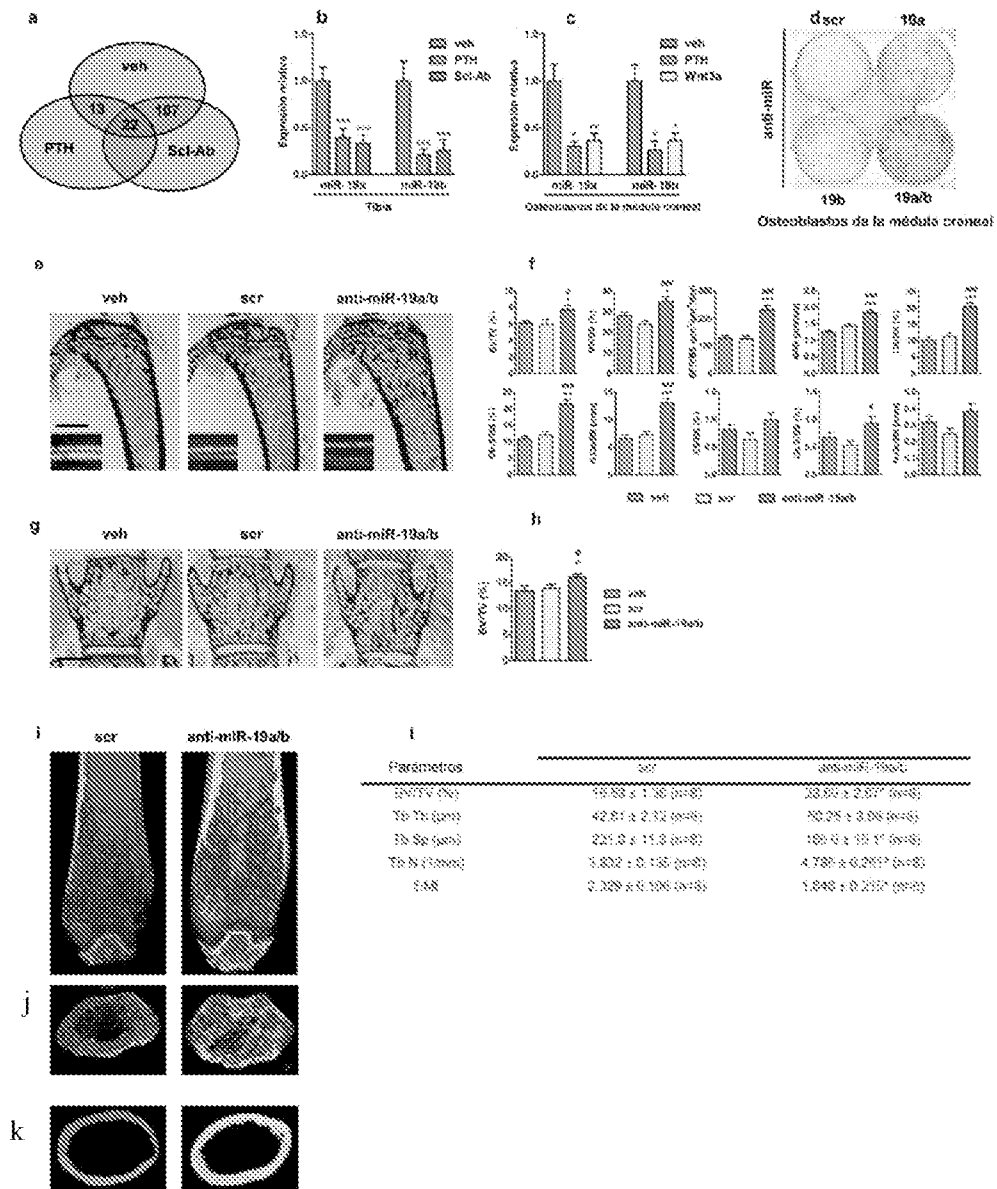


Figura 3

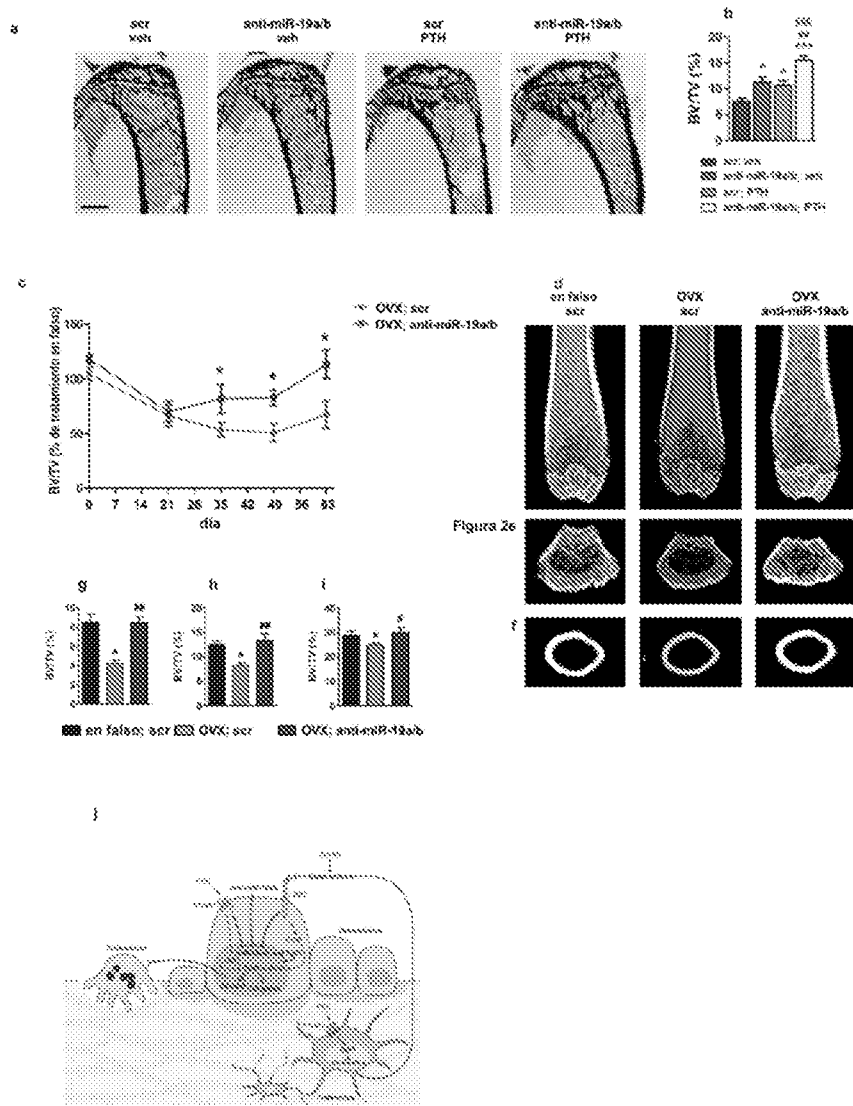


Figura 3

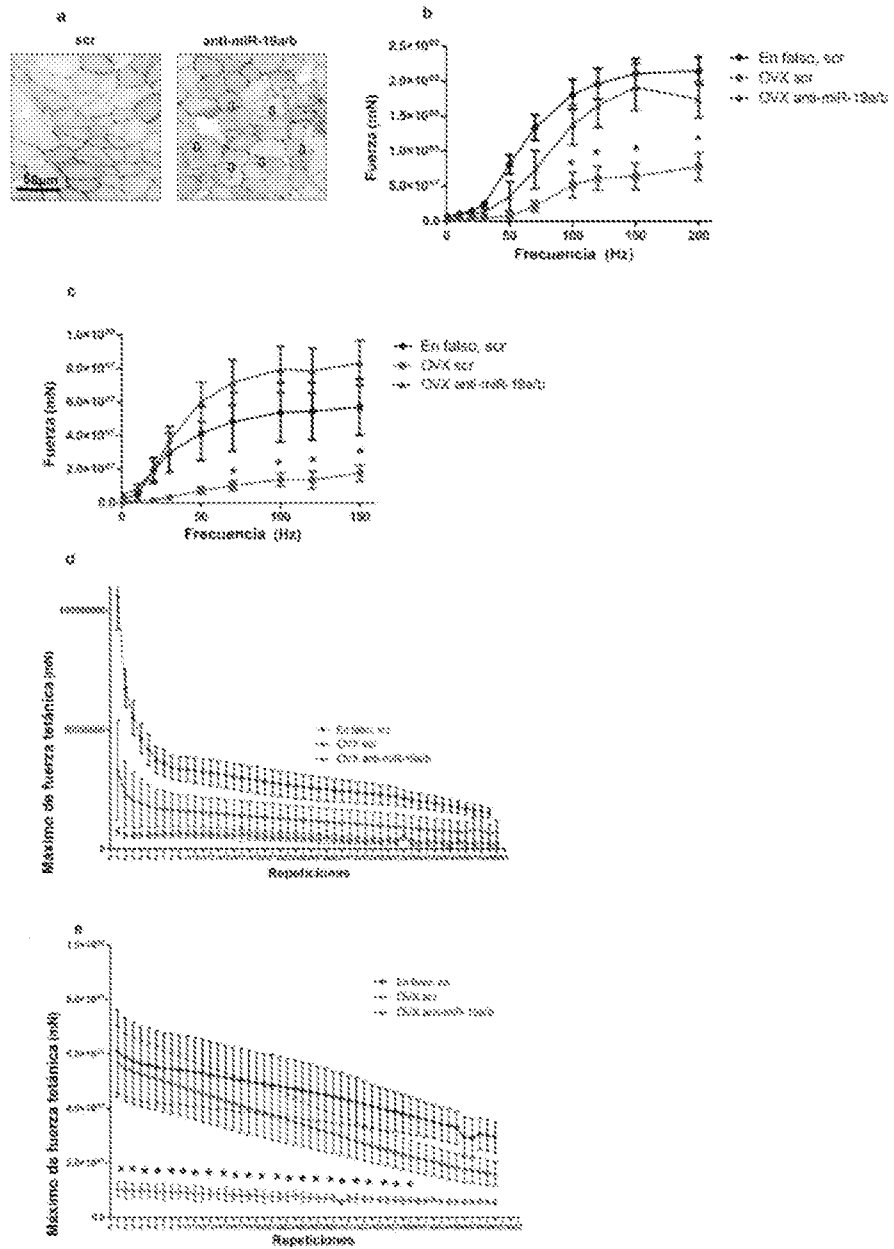
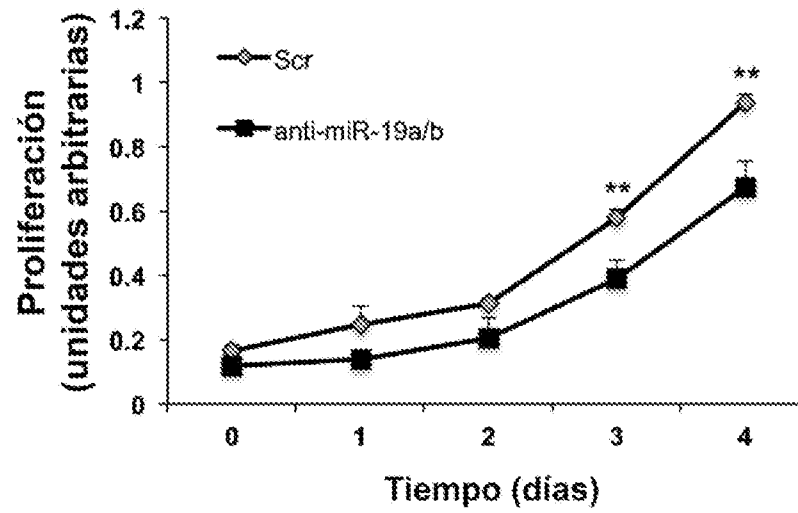


Figura 4

a



b

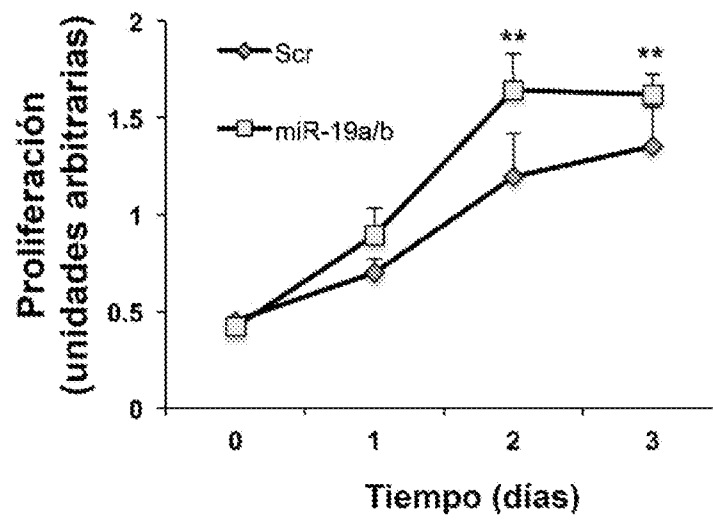


Figura 5

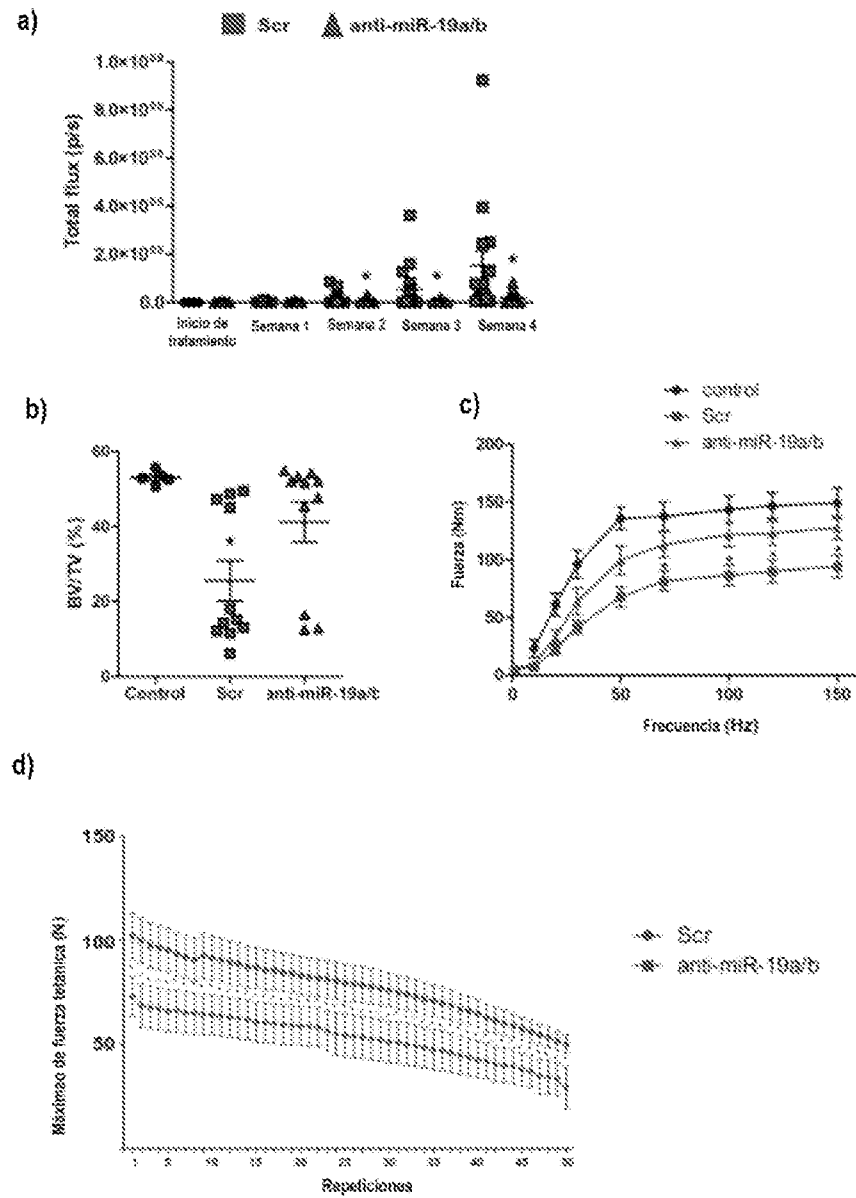


Figura 6

