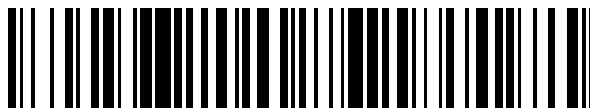


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 106**

21 Número de solicitud: 201530645

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

A61K 35/34 (2015.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

12.05.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.02.2016

Fecha de la concesión:

18.11.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

25.11.2016

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE JAÉN (100.0%)
Campus las Lagunillas, s/n
23006 Jaén (Jaén) ES

72 Inventor/es:

ARÁNEGA JIMÉNEZ, Amelia Eva;
FRANCO JAIME, Diego;
HERNÁNDEZ TORRES, Francisco;
LOZANO VELASCO, Estefanía y
VALLEJO PULIDO, Daniel

54 Título: **Método de activación de la expresión del gen Pitx2 para promover la regeneración muscular**

57 Resumen:

La presente invención resuelve el problema de proporcionar nuevas terapias que resulten eficaces en el tratamiento de las distrofias musculares a través de la utilización de composiciones que comprendan un compuesto capaz de:

a. aumentar la expresión del gen Pitx2 en las células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal con respecto a la observada en ausencia del compuesto en dichas células; y/o

b. reducir la expresión del miRNA-106b en las células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal con respecto a la observada en ausencia del compuesto en dichas células.

ES 2 559 106 B1

DESCRIPCIÓN

Método de activación de la expresión del gen Pitx2 para promover la regeneración muscular.

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo de la biotecnología, en particular a la utilización de la expresión del gen Pitx2 para el tratamiento o la prevención de las distrofias musculares.

Antecedentes de la invención

- 10 La siguiente discusión de los antecedentes de la invención se proporciona meramente para ayudar al lector a comprender la invención.

El músculo esquelético tiene la capacidad de repararse y regenerarse debido a la presencia de células madre residentes, denominadas células satélite de músculo. En el tejido muscular
15 maduro las células satélite constituyen una población pequeña, dispersa de células mitóticamente y fisiológicamente quiescentes, marcados por su expresión del factor de transcripción Pax7 (Figura 1). Las células madre satélite del músculo adulto son un linaje procedente de las células progenitoras miogénicas embrionarias Pax3/pax7+ que permanecen en el músculo adulto en un estado de quiescencia y después de una lesión se
20 activan, proliferan y entran en el programa de diferenciación miogénica debido a la regulación positiva de los genes de determinación miogénica myf5, MyoD y myogenina formando así nuevos mioblastos que eventualmente se fusionan entre sí para generar nuevo tejido muscular (Figura 1).

- 25 Las distrofias musculares son un grupo de afecciones genéticas caracterizadas por trastornos degenerativos del músculo de carácter progresivo. Una de las características más graves en estas patologías consiste en la pérdida gradual de tejido muscular esquelético debido a una degeneración crónica acompañada por una regeneración deficiente. Sus formas más comunes en la infancia son las distrofias musculares de Duchenne (DMD) y
30 Becker (BMD) y se caracterizan por ser trastornos hereditarios recesivos ligados al cromosoma X causados por mutaciones en el gen de la distrofina. La distrofina juega un papel estructural importante en la fibra muscular sirviendo de conexión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto. La región N-terminal de esta proteína se une a la proteína del citoesqueleto actina, mientras que el extremo C-terminal es parte del complejo glicoprotéico asociado a la distrofina (DGC) que conecta con la membrana de la fibra muscular
35 (sarcolema). A falta de distrofina, la tensión mecánica conduce a rupturas en el sarcolema

causando una necrosis muscular progresiva, pérdida de la ambulación independiente al comienzo de la adolescencia, cardiomiopatía, insuficiencia respiratoria, y la muerte prematura en los individuos afectados.

5 En la actualidad no hay curación para las distrofias musculares y las terapias existentes son ineficaces. Aunque, es probable que las terapias génicas puedan proporcionar una cura para estas enfermedades existen importantes obstáculos que limitan su aplicación. Así, se han realizado enfoques potenciales que han ido desde las estrategias de aumento de genes usando vectores virales o plásmidos destinados a la restauración de la expresión de
10 distrofina, hasta la regulación positiva de genes que podrían utilizarse para superar la falta de expresión del gen desertado. Aunque algunos de estos enfoques han demostrado ser parcialmente eficaces, los resultados obtenidos hasta el momento han puesto de manifiesto sus numerosas limitaciones. En particular, la pérdida progresiva de la expresión del gen terapéutico observado después del tratamiento ha indicado claramente que la modificación
15 de la fibra madura por sí sola no es suficiente para mantener los efectos beneficiosos obtenidos por este enfoque terapéutico.

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar nuevas terapias que resulten eficaces en el tratamiento de las distrofias musculares, especialmente mediante la identificación de nuevas
20 aproximaciones para mejorar la regeneración muscular en estos pacientes.

Breve descripción de la invención

La presente invención resuelve el problema de proporcionar nuevas terapias que resulten
25 eficaces en el tratamiento de las distrofias musculares a través de la utilización de composiciones que comprendan un compuesto capaz de:

- a. aumentar la expresión del gen Pitx2 en las células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal con respecto a la observada en ausencia del
30 compuesto en dichas células; y/o
- b. reducir la expresión del miRNA-106b en las células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal con respecto a la observada en ausencia del compuesto en dichas células.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Origen embrionario de las células satélite de músculo. (Buckingham and Vincent, Current Opinion in Genetics & Development, 2009)

5

Figura 2. A y B) Sobreexpresión de Pitx2 en células satélite de ratón mediante transfección con el vector lentiviral bicistrónico LVX-Pitx2c-ZSGreen. C) La expresión de los miRNAs: miR-15b, miR-106b, miR-23b y miR-503 (qRT-PCR) esta disminuida en las células satélite que sobre-expresan Pitx2, tanto en las células en estadios tempranos de activación (EPq) como en estadios más avanzados de activación (EPa) (qRT-PCR). D) La transfección con el vector lentiviral bicistrónico LVX-Pitx2c-ZSGreen conduce a una disminución de la expresión de los genes de control de ciclo celular ciclina D1 y ciclina D2 (qRT-PCR) indicando que, de forma similar a lo que ocurre en mioblastos, la vía Pitx2-miRNAs controla proliferación en células satélite. E) Cuantificación por inmunohistoquímica del número de células en proliferación (Ki67+) en cultivos de células satélite sobre-expresando Pitx2.

10

15

Figura 3. A) La expresión de Myf5 (qRT-PCR) aumenta en las células satélite que sobreexpresan Pitx2 y B) la cuantificación por inmunohistoquímica muestra un aumento significativo de las células Myf5+. C) La sobreexpresión del miR-106b conduce a una disminución de la expresión de Myf5 validándolo como target de este miRNA. D: Actividad normalizada de la luciferasa de el 3'-UTR Myf5 luciferasa reporter (WT Myf5 3'-UTR), con el plásmido vacío (Vector) o co-transfectando con pre-miR-106b muestra la pérdida de la actividad luciferasa con el miR-106b. No hay pérdida de la actividad luciferasa cuando la miR-106b "seed sequence" fue mutada.

20

25

Figura 4. A) Análisis mediante qRT-PCR de sobreexpresión de Pitx2c en los músculos de ratones MDX inyectados con células satélite distroficas transfectadas con el vector lentiviral LVX- Pitx2c-ZS-Green vector en comparación con los músculo inyectados con células transfectadas con el lentivirus vacío (LVX-ZS-Green vector); porcentaje de fibras formadas "de novo" (ZS-Green + cells) en los músculos trasplantados después de 15 días e imagen representativa. B) La disminución de la expresión de miR-31 en los músculos trasplantados con células sobreexpresando Pitx2 conduce a un aumento en los niveles de expresión de distrofina así como a un aumento significativo de las fibras que expresan distrofina. C) Treadmill test muestra la mejora funcional de ratones DMDmdx inyectados con células que sobreexpresan Pitx2. D) Análisis inmunohistoquímico de células en proliferación (Ki67+) después de 15 días del trasplante celular. E) Análisis de expresión mediante qRT-PCR de

30

35

los miRNAS modulados por Pitx2 en el musculo de los ratones DMDmdx a los que se les realizó el trasplante celular con células que sobreexpresan Pitx2. F) Los niveles de expresión de las ciclinas D1 y D2 así como del factor de transcripción Myf5 estaban aumentados en los músculos trasplantados con células que sobreexpresan Pitx2 indicando que la cascada molecular Pitx2-miRNAS está conservada en el sistema de trasplante "*in vivo*".

Descripción detallada de la invención

10 Definiciones

Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "gen Pitx2" es un miembro de la familia de factores de transcripción bicoid homeodominio que juega un papel relevante en la morfogénesis (Referencia secuencia polinucleotídica del Genbank con número de acceso NM_000325 identificativa de Homo sapiens paired-like homeodomain 2 (PITX2))

El término "aumento" o "aumentar" se refiere a aumentos por encima del nivel basal. Por ejemplo, los niveles basales son normales en los niveles *in vivo* antes de, o en ausencia de, la adición de un compuesto activador.

El término "reducción" o "reducir" o "inhibir" o "inhibición" se refiere a reducciones por debajo del nivel basal. Por ejemplo, los niveles basales son normales en los niveles *in vivo* antes de, o en ausencia de, la adición de un compuesto inhibidor.

En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a un número de términos que se definirán para tener los siguientes significados:

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el suceso o circunstancia descrito posteriormente puede o no ocurrir, y que la descripción incluye casos en los que dicho evento o circunstancia ocurre y casos en los que no.

Como se usa aquí, los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" se refieren a los métodos para evitar o impedir el desarrollo de una enfermedad o trastorno o retardar la recurrencia o la aparición de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto resultante de la administración de un agente profiláctico.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir la formulación utilizada para estabilizar, solubilizar y ser mezclado de alguna manera con ingredientes activos que se administran a los animales vivos, incluyendo los seres humanos. Esto incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, tal uso en las composiciones está contemplado.

El término "enfermedad", como se usa aquí, pretende ser sinónimo generalmente, y se usa de manera intercambiable con los términos "trastorno" y "condición" (como en la condición médica), en que todos reflejan una condición anormal del cuerpo o de una de sus partes que perjudica el funcionamiento normal y se manifiesta típicamente por signos distintivos y síntomas.

El término "terapia de combinación" significa la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección o trastorno terapéutico descrito en la presente descripción. Dicha administración abarca la co-administración de estos agentes terapéuticos de una manera sustancialmente simultánea, tal como en una sola cápsula que tiene una relación fija de ingredientes activos o en múltiples cápsulas separadas para cada ingrediente activo. Además, tal administración también abarca el uso de cada tipo de agente terapéutico de una manera secuencial. En cualquier caso, el régimen de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de compuestos en el tratamiento de las afecciones o trastornos descritos en la presente.

La frase "terapéuticamente eficaz" pretende calificar la cantidad de ingredientes activos utilizados en el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Esta cantidad será la necesaria para lograr el objetivo de reducir o eliminar dicha enfermedad o trastorno.

El término "sujeto" se refiere a todos los mamíferos, incluyendo los seres humanos. Los ejemplos de sujetos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, vacas, perros, gatos, cabras, ovejas, cerdos, y conejos.

A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones. Las descripciones de estas publicaciones en su totalidad se incorporan por referencia en esta solicitud a fin de describir más completamente el estado de la técnica a la que ésta pertenece. Las

referencias descritas son también individualmente y específicamente incorporadas aquí como referencia por el material contenido en ellas que es discutido en la frase sobre la que se basa dicha referencia.

5 **Descripción de la invención**

La presente invención aborda el problema de proporcionar nuevas terapias que resulten eficaces en el tratamiento de las distrofias musculares, aumentando la capacidad de regenerar el tejido perdido, como resultado de la distrofia muscular, de las células madre de músculo esquelético.

10

Con este propósito los autores de la presente invención han evaluado la contribución del gen Pitx2 en la regulación de la transcripción, específica de tejido, de distintos microRNAs durante la miogénesis. Los análisis de perfiles de expresión génica (microRNA-microarrays) en una línea celular de mioblastos (línea celular Sol8) ha llevado a identificar a los autores de la presente invención una serie de microRNAs (miRNAs) que son regulados diferencialmente en mioblastos Sol8 que sobreexpresan Pitx2 (ver figura 2). Los análisis de los efectos de dichos microRNAs en la proliferación de mioblastos y la identificación de sus supuestas dianas demuestran que Pitx2 regula un subconjunto de microRNAs que presenta un profundo efecto en la progresión del ciclo celular de mioblastos (miR15b, miR-23b, miR-106b y miR-503). Adicionalmente, los autores de la invención encontraron que esta vía Pitx2-miRNAs también regula la proliferación celular en células satélite aisladas del músculo esquelético de ratón (Figura 1). Estos resultados indican que Pitx2 actúa amplificando la población de mioblastos derivados de células satélite durante los procesos de diferenciación de la miogénesis regenerativa (Figura 3).

25

Adicionalmente, estos resultados demuestran que reducir la expresión de miRNA-106b en las células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal con respecto a la observada en ausencia del compuesto en dichas células, amplifica la población de mioblastos derivados de células satélite durante los procesos de diferenciación de la miogénesis regenerativa (ver figuras 3 y 4).

30

Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición (de aquí en adelante “composición de la presente invención”) que comprende un compuesto capaz de

35

- aumentar la expresión del gen Pitx2, compuesto activador, en las células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal con respecto a la observada en ausencia del compuesto en dichas células; y/o
- reducir la expresión del miRNA-106b, compuesto inhibidor, en las células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal con respecto a la observada en ausencia del compuesto en dichas células;

para la elaboración de un medicamento para promover la regeneración muscular.

Alternativamente, el primer aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende un compuesto capaz de

- aumentar la expresión del gen Pitx2, compuesto activador, en las células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal con respecto a la observada en ausencia del compuesto en dichas células; y/o
- reducir la expresión del miRNA-106b, compuesto inhibidor, en las células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal con respecto a la observada en ausencia del compuesto en dichas células;

para su uso en promover la regeneración muscular.

Por "aumenta la expresión del gen Pitx2" se entiende el aumento sobre la línea de base, o en comparación con a control, por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100%, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más veces.

Los compuestos activadores se pueden identificar mediante un método de cribado que permita identificar en un compuesto la capacidad de activar Pitx2, que comprende poner en contacto una célula, preferiblemente una célula madre satélite de músculo, con un compuesto que se sospecha que pueda activar Pitx2; ensayando el contenido de las células para determinar la cantidad y/o actividad biológica de Pitx2, y comparar la cantidad determinada y/o la actividad biológica de Pitx2a un nivel predeterminado, en el que un cambio de dicho importe y/o la actividad biológica de Pitx2 es indicativa de un compuesto

que activa Pitx2. En una realización preferida, la detección se realiza por RT-PCR cuantitativa en tiempo real, usando cebadores específicos para cada isoforma.

En el contexto de la presente invención por células madre satélite de músculo se entiende células madre, o pre-células musculares, que sirven para ayudar a la regeneración del músculo esquelético adulto. A raíz de la proliferación (cuando las célula satélite se activan) y la diferenciación posterior (cuando comienzan a expresar factores de transcripción que las comprometen hacia un linaje miogénico (mioblastos)), las células satélite se fusionan entre sí o con las adyacentes fibras musculares dañadas, lo que aumenta el número de mionucleos en las fibras para el crecimiento y la reparación. La activación y proliferación de células satélite es necesario a fin de satisfacer las necesidades de formación de nuevas fibras musculares para regenerar el musculo. La diferenciación es necesaria para que las células satélite puedan convertirse primero en mioblastos y tras el proceso de fusión, en fibras.

Una realización preferida del primer aspecto de la invención, se refiere al uso de la composición de la invención, donde dicho medicamento se usa para promover la regeneración muscular en el tratamiento de una distrofinopatía o distrofia. Preferiblemente, donde dicha distrofinopatía o distrofia se selecciona de la lista que consiste en la distrofia muscular de Duchenne y la distrofia muscular de Becker.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, se refiere al uso de la composición de la invención, donde dicho compuesto, compuesto activador, es un polinucleótido de ADN (de aquí en adelante polinucleótido de la invención) que comprende una secuencia seleccionada de la lista que consiste en:

- la secuencia polinucleotídica del Genbank con número de acceso NM_000325 o su secuencia complementaria;
- una secuencia que hibrida selectivamente con la secuencia de (a); y
- una secuencia polinucleotídica de ADN que codifica para una secuencia aminoacídica idéntica en al menos el 90%, 92%, 94%, 96%, 98% o 99% basándose en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia, a la secuencia aminoacídica del Genbank con número de acceso NP_000316.

En el contexto de la presente invención, la secuencia polinucleotídica del Genbank con número de acceso NM_000325 (SEQ ID NO 1) se identifica como Homo sapiens paired-like homeodomain 2 (PITX2), transcript variant 3, mRNA. Dicha secuencia nucleotídica se expone a continuación:

5
 GTTAGGCCAACAGGGAAGCGCGGAGCCGCAGATCTGGTCCGTCGCTCGCCTGGGTGC
 CTGGAGCTGAGCTGCGGCAAGGCCCGGCTCCTGTTGACCGCCCGAGGGGTGTGCGT
 GTGCGCGTTGCGGAGGGTGCCTCAGAGGGCCGCGTCGTGGCTGCAGCGGCTGCTG
 CCGCCGCAGGGGATCTAATATCACCTACCTGTCCCTGTCACTCTTGACACTTCTCTGTC
 10 AGGGCTGCCGCGTGGGGGGGGGGCGGGCAGAGCGCGGTGCGCGTTAGCTTTCCTTAT
 TGGAGGGGTTCTTGGGGGAGGGAGGGAGAGAAGAAGGGGGTCTTTGCCCACTCTTGT
 TTCGCTTTGGAGCTTGGAAGCCTGCTCCCTAAAGACGCTCTGAGTGGTGCCCTTCTGCC
 CACATCCCATGTCTTCGTTTGCCCGCTGACTTTCCTGCTCCGGACTTTTTCGCTTGAGC
 CTTCCGGAGGAGACGGGGGCGAGCTTGGCTTGAGAACTCGGCGGGGGTGTGCGTCCCCT
 15 GGCTCTCCCCGCAGCGGGGAACTCCGCGCCTAGAGCGCGACCCGGAGCGGGCAGC
 GGCGGCTACGGGGGCTCGGCGGGGCGAGTAGCCAAGGACTAGTAGAGCGTCGCGCTC
 CCTCGTCCATGAACTGCATGAAAGGCCCGCTTCACTTGGAGCACCGAGCAGCGGGGAC
 CAAGCTGTCGGCCGTCTCCTCATCTTCCTGTCAACCATCCCCAGCCGTTAGCCATGGCTT
 CGGTTCTGGCTCCCGGTCAGCCCCGGTCGCTGGACTCCTCCAAGCACAGGCTGGAGG
 20 TGCACACCATCTCCGACACCTCCAGCCCGGAGGCCGCAGAGAAAGATAAAAGCCAGCA
 GGGGAAGAATGAGGACGTGGGCGCCGAGGACCCGTCTAAGAAGAAGCGGCCAAAGGCG
 GCAGCGGACTCACTTTACCAGCCAGCAGCTCCAGGAGCTGGAGGCCACTTTCCAGAGG
 AACCGCTACCCGGACATGTCCACACGCGAAGAAATCGCTGTGTGGACCAACCTTACGG
 AAGCCCGAGTCCGGGTTTGGTTCAAGAATCGTCGGGCCAAATGGAGAAAGAGGGAGCG
 25 CAACCAGCAGGCCGAGCTATGCAAGAATGGCTTCGGGCCGCGAGTTCAATGGGCTCATG
 CAGCCCTACGACGACATGTACCCAGGCTATTCTACAACAACCTGGGCCGCCAAGGGCC
 TTACATCCGCCTCCCTATCCACCAAGAGCTTCCCCTTCTTCAACTCTATGAACGTCAACC
 CCCTGTCATCACAGAGCATGTTTTCCCCACCCAACCTCTATCTCGTCCATGAGCATGTGCG
 TCCAGCATGGTGCCCTCAGCAGTGACAGGCGTCCCGGGCTCCAGTCTAACAGCCTGA
 30 ATAACCTGAACAACCTGAGTAGCCCGTCGCTGAATTCCGCGGTGCCGACGCCTGCCTG
 TCCTTACGCGCCGCCGACTCCTCCGTATGTTTATAGGGACACGTGTAACCTGAGCCTGG
 CCAGCCTGAGACTGAAAGCAAAGCAGCACTCCAGCTTCGGCTACGCCAGCGTGCAGAA
 CCCGGCCTCCAACCTGAGTGCTTGCCAGTATGCAGTGGACCGGCCCGTGTGAGCCGC
 ACCCACAGCGCCGGGATCCTAGGACCTTGCCGGATGGGGCAACTCCGCCCTTGAAAGA
 35 CTGGGAATTATGCTAGAAGGTCGTGGGCACTAAAGAAAGGGAGAGAAAGAGAAGCTAT
 ATAGAGAAAAGGAAACCACTGAATCAAAGAGAGAGCTCCTTTGATTTCAAAGGGATGTC

CTCAGTGTCTGACATCTTTCACTACAAGTATTTCTAACAGTTGCAAGGACACATACACAA
 ACAAATGTTTGACTGGATATGACATTTTAACATTACTATAAGCTTGTTATTTTTTAAGTTTA
 GCATTGTTAACATTTAAATGACTGAAAGGATGTATATATATCGAAATGTCAAATTAATTTT
 ATAAAAGCAGTTGTTAGTAATATCACAAACAGTGTTTTTAAAGGTTAGGCTTTAAAATAAAG
 5 CATGTTATACAGAAGCGATTAGGATTTTTTCGCTTGCGAGCAAGGGAGTGTATATACTAAA
 TGCCACACTGTATGTTTCTAACATATTATTATTATAAAAAATGTGTGAATATCAGTTTT
 AGAATAGTTTCTCTGGTGGATGCAATGATGTTTCTGAAACTGCTATGTACAACCTACCCT
 GTGTATAACATTTCTGACAAATATTATTGTTTTACTTTTCAGCAAATATGAAACAAATGTGTT
 TTATTTTCATGGGAGTAAAATATACTGCATACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

10

En el contexto de la presente invención, la secuencia aminoacídica con número de acceso NP_000316 (SEQ ID NO 2) se identifica como. pituitary homeobox 2 isoform c [Homo sapiens]. Dicha secuencia aminoacídica se expone a continuación:

15 MNCMKGPLHLEHRAAGTKLSAVSSSSCHHPQPLAMASVLAPGQPRSLDSSKHRLEVHTIS
 DTSSPEAAEKDKSQGKNEDVGAEDPSKKKRQRRQRTHFTSQQLQELEATFQRNRYPDM
 STREEIAVWTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMY
 PGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPFFNSMNVNPLSSQSMFSPNSISSMSMSSSMVPSAV
 TGVPGSSLNSLNNLNNLSSPSLNSAVPTPACPYAPPTPPYVYRDTCNSSLASLRLKAKQHS
 20 SFGYASVQNPASNLSACQYAVDRPV

En el contexto de la presente invención, el grado de identidad de una secuencia aminoacídica se basa en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia.

25 En esta realización de la invención, dentro de los polinucleótidos de la invención se pueden incluir en ella nucleótidos sintéticos o modificados. Un número de tipos diferentes de modificación de polinucleótidos son conocidos en la técnica. Estos incluyen metilfosfato y cadenas principales de fosforotioato, adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, se debe entender
 30 que los polinucleótidos descritos en este documento pueden ser modificados por cualquier método disponible en la técnica.

Los polinucleótidos de acuerdo con la invención se puede producir recombinantemente, sintéticamente o mediante cualquier medio disponible para los expertos en la técnica.

35 También pueden ser clonados por técnicas estándar. Los polinucleótidos se proporcionan típicamente en forma aislada y/o purificada.

- Otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, se refiere al uso de la composición de la invención, donde el compuesto es un polinucleótido de ADN que comprende una secuencia seleccionada de la lista que consiste en la secuencia polinucleotídica con número de acceso NM_000325 (SEQ ID NO 1) o su secuencia complementaria o una secuencia polinucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica idéntica en al menos el 99%, basándose en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia, a la secuencia aminoacídica con número de acceso NP_000316.
- En un aspecto preferido de la invención adicional, los polinucleótidos de la invención, tales como los expuestos anteriormente, pueden ser transportados, sin degradación, por vectores plasmídicos o virales que incluyen un promotor de expresión del ácido nucleico en las células en las que es suministrado.
- Así, en una realización adicional de la invención, los compuestos activadores de la invención pueden comprender cualquiera de los polinucleótidos de la invención descritos anteriormente o un plásmido o un vector capaz de transportar o suministrar dichos polinucleótidos, preferiblemente mediante un vector viral.
- Los vectores virales son, por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociados, virus herpes, virus vaccinia, virus de la polio, virus del SIDA, virus trófico neuronal, Sindbis y otros virus de ARN, incluyendo entre éstos, virus con la estructura del VIH. También se prefieren las familias virales que comparten las propiedades de estos virus que los hacen adecuados para su uso como vectores. Los retrovirus son virus de la leucemia murina de Maloney, MMLV, y retrovirus que expresan las propiedades deseables de MMLV como un vector. Los vectores retrovirales son capaces de llevar una carga útil genética más grande, es decir, un gen o transgén marcador, que otros vectores virales, y por esta razón son un vector comúnmente usado. Sin embargo, no son tan útiles en células no proliferativas. Los vectores de adenovirus son relativamente estables y fáciles de trabajar, tienen títulos elevados, y se puede enviar en la formulación de aerosol, y pueden transfectar células que no se dividen. Los vectores virales de la viruela son grandes y tienen varios sitios para la inserción de genes, que son termoestables y pueden almacenarse a temperatura ambiente. Una realización preferida es un vector viral que ha sido diseñado con el fin de suprimir la respuesta inmunitaria del organismo huésped, provocados por los antígenos virales.

Los compuestos activadores pueden comprender, además de los polinucleótidos descritos de la invención, plásmidos o vectores o los péptidos de la invención, por ejemplo, lípidos tales como los liposomas, tales como liposomas catiónicos (por ejemplo, DOTMA, DOPE, DC-colesterol) o liposomas aniónicos.

5

Los liposomas pueden comprender además proteínas para facilitar la dirección a célula en particular, si se desea. La administración de una composición que comprende un compuesto y un liposoma catiónico que se puede administrar a la sangre aferente a un órgano diana. Además, el activador se puede administrar como un componente de una microcápsula que pueden ser dirigidos a tipos de células específicas, tales como cardiomiocitos, o donde la difusión del compuesto o la administración del compuesto de la microcápsula está diseñado para un tipo específico o una dosis.

10

Por lo tanto, otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, se refiere al uso de la composición de la invención, en el que dicho compuesto es un vector o plásmido capaz de transportar o suministrar la secuencia de polinucleótidos, tal y como se define ésta en el contexto de la presente invención, a las células madre satélite de músculo. Preferiblemente dicho vector es un vector viral que codifica para la secuencia de polinucleótidos tal y como ésta queda definida arriba. Más preferiblemente dicho vector viral seleccionado de la lista que consiste en vectores adenovirales, lentivirales, retrovirales y adenoasociados.

15

20

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, se refiere al uso de la composición de la invención, en el que dicho medicamento comprende células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal tratadas, transformadas, transfectadas o transducidas con el compuesto definido en el primer aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas. Preferiblemente, dichas células tratadas, transformadas, transfectadas o transducidas con el compuesto, son células de origen autólogo. Más preferiblemente, dichas células transformadas, transfectadas o transducidas con el compuesto, son células madre satélite de músculo de un sujeto humano que padece una distrofinopatía o una distrofia.

25

30

Por otro lado y tal y como se ha comentado con anterioridad, las figuras 3 y 4 de la presente invención demuestran que reducir la expresión miRNA-106b en las células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal con respecto a la observada en ausencia del

35

compuesto en dichas células amplifica la población de mioblastos derivados de células satélite durante los procesos de diferenciación de la miogénesis regenerativa.

Por consiguiente, un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende un compuesto, compuesto inhibidor, capaz de reducir la expresión del miRNA-106b en las células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal con respecto a la observada en ausencia del compuesto en dichas células, para la elaboración de un medicamento para promover la regeneración muscular.

En el contexto de la presente invención, por "inhibir o reducir la expresión del miRNA-106b" se entiende la reducción sobre la línea de base, o en comparación con a control, por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100%, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más veces.

Los compuestos inhibidores se pueden identificar mediante un método de cribado que permita identificar en un compuesto la capacidad de inhibir o reducir la expresión intracelular del miRNA-106b, que comprende poner en contacto una célula, preferiblemente una célula madre satélite de músculo, con un compuesto que se sospecha que pueda inhibir o reducir la expresión del miRNA-106b; ensayando el contenido de las células para determinar la cantidad y/o actividad biológica de la expresión del miRNA-106b, y comparar la cantidad determinada y/o la actividad biológica del miRNA-106b a un nivel predeterminado, en el que un cambio de dicho importe y/o la actividad biológica de la expresión de miRNA-106b es indicativa de un compuesto con la capacidad de inhibir o reducir la expresión intracelular del miRNA-106b. En una realización preferida, la detección se realiza por RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, dicho medicamento se usa para promover la regeneración muscular en el tratamiento de una distrofinopatía.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, dicha distrofia o distrofinopatía se selecciona de la lista que consiste en la distrofia muscular de Duchenne y la distrofia muscular de Becker.

En aún otra realización preferida del segundo aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, dicho compuesto es un ARN de interferencia (ARNip) del miRNA-106b tal y como un oligonucleótido antisentido de RNA del miRNA-106b o un polinucleótido que exprese dicho oligonucleótido antisentido. Preferiblemente, dicho compuesto es un oligonucleótido sintético antisentido de RNA del miRNA-106b que opcionalmente presenta modificaciones para incrementar su resistencia a las nucleasas. Más preferiblemente, dicho compuesto es un vector o plásmido capaz de transportar o suministrar dicho ARN de interferencia (ARNip) del miRNA-106b a las células madre satélite de músculo. Preferiblemente dicho vector es un vector viral y más preferiblemente se selecciona de cualquiera de los mencionados en el primer aspecto de la presente invención.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, dicho medicamento comprende células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal tratadas, transformadas, transfectadas o transducidas con el compuesto tal y como se ha definido éste en el segundo aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas. Preferiblemente, dichas células tratadas, transformadas, transfectadas o transducidas con el compuesto, son células de origen autólogo. Más preferiblemente, dichas células transformadas, transfectadas o transducidas con el compuesto, son células madre satélite de músculo de un sujeto humano que padece una distrofinopatía (una distrofia).

Por último, un tercer aspecto de la invención se refiere a un método de cribado de un compuesto capaz de promover la regeneración muscular que comprende:

1. Seleccionar compuestos a partir de una librería de compuestos;
2. Testar si alguno de dichos compuestos es capaz de:
 - a. aumentar la expresión del gen Pitx2 en las células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal con respecto a la observada en ausencia del compuesto en dichas células; y/o
 - b. reducir la expresión del miRNA-106b en las células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal con respecto a la observada en ausencia del compuesto en dichas células; y
3. Seleccionar aquel o aquellos compuestos capaces de llevar a cabo el mencionado en cualquiera de los apartados anteriores.

En el contexto de la presente invención, los polinucleótidos de ADN de la invención, tales como los descritos anteriormente, que se suministran a las células, se pueden integrar en el genoma de la célula huésped, normalmente a través de secuencias de integración. Estas secuencias están a menudo relacionadas con las secuencias virales, particularmente en sistemas basados en virus cuando se utilizan. Estos sistemas de integración virales también pueden ser incorporados en los ácidos nucleicos que se van a entregar usando un sistema de adición de ácido nucleico basada de entrega, tal como un liposoma, de modo que el ácido nucleico contenido en el sistema de suministro puede integrarse en el genoma del hospedador.

Otras técnicas generales para la integración en el genoma del huésped incluyen, por ejemplo, sistemas diseñados para promover la recombinación homóloga con el genoma del huésped. Estos sistemas se basan típicamente en la secuencia de flanco del ácido nucleico a expresar que tiene una homología suficiente con una secuencia diana en el genoma de la célula huésped donde la recombinación entre el vector de ácido nucleico y el ácido nucleico diana tiene lugar, haciendo que el ácido nucleico suministrado sea integrado en el genoma del huésped. Estos sistemas y los métodos necesarios para promover la recombinación homóloga son conocidos por los expertos en la técnica.

Los compuestos activadores o inhibidores descritos en la presente memoria se pueden administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable y se puede enviar a las células del sujeto in vivo y / o ex vivo mediante una variedad de mecanismos bien conocidos en la técnica como se ha comentado anteriormente.

Si los métodos *ex vivo* se emplean, las células o los tejidos pueden eliminarse y mantenerse fuera del cuerpo según protocolos estándar bien conocidos en la técnica. Los compuestos activadores o inhibidores se pueden introducir en las células a través de cualquier mecanismo de transferencia de genes, tales como, por ejemplo, suministro de genes mediado por fosfato de calcio, electroporación, microinyección o proteoliposomas. Las células transducidas pueden entonces infundirse (por ejemplo, en un vehículo farmacéuticamente aceptable) o ser homotópicamente trasplantadas en el sujeto por métodos estándar para el tipo de célula o tejido. Los métodos estándar son conocidos para el trasplante o infusión de varias células en un sujeto.

Los compuestos activadores o inhibidores de la presente invención se pueden utilizar en conjunto con otros métodos de tratamiento.

Además, proporcionado en la presente memoria, se incluye un método para aumentar o mejorar el estado clínico y la percepción de bienestar de un sujeto con distrofia o con una distrofinopatía, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto activador/inhibidor, lo que aumenta o mejora el estado clínico del sujeto tratado por un cierto período de tiempo.

Los métodos actuales de tratamiento incluyen también un método para aumentar la eficacia de otros agentes propuestos para la misma enfermedad, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto activador o inhibidor, y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable, aumentando así la eficacia del otro agente o agentes.

En cualquier caso, las composiciones que comprenden el compuesto activador o inhibidor se pueden administrar *in vivo* en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un sujeto, junto con el ácido nucleico o vector, sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de una manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. El vehículo, naturalmente, se selecciona para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como es bien conocido para un experto en la técnica.

Las dosificaciones efectivas y los calendarios de administración de las composiciones que comprenden el compuesto activador o inhibidor descritos en este documento pueden ser determinadas empíricamente, y hacer tales determinaciones está dentro de la experiencia en la técnica. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son aquellos lo suficientemente grandes para producir el deseado efecto anti-hipertrófico en el trastorno. La dosificación no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas, y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, condición, sexo y extensión de la enfermedad en el paciente, la vía de administración, o si otros fármacos se incluyen en el régimen, y puede ser determinada por un experto en la técnica. La dosificación puede ser ajustada por el médico individual en caso de cualquier contraindicación. La dosis puede variar, y puede ser administrada en una o más administraciones de dosis diarias, durante

uno o varios días. Se pueden encontrar orientaciones en la bibliografía para las dosificaciones apropiadas para las clases dadas de productos farmacéuticos.

El siguiente ejemplo sirve meramente para ilustrar la presente invención.

5

Ejemplos

Ejemplo 1. Pitx2 y regeneración muscular

10 En base a los resultados mostrados en las figuras, y teniendo en cuenta que, interesadamente, la expresión de Pitx2 está significativamente aumentada durante la regeneración muscular en ratón y disminuida en el modelo murino de Distrofia muscular de Duchenne (ratones DMDmdx), llevamos a cabo un aproximación experimental de trasplante de células "in vivo" para testar si Pitx2 podía mejorar la capacidad regenerativa de las
15 células satélite aisladas de músculos distróficos. Es importante señalar que la posibilidad de modificar la capacidad regenerativa de las propias células distróficas supone una ventaja significativa para su aplicación terapéutica en humanos (posibilidad de utilizar las células del paciente distrófico). Los resultados obtenidos permiten poner de manifiesto que la sobreexpresión Pitx2 mejora la regeneración muscular llevada a cabo por las células satélite
20 distróficas aumentando la regeneración muscular en ratones MDX. Así, nuestros resultados demuestran que el trasplante de células satélite distróficas sobreexpresando Pitx2 en ratones DMDmdx conduce a:

- Un aumento en el número de miofibras formadas "de novo" (Figura 4A);
- 25 - Reprime la expresión de miR- 31 produciendo una restauración de la distrofina (Figura 4B)
- Produciendo finalmente una mejora funcional del músculo muy significativa (Figura 4C).

30 Por lo tanto, estos análisis nos llevan a identificar a miR- 31 como un miRNA regulado por Pitx2 durante la regeneración muscular . Además , también hemos obtenido evidencias adicionales que muestra que la vía de Pitx2-miRNAs controlando la proliferación celular está también presente en nuestro modelo de trasplante celular "in vivo" en ratones DMDmdx (Figuras 4D-F). En conjunto, estos resultados colocan a Pitx2 como molécula reguladora de
35 diferentes miRNAs que desempeñan un papel fundamental en los circuitos moleculares que controlan la proliferación y/o diferenciación de las células satélite. Revelando el importante

papel de Pitx2 en la biología celular de las células satélite del músculo esquelético e identificando funciones desconocidas de Pitx2 modulando la miogénesis regenerativa en el musculo distrófico.

5 **Ejemplo 2. Exposición detallada de los resultados de la invención.**

En primer lugar, tal y como se muestra en la figura 2, apartados A) y B), la transfección con el vector lentiviral bicistrónico LVX-Pitx2c-ZSGreen resultó en la sobreexpresión de Pitx2 en células satélite de ratón. Adicionalmente, esta sobreexpresión, ver figura 2 apartado C),
10 resultó en una expresión disminuida de los miRNAs: miR-15b, miR-106b, miR-23b y miR-503 (qRT-PCR), tanto en las células en estadios tempranos de activación (EPq) como en estadios más avanzados de activación (EPa) (qRT-PCR).

Por otro lado, tal y como se muestra en la figura 2 D), la transfección con el vector lentiviral
15 bicistrónico LVX-Pitx2c-ZSGreen conduce a una aumento de la expresión de los genes de control de ciclo celular ciclina D1 y ciclina D2 (qRT-PCR) indicando que, de forma similar a lo que ocurre en mioblastos, la vía Pitx2-miRNAs controla proliferación en células satélite.

En segundo lugar, tal y como se ilustra en la figura 3 A), la expresión de Myf5 (qRT-PCR)
20 aumenta en las células satélite que sobreexpresan Pitx2, es más, la cuantificación por inmunohistoquímica, ver figura 3 apartado B), muestra un aumento significativo de las células Myf5+. Por otro lado, de acuerdo a la figura 3 apartado C), la sobreexpresión del miR-106b conduce a una disminución de la expresión de Myf5 validándolo como target de este miRNA. Más aún, se hicieron varios experimentos para calcular la actividad
25 normalizada de la luciferasa del 3'-UTR Myf5 luciferasa reporter (WT Myf5 3'-UTR) transfectando con el plásmido vacío (Vector) o co-transfectando con pre-miR-106b. Tal y como se muestra en la figura 3 apartado D, únicamente co-transfectando con WT pre-miR-106b se produce una represión de la expresión de Myf5 por miR-106b demostrando, por tanto, que Myf5 es un target directo para el miR-106b.. De hecho, no hay pérdida de la
30 actividad luciferasa cuando la miR-106b "seed sequence" fue mutada, demostrando así la especificidad de unión del miR-106b a estas "seed sequence" del 3'UTR de Myf5 (ver figura 3 apartado D))

En tercer lugar, tal y como se muestra en la figura 4 apartado A), el análisis mediante qRT-
35 PCR muestra la sobreexpresión de Pitx2c en los músculos de ratones MDX inyectados con células satélite distroficas transfectadas con el vector lentiviral LVX- Pitx2c-ZS-Green vector

en comparación con los músculo inyectados con células transfectadas con el lentivirus vacío (LVX-ZS-Green vector); porcentaje de fibras formadas “*de novo*” (ZS-Green + cells) en los músculos trasplantados después de 15 días e imagen representativa. Por otro lado, la figura 4 apartado B), muestra como la disminución de la expresión de miR-31 en los músculos trasplantados con células que sobre-expresan Pitx2 conduce a un aumento en los niveles de expresión de distrofina así como a un aumento significativo de las fibras que expresan distrofina. Adicionalmente, los autores de la presente invención llevaron a cabo un Treadmill test, ver figura 4 apartado C), donde se muestra la mejora funcional de ratones DMDmdx inyectados con células que sobreexpresan Pitx2. Por último, la figura 4 apartado F, muestra como los niveles de expresión de las ciclinas D1 y D2 así como del factor de transcripción Myf5 estaban aumentados en los músculos trasplantados con células que sobreexpresan Pitx2 indicando que la cascada molecular Pitx2-miRNAS está conservada en el sistema de trasplante “*in vivo*”.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende un compuesto polinucleotídico de ADN que a su vez comprende una secuencia que consiste en la secuencia polinucleotídica SEQ ID NO 1 o su secuencia complementaria, para la elaboración de un medicamento para promover la regeneración muscular.
2. El uso de la composición de la reivindicación 1, donde dicho medicamento se usa para promover la regeneración muscular en el tratamiento de una distrofinopatía.
3. El uso según la reivindicación 2, donde dicha distrofinopatía se selecciona de la lista que consiste en la distrofia muscular de Duchenne y la distrofia muscular de Becker.
4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho compuesto es un vector o plásmido capaz de transportar o suministrar dicha secuencia de polinucleótidos a las células madre satélite de músculo ex vivo.
5. El uso según la reivindicación 4, en el que dicho vector es un vector viral que codifica para la secuencia de polinucleótidos definida en la reivindicación 1.
6. El uso según la reivindicación 5, en el que dicho vector es un vector viral seleccionado de la lista que consiste en vectores adenovirales, lentivirales, retrovirales y adenoasociados.
7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicho medicamento comprende células madre satélite de músculo de un sujeto humano o animal tratadas, transformadas, transfectadas o transducidas con el compuesto definido en la reivindicación 1.
8. El uso según la reivindicación 7, donde dichas células tratadas, transformadas, transfectadas o transducidas con el compuesto definido en la reivindicación 1, son células de origen autólogo.

9. El uso según la reivindicación 7 o 8, donde dichas células transformadas, transfectadas o transducidas con el compuesto definido en la reivindicación 1, son células madre satélite de músculo de un sujeto humano que padece una distrofinopatía.

5

10

15

20

25

Fig. 1

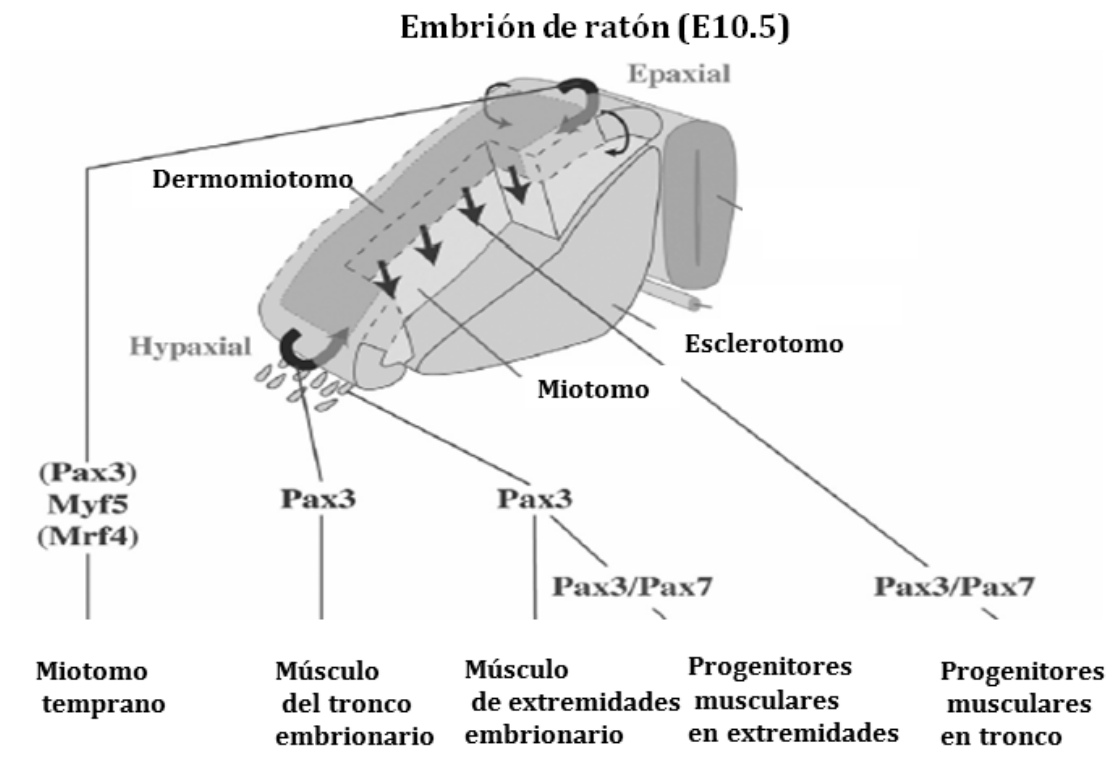


Fig. 2

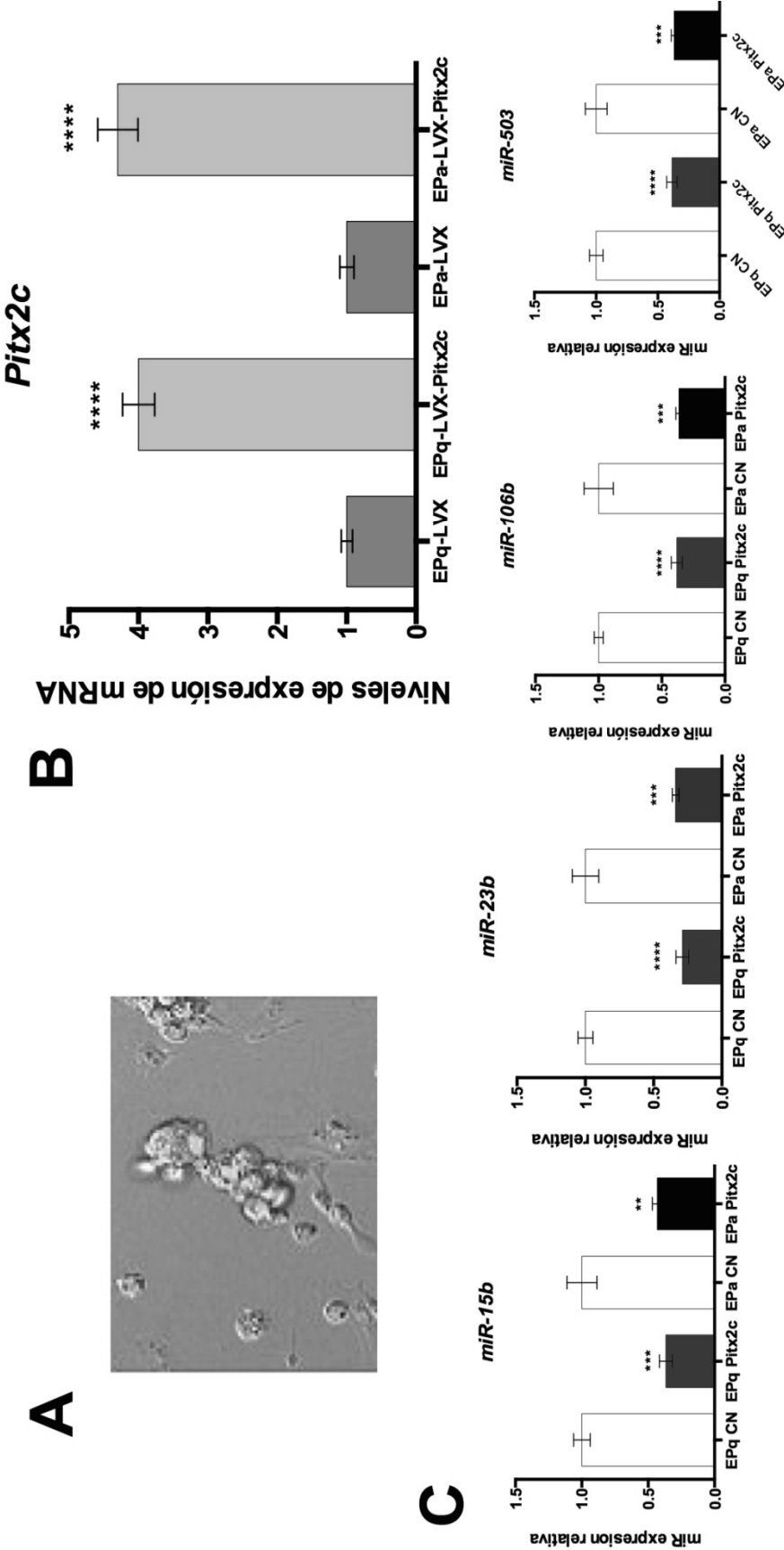


Fig. 2 (cont.)

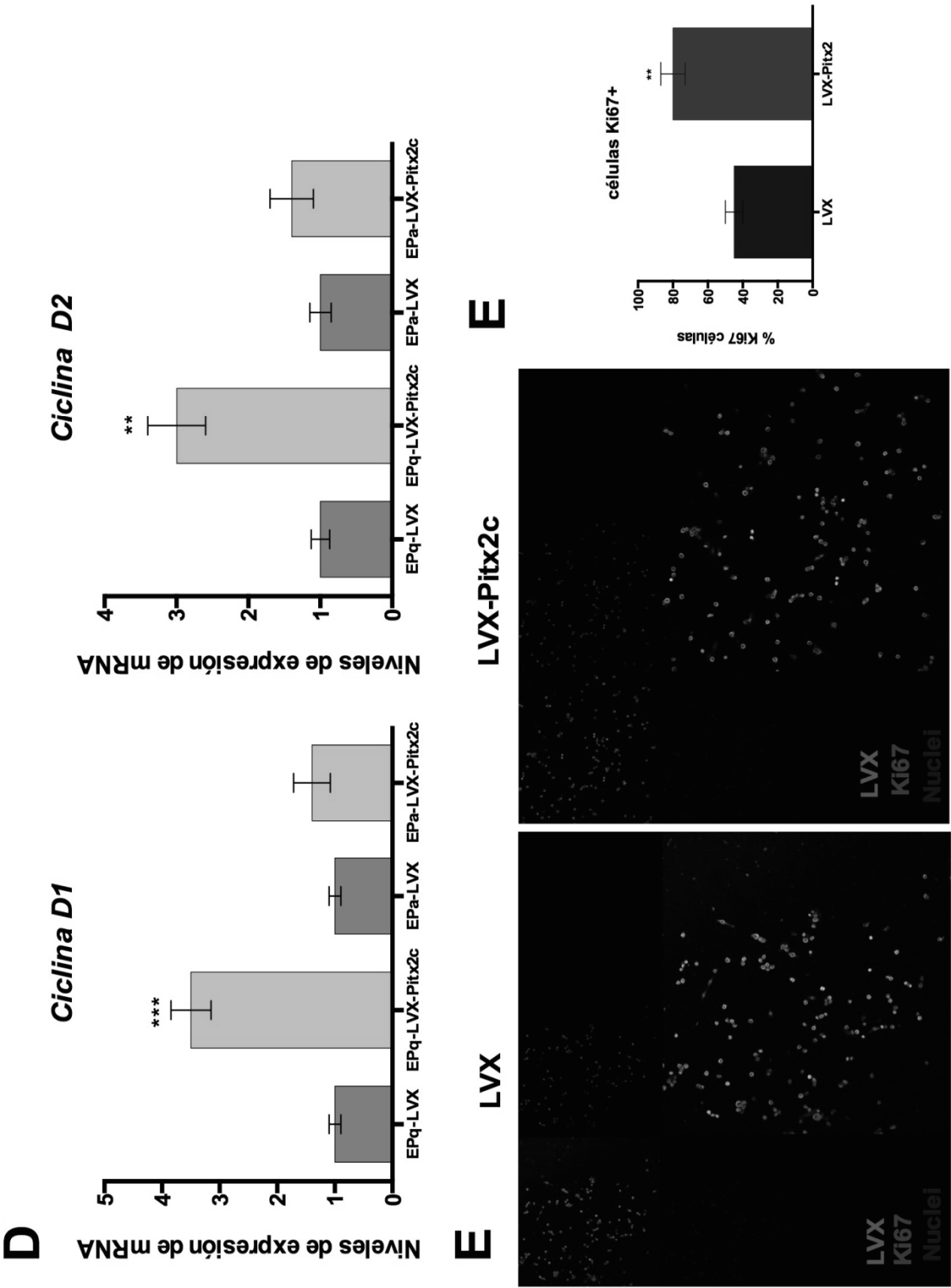


Fig. 3

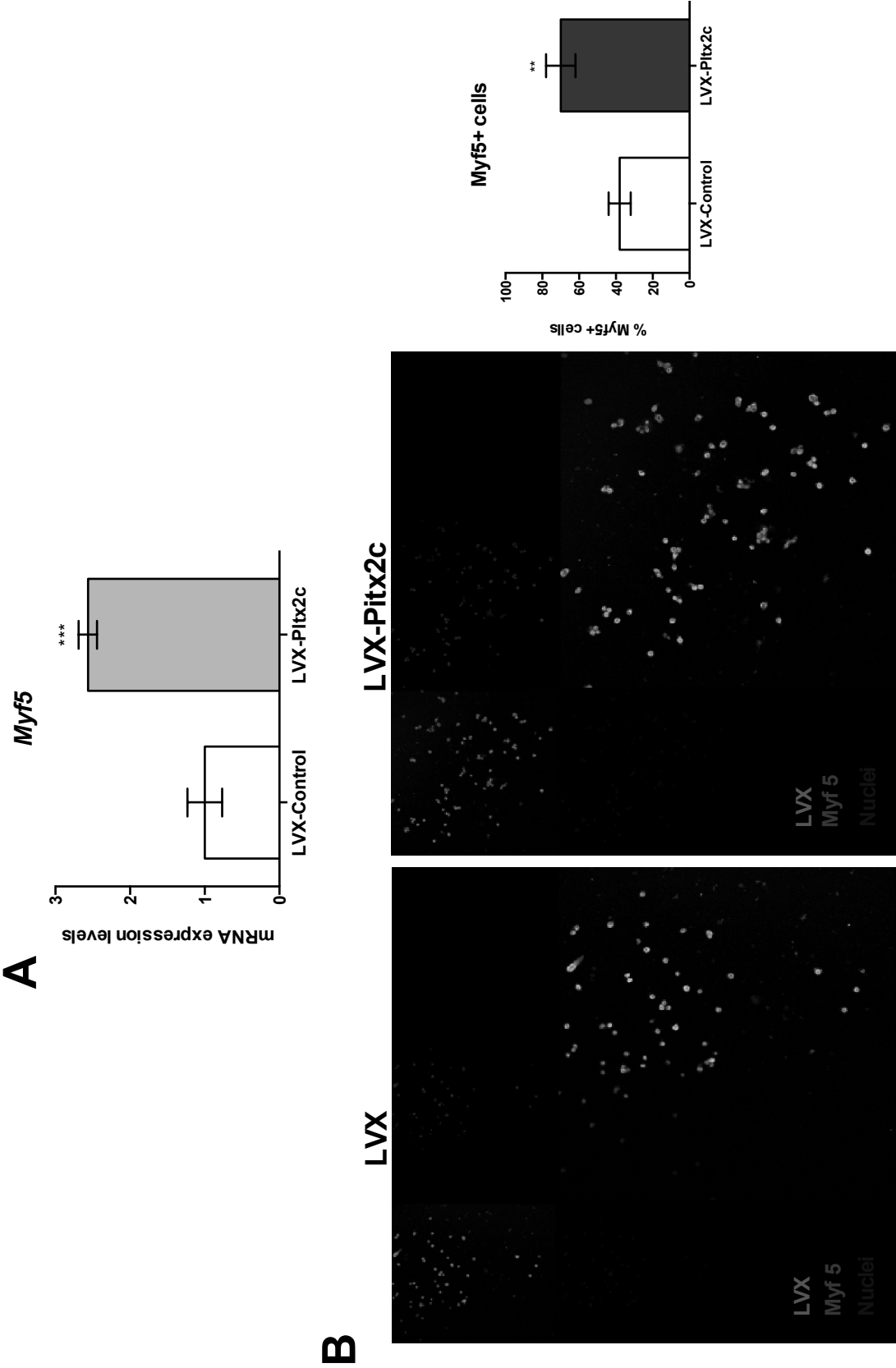


Fig. 3 (cont.)

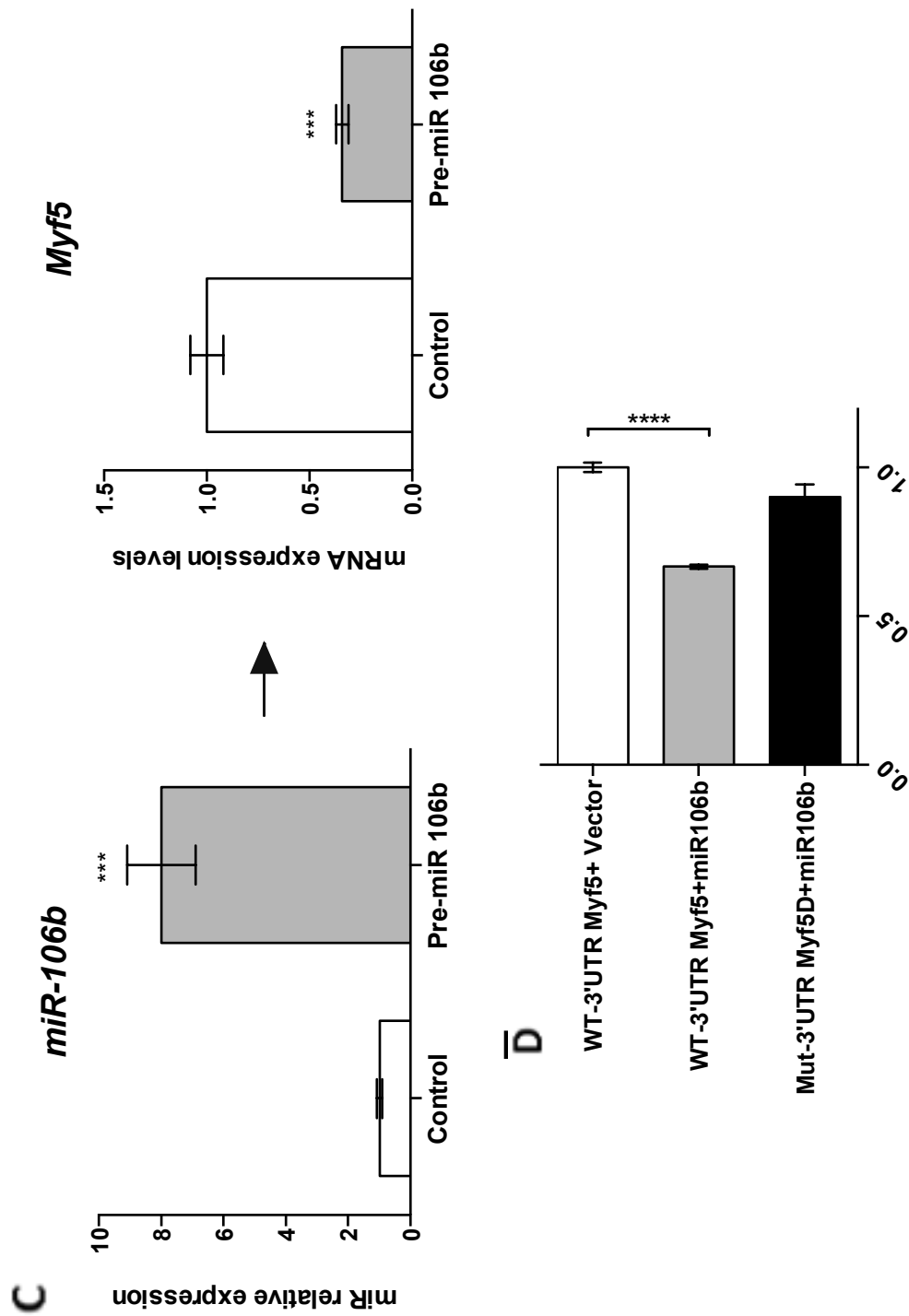


Fig. 4

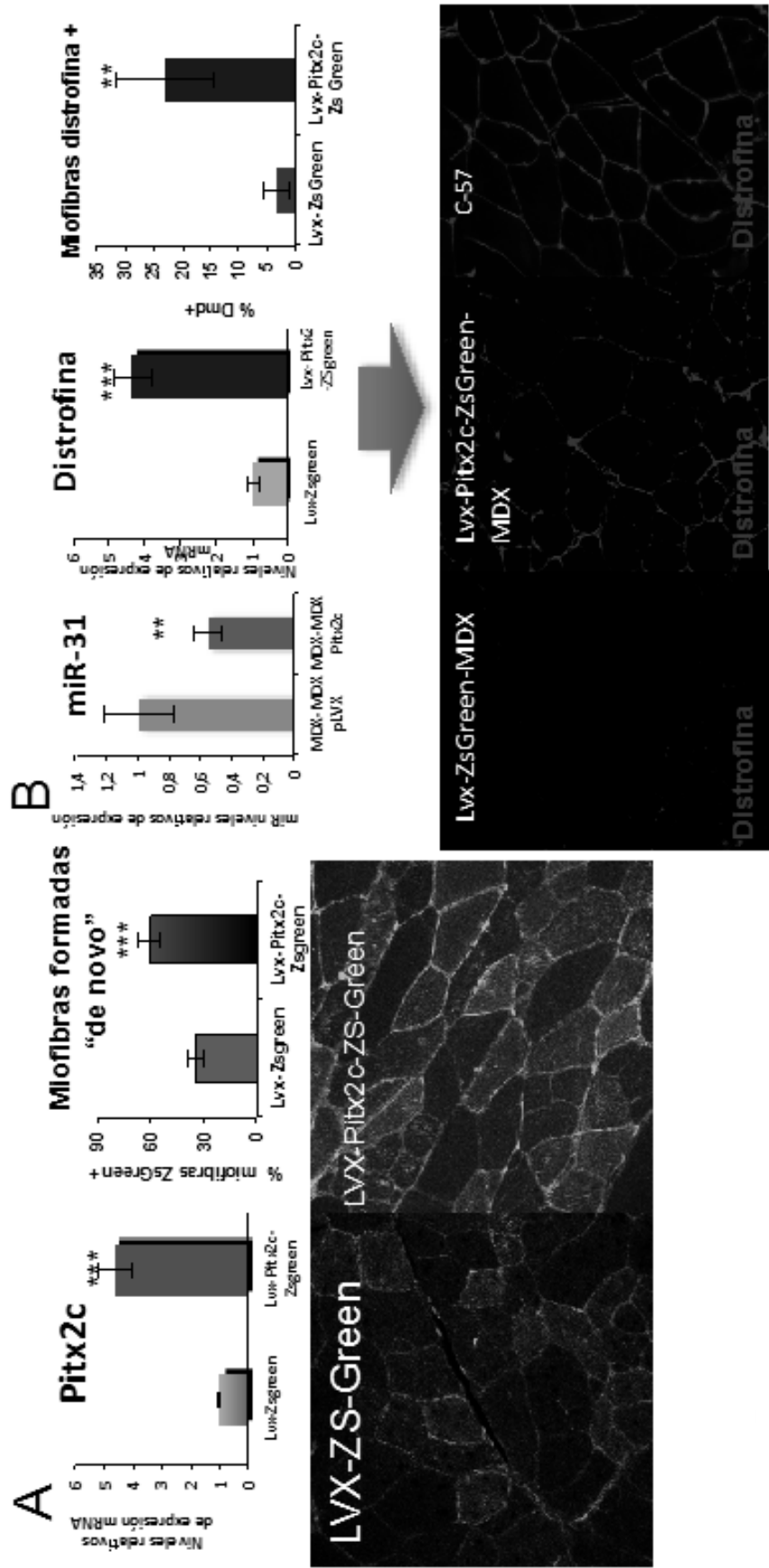
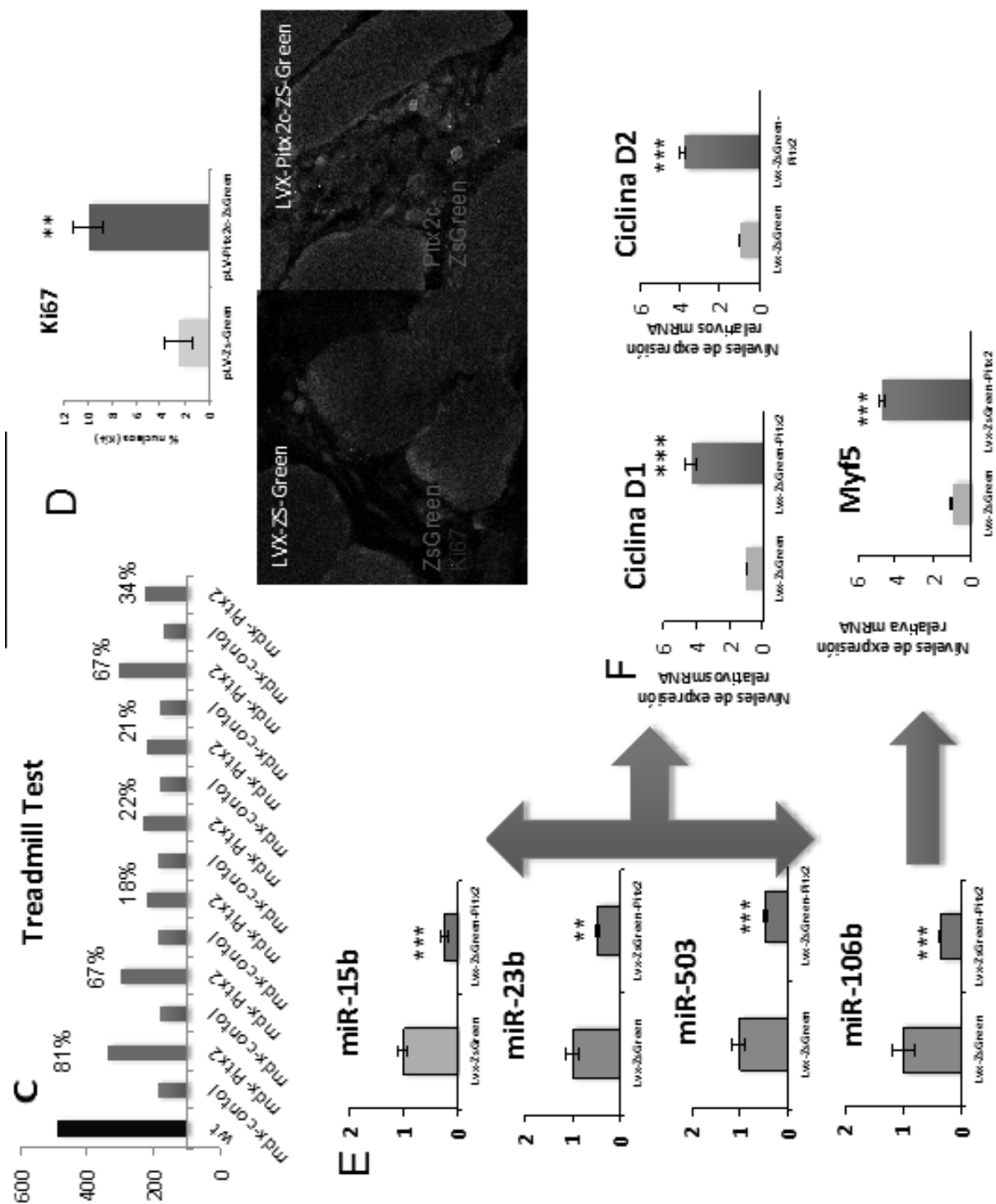


Fig. 4 (cont.)



ES 2 559 106 B1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Jaén
 <120> Método de activación de la expresión del gen Pitx2 para promover la regeneración muscular.
 <130> 900687
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 2337
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2337)
 <223> secuencia polinucleotídica del Genbank con número de acceso NM_000325

 <400> 1
 gttaggccaa caggaagcg cggagccgca gatctggtcc gtcgctcgcc tgggtgcctg 60
 gagctgagct gcggcaaggc ccggctcctg ttcgaccgcc cgaggggtgt gcgtgtgcgc 120
 gttgcggagg gtgcgctcag agggccgctg cgtggctgca gcggctgctg ccgccgcagg 180
 ggatctaata tcacctacct gtccctgtca ctcttgacac ttctctgtca gggctgccgc 240
 gtgggggggg ggcgggcaga gcgcggtcgg cgtagcttt ccttattgga ggggttcttg 300
 ggggagggag ggagagaaga aggggtctt tgcccactct tgtttcgctt tggagcttgg 360
 aagcctgctc cctaaagacg ctctgagtgg tgcccttctg cccacatccc atgtcttcgt 420
 ttgcccgtg actttccgtc tccggacttt ttcgcttgag ccttccggag gagacggggg 480
 cagcttggct tgagaactcg gcgggggttg cgtcccctgg ctctccccgc agcggggaaa 540
 ctccgcgcct agagcgcgac ccggagcggg cagcggcggc tacgggggct cggcggggca 600
 gtagccaagg actagtagag cgtcgcgctc cctcgtccat gaactgcatg aaaggcccgc 660
 ttcacttga gcaccgagca gcggggacca agctgtcggc cgtctcctca tcttctgtc 720
 accatcccca gccgttagcc atggcttcgg ttctggctcc cggtcagccc cggtcgctgg 780
 actcctcaa gcacaggctg gaggtgcaca ccatctccga cacctccagc ccggaggccg 840
 cagagaaaga taaaagccag caggggaaga atgaggacgt gggcgccgag gaccgctcta 900
 agaagaagcg gcaaaggcgg cagcggactc actttaccag ccagcagctc caggagctgg 960
 aggccacttt ccagaggaac cgctaccgga acatgtccac acgcaagaa atcgtgtgt 1020
 ggaccaacct tacggaagcc cgagtccggg tttggttcaa gaatcgtcgg gccaaatgga 1080
 gaaagagga gcgcaaccag caggccgagc tatgcaagaa tggcttcggg ccgcagttca 1140
 atgggctcat gcagccctac gacgacatgt acccaggcta ttcctacaac aactgggccg 1200
 ccaagggcct tacatccgcc tccctatcca ccaagagctt ccccttcttc aactctatga 1260
 acgtcaaccc cctgtcatca cagagcatgt tttccccacc caactctatc tcgtccatga 1320

ES 2 559 106 B1

gcatgtcgtc cagcatggtg ccctcagcag tgacaggcgt cccgggctcc agtctcaaca 1380
 gcctgaataa cttgaacaac ctgagtagcc cgtcgctgaa ttccgcggtg cgcacgcctg 1440
 cctgtcctta cgcgccgccg actcctccgt atgtttatag ggacacgtgt aactcgagcc 1500
 tggccagcct gagactgaaa gcaaagcagc actccagctt cggctacgcc agcgtgcaga 1560
 acccggcctc caacctgagt gcttgccagt atgcagtgga cgggcccggtg tgagccgcac 1620
 ccacagcggc gggatcctag gaccttgccg gatggggcaa ctccgccctt gaaagactgg 1680
 gaattatgct agaaggctgt gggcactaaa gaaagggaga gaaagagaag ctatatagag 1740
 aaaaggaaac cactgaatca aagagagagc tcctttgatt tcaaagggat gtcctcagtg 1800
 tctgacatct ttcactacaa gtattttctaa cagttgcaag gacacatata caaacaatg 1860
 tttgactgga tatgacattt taacattact ataagcttgt ttttttttaa gtttagcatt 1920
 gttaacattt aaatgactga aaggatgtat atatatcgaa atgtcaaatt aattttataa 1980
 aagcagttgt tagtaatatc acaacagtgt ttttaaaggt taggctttta aataaagcat 2040
 gttatacaga agcgattagg atttttcgct tgcgagcaag ggagtgtata tactaaatgc 2100
 cacactgtat gtttctaaca tattattatt attataaaaa atgtgtgaat atcagtttta 2160
 gaatagtttc tctggtggat gcaatgatgt ttctgaaact gctatgtaca acctaccctg 2220
 tgtataacat ttcgtacaat attattgttt tacttttcag caaatatgaa acaaattgtgt 2280
 tttatttcat gggagtaaaa tatactgcat acaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 2337

<210> 2
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(324)
 <223> secuencia aminoacídica con número de acceso NP_000316 (SEQ ID NO 2) se identifica como. pituitary homeobox 2 isoform c [Homo sapiens]

<400> 2

Met Asn Cys Met Lys Gly Pro Leu His Leu Glu His Arg Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Thr Lys Leu Ser Ala Val Ser Ser Ser Ser Cys His His Pro Gln Pro
 20 25 30

Leu Ala Met Ala Ser Val Leu Ala Pro Gly Gln Pro Arg Ser Leu Asp
 35 40 45

Ser Ser Lys His Arg Leu Glu Val His Thr Ile Ser Asp Thr Ser Ser
 50 55 60

Pro Glu Ala Ala Glu Lys Asp Lys Ser Gln Gln Gly Lys Asn Glu Asp
 65 70 75 80

ES 2 559 106 B1

Val Gly Ala Glu Asp₈₅ Pro Ser Lys Lys Lys₉₀ Arg Gln Arg Arg Gln Arg
 Thr His Phe Thr₁₀₀ Ser Gln Gln Leu Gln₁₀₅ Glu Leu Glu Ala Thr₁₁₀ Phe Gln
 Arg Asn Arg₁₁₅ Tyr Pro Asp Met Ser₁₂₀ Thr Arg Glu Glu Ile₁₂₅ Ala Val Trp
 Thr Asn₁₃₀ Leu Thr Glu Ala Arg₁₃₅ Val Arg Val Trp Phe₁₄₀ Lys Asn Arg Arg
 Ala₁₄₅ Lys Trp Arg Lys Arg₁₅₀ Glu Arg Asn Gln Gln₁₅₅ Ala Glu Leu Cys Lys₁₆₀
 Asn Gly Phe Gly₁₆₅ Pro Gln Phe Asn Gly₁₇₀ Leu Met Gln Pro Tyr Asp₁₇₅ Asp
 Met Tyr Pro Gly₁₈₀ Tyr Ser Tyr Asn Asn₁₈₅ Trp Ala Ala Lys Gly₁₉₀ Leu Thr
 Ser Ala Ser₁₉₅ Leu Ser Thr Lys Ser₂₀₀ Phe Pro Phe Phe Asn₂₀₅ Ser Met Asn
 Val Asn₂₁₀ Pro Leu Ser Ser Gln₂₁₅ Ser Met Phe Ser Pro₂₂₀ Pro Asn Ser Ile
 Ser₂₂₅ Ser Met Ser Met Ser₂₃₀ Ser Ser Met Val Pro₂₃₅ Ser Ala Val Thr Gly₂₄₀
 Val Pro Gly Ser Ser₂₄₅ Leu Asn Ser Leu Asn₂₅₀ Asn Leu Asn Asn Leu Ser₂₅₅
 Ser Pro Ser Leu₂₆₀ Asn Ser Ala Val Pro₂₆₅ Thr Pro Ala Cys Pro₂₇₀ Tyr Ala
 Pro Pro Thr₂₇₅ Pro Pro Tyr Val Tyr₂₈₀ Arg Asp Thr Cys Asn₂₈₅ Ser Ser Leu
 Ala Ser₂₉₀ Leu Arg Leu Lys Ala₂₉₅ Lys Gln His Ser Ser₃₀₀ Phe Gly Tyr Ala
 Ser₃₀₅ Val Gln Asn Pro Ala₃₁₀ Ser Asn Leu Ser Ala₃₁₅ Cys Gln Tyr Ala Val₃₂₀
 Asp Arg Pro Val



- ②① N.º solicitud: 201530645
②② Fecha de presentación de la solicitud: 12.05.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HEBERT, S. L. et al. The role of Pitx2 in maintaining the phenotype of myogenic precursor cells in the extraocular muscles. PLoS One. Marzo 2013, Vol. 8, Nº 3, páginas: e58405. ISSN 1932-6203 (impreso) ISSN 1932-6203 (electrónico) <Doi: doi:10.1371/journal.pone.0058405>	1-9
X	GUDDATI, A. K. et al. Embryonic stem cells overexpressing Pitx2c engraft in infarcted myocardium and improve cardiac function. International Heart Journal. Noviembre 2009, Vol. 50, Nº 6, páginas: 783-799. ISSN 1349-2365.	1
A		4-8
A	LOZANO-VELASCO, E. et al. Pitx2c modulates Pax3+/Pax7+ cell populations and regulates Pax3 expression by repressing miR27 expression during myogenesis. Developmental Biology. Septiembre 2011, Vol. 357, Nº 1, páginas: 165-178. ISSN 0012-1606. <Doi:10.1016/j.ydbio.2011.06.039>	1-9
A	MARTÍNEZ-FERNANDEZ, S. et al. Pitx2c overexpression promotes cell proliferation and arrests differentiation in myoblasts. Developmental Dynamics. Noviembre 2006, Vol. 235, Nº 11, páginas: 2930-2939. ISSN 1058-8388.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
01.02.2016

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/077 (2010.01)
A61K35/34 (2015.01)
C07K14/47 (2006.01)
A61P21/00 (2006.01)

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

C12N, A61K, A61P, C07K

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

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPDX, NPL, ENA Sequence Release, ENA Coding Sequence Release, NR Patent DNAs Level-1, Uniparc, NR Patent Proteins Level-1

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.02.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-9	SI
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		SI
	Reivindicaciones	1-9	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HEBERT, S. L. et al. PLoS One. Marzo 2013, Vol. 8, Nº 3, páginas: e58405.	07.03.2013
D02	GUDDATI, A. K. et al. International Heart Journal. Noviembre 2009, Vol. 50, Nº 6, páginas: 783-799.	11.2009
D03	LOZANO-VELASCO, E. et al. Developmental Biology. Septiembre 2011, Vol. 357, Nº 1, páginas: 165-178.	01.09.2011
D04	MARTINEZ-FERNANDEZ, S. et al. Developmental Dynamics. Noviembre 2006, Vol. 235, Nº 11, páginas: 2930-2939.	11.2006

En D01 se investiga por qué los músculos esqueléticos extraoculares (EOM), no se ven afectados por las distrofias musculares que padecen los músculos esqueléticos de las extremidades. Así, se destaca el posible papel de las células precursoras EECD34 y del gen Pitx2, como factores determinantes de esta diferencia.

D02 consigue la regeneración del músculo cardíaco infartado en ratones, mediante la inyección de células madre cardíacas transfectadas con Pitx2c.

En D03 se divulga que el incremento de la expresión de Pitx2c en la línea celular de mioblastos Sol8, mantiene estas células con una capacidad proliferativa elevada, bloqueando su fusión celular en miotubos y su diferenciación. Además, Pitx2 ayuda al mantenimiento de la autorenovación en las células satélite Pax3+/Pax7+ en músculo adulto, lo que quizá pueda tener aplicaciones en medicina regenerativa.

En D04 se demuestra que el incremento de la expresión de Pitx2c en la línea celular de mioblastos Sol8, aumenta la proliferación celular de los mismos y detiene su diferenciación. Este hallazgo quizá sea útil en la regeneración del músculo esqueleto mediante mioblastos.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud tiene por objeto, el uso de una composición que comprende células madre satélite musculares autólogas de un sujeto, transfectadas con un vector viral que comprende el gen Pitx2 (SEQ ID NO: 1), en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne o la de Becker (reivindicaciones de la 1 a la 9).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP11/1986)

Las reivindicaciones de la 1 a la 9 cumplen el requisito de novedad (art. 6.1 LP).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP11/1986)

El objeto de la solicitud es, según las reivindicaciones de la 1 a la 4 y de la 7 a la 9, el uso de una composición que comprende células madre satélite autólogas transfectadas con un vector que comprende la SEQ ID NO: 1, en la elaboración de un medicamento para promover la regeneración muscular en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne o de Becker. La SEQ ID NO: 1 corresponde al gen Pitx2 humano.

En D01 se investiga por qué los músculos esqueléticos extraoculares (EOM) no padecen las distrofias musculares que sufren los músculos esqueléticos de las extremidades. Para ello, se analizan las diferencias que existen entre ambos tejidos, tanto en la población de células madre, como en la expresión de Pitx2. Un factor a considerar, es que las células precursoras miogénicas CD34+/Scal-/CD45-/CD31-, llamadas células EECD34, se encuentran en mayor abundancia en los EOM que en los músculos esqueléticos de las extremidades. Además, las EECD34 de los EOM tienen mayor capacidad de proliferación y el nivel de expresión de Pitx2 es más alto, que las EECD34 de músculo esquelético procedentes de la región de la tibia anterior (TA). Para demostrar el papel de Pitx2 en la proliferación de estas células precursoras, se inhibió la expresión del mismo, lo que redujo el nivel de proliferación, y la capacidad de fusionarse y formar miotúbulos de las EECD34 de ambos orígenes. Por último, se midió Pitx2 en ratones sanos y con distrofia muscular de Duchenne. Tanto en los ratones sanos como en los que padecían distrofia, se encontraron más células progenitoras EECD34 que expresaban Pitx2 en los EOM que en la TA. Estos datos, apoyarían la hipótesis de que la expresión de Pitx2 en las células madre satélite juega un papel fundamental en que los EOM no padezcan distrofias musculares.

A raíz de los datos aportados en D01, se considera que un experto en la materia intentaría el uso de una composición que comprendiera células madre satélite autólogas, transfectadas con un vector que comprenda la SEQ ID NO: 1, en la elaboración de un medicamento para promover la regeneración muscular en la distrofia muscular de Duchenne o de Becker.

En consecuencia, dado D01, las reivindicaciones de la 1 a la 4 y de la 7 a la 9, no presentan actividad inventiva (art. 8.1 LP).

En las reivindicaciones 5 y 6, se indica que el vector que codifica para la SEQ ID NO: 1 es un vector adenoviral, lentiviral, retroviral o adenoasociado.

Estos vectores son de uso común en la transfección celular, por lo que se entiende que en vista de D01, las reivindicaciones 5 y 6 no cumplen el requisito de actividad inventiva (art. 8.1 LP).

Por último, el objeto de la reivindicación 1, es el uso de una composición que comprende una molécula de ADN que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1, en la elaboración de un medicamento para promover la regeneración muscular.

D02 desarrolla una composición que comprende células madre cardíacas transfectadas con Pitx2 de ratón. El aumento de expresión de este gen indujo su diferenciación a cardiomiocitos funcionales. Además, la inyección de estas células madre en el ventrículo de ratones infartados, produjo la recuperación de la capacidad contráctil y la presión sanguínea en los ratones.

La diferencia entre D02 y la reivindicación 1, es que en este documento se utiliza Pitx2 de ratón, mientras que en la solicitud Pitx2 de origen humano.

Sin embargo, se considera que un experto en la materia, intentaría el uso de la SEQ ID NO: 1 en la elaboración de un medicamento para promover la regeneración muscular, con una expectativa razonable de éxito.

Por este motivo, D02 afecta a la actividad inventiva de la reivindicación 1 (art. 8.1 LP).