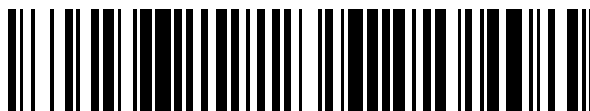


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 675**

51 Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2016** E **16165324 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018** EP **3081228**

54 Título: **Irisina para el cuidado y la prevención de la osteoporosis**

30 Prioridad:

16.04.2015 IT MI20150558

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

25.02.2019

73 Titular/es:

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI (50.0%)

Piazza Umberto I N° 1

70121 Bari , IT y

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

(50.0%)

72 Inventor/es:

GRANO, MARIA;

COLAIANNI, GRAZIANA;

CUSCITO, CONCETTA;

BRUNETTI, GIACOMINA;

COLUCCI, SILVIA;

CINTI, SAVERIO y

MORI, GIORGIO

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 701 675 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

Irisina para el cuidado y la prevención de la osteoporosis

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es el uso de la irisina para el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis.

5 Campo técnico y estado de la técnica

En los diez últimos años, la incidencia general de la osteoporosis y de las fracturas relacionadas con la fragilidad ósea aumentaron en aproximadamente un 30%. Tal incremento está ligado en parte a la mayor esperanza de vida de la población en los 50 últimos años. En general, la osteoporosis es un problema de salud global: la Organización Mundial de la Salud considera a la osteoporosis como el segundo problema crítico de salud, precedido únicamente por las enfermedades cardiovasculares. En función de las estimaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud, en 2050 podrán producirse aproximadamente 6,3 millones de fracturas femorales, aproximadamente 4,6 millones más que en 1990. En Italia, las fracturas femorales causadas por la osteoporosis cuestan a la Seguridad Social (SSN) 6.800 millones de euros cada 5 años. Considerando que las fracturas femorales aumentan cada década tanto para mujeres (28%) como para hombres (36%), se sigue una mayor necesidad de estancias hospitalarias o de atención domiciliaria, con un notable aumento de costes que ha de pagar la SSN. En Italia, se calcula que cada año se producen de 70.000 a 90.000 hospitalizaciones por fracturas femorales y se calcula que el gasto en salud por costes directos asciende a 568 millones de euros anuales. Por lo tanto, el uso de un fármaco/suplemento dirigido a la reducción del riesgo de fractura permitiría una notable reducción del gasto de la SSN, con notables beneficios económicos, además de mejorar la calidad de vida de la población de edad avanzada.

20 La osteoporosis es una afección en la que el esqueleto está sometido a una pérdida de masa y resistencia óseas, debido a múltiples factores, tales como, por ejemplo, factores nutricionales, metabólicos o patológicos así, el esqueleto está sujeto a un mayor riesgo de fracturas, a raíz de la disminución en la densidad ósea y de cambios y/o alteraciones que se producen en el ámbito de la microarquitectura de los huesos.

25 Generalmente, la osteoporosis predispone a uno, según se ha mencionado, a mayor desarrollo de fracturas, tanto traumáticas como patológicas, llevando en consecuencia a una reducción en la calidad y la esperanza de vida. Además, no debe pasarse por alto el aspecto causado por la posibilidad de la incidencia de complicaciones debidas a las fracturas, si no son debidamente tratadas.

30 Se conocen varias terapias para la osteoporosis. Por ejemplo, la suplementación con vitamina D3 es útil tanto en sujetos sanos, para llevar a cabo una acción preventiva, como en sujetos osteoporóticos y osteopénicos. Las dos formas usadas de vitamina D son la vitamina D2 (ergocalciferol) y la vitamina D3 (colecalfiferol), administrable de forma oral o intramuscular.

Otros tratamientos suplementarios conocidos, que producen un efecto beneficioso en el ámbito del hueso son, por ejemplo, la suplementación con calcio (por ejemplo, carbonato cálcico), magnesio (por ejemplo, en forma de pidolato de magnesio) y diversos microelementos adicionales, tales como manganeso, boro, estroncio, silicio y cinc.

35 En el cuidado de la osteoporosis, también se usan los fármacos denominados "antirresortivos"; es decir, fármacos que actúan reduciendo o bloqueando la erosión ósea arbitrada por los osteoclastos y que con este mecanismo son capaces de reducir considerablemente las fracturas patológicas. Algunos ejemplos de estos fármacos son: denosumab, alendronato, risedronato, ibandronato, neridronato, clodronato, zoledronato, calcitonina, y fármacos que actúan en los niveles hormonales, tales como raloxifeno, bazedoxifeno, lasofoxifeno, tibolona, TOS con estrógeno-progestina, testosterona (andrógenos).

40 Otro ejemplo de fármaco usado es el ranelato de estroncio (una sal de estroncio), que es el iniciador de una clase de fármacos denominados DABA (Dual Action Bone Agents, agentes óseos de doble acción), cuya característica es tener doble acción. De hecho, el ranelato de estroncio actúa a la vez como fármaco antirresortivo y como fármaco anabolizante. En otras palabras, el ranelato de estroncio actúa tanto suprimiendo los osteoclastos como, al mismo tiempo, estimulando la producción y la actividad de los osteoblastos, induciendo con ello un aumento de la densidad mineral ósea (DMO).

También se usan fármacos denominados "osteofrmadores", caracterizados por un mecanismo de acción basado en la reconstrucción ósea, en contraposición con los fármacos denominados "antirresortivos", que están limitados, en vez de ello, a reducir la erosión de los huesos.

50 Objetos de la invención

Así, un objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto que puede ser usado en el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto que puede ser usado en el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis como sustituto del ejercicio físico. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto que no tiene efectos secundarios y que puede ser usado de forma individual o en combinación con otras terapias. Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un compuesto que puede ser usado como suplemento para la prevención de la osteoporosis.

Descripción de la invención

Los objetos anteriormente mencionados y otros objetos adicionales que serán aclarados mejor en lo que sigue son logrados por la presente invención, cuyo objeto es la irisina usada en el tratamiento de la osteoporosis.

De hecho, se ha verificado con sorpresa que la irisina ejerce una acción anabolizante directa en el tejido óseo. La irisina es conocida por su capacidad de inducir la transdiferenciación de los adipocitos blancos a pardos. Se ha observado con sorpresa que también es capaz de ejercer una acción directa en células del tejido óseo, tales como los osteoblastos y los precursores de los mismos.

La irisina es una proteína. En los seres humanos, la irisina es codificada por el gen FNDC5. Más precisamente, el gen FNDC5 codifica una prohormona denominada "proteína 5 contenedora de dominio de fibronectina de tipo III" que, tras la escisión proteolítica que se produce en el ámbito de la membrana plasmática, da origen a la irisina.

El primer papel descrito para la molécula de irisina es inducir la transdiferenciación del tejido adiposo blanco a pardo. La irisina activa el fenómeno denominado "pardeamiento"; es decir, actúa en los adipocitos presentes en los depósitos de tejido adiposo blanco induciendo su transdiferenciación a adipocitos pardos, cuya función principal es regular la termogénesis. Por lo tanto, tal molécula es actualmente candidata para curar la obesidad.

Se ha demostrado que el tratamiento terapéutico con irisina de ratones normales y obesos indujo una potente transdiferenciación de los adipocitos blancos a adipocitos pardos. El efecto dependía del aumento de expresión de un marcador de adipocito pardo, la UCP1 (proteína 1 de desacoplamiento), en ratones tratados con irisina, y conllevó una reducción significativa de peso corporal en estos ratones.

Otros estudios revelaron que las células de Purkinje del cerebelo de rata y ratón expresan irisina, cuya función sería inducir la diferenciación neuronal de las células madre embrionarias del ratón.

También es sabido que el agotamiento energético, característico del infarto de miocardio, afecta negativamente a la concentración circulante de irisina, lo que indica una asociación negativa de esta miocina con el infarto. De hecho, se ha demostrado que su síntesis se reduce en las 4 horas siguientes al evento isquémico y se sugiere que la irisina pueda ser mencionada entre los marcadores novedosos de infarto.

Otros usos conocidos son, por ejemplo, la utilización de la irisina en la inducción de la oxidación de ácidos grasos y de la biogénesis mitocondrial, así como su utilización para prevenir la lesión por reperfusión postisquémica después del infarto.

Es objeto de la presente invención un uso innovador y ventajoso de la irisina; concretamente, el uso de la irisina en el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis.

De hecho, se ha observado que la irisina ejerce una acción anabolizante en el tejido óseo; es decir, induce un aumento de la diferenciación osteoblástica a partir de precursores presentes en la médula ósea, así como un aumento en la producción de colágeno de tipo I, la proteína más abundante de la matriz ósea.

G. Colaianni y otros (*International Journal of Endocrinology*, 2014, vol. 43, nº 8, páginas 615-8) divulgan que la irisina endógena está directamente implicada en el metabolismo óseo y que es capaz de aumentar la diferenciación de las células estromales de la médula ósea en osteoblastos maduros. Los autores sugieren que la irisina podría representar una nueva terapia anabolizante para ganar masa ósea en la osteopenia causada por la sarcopenia, la caquexia y la microgravedad.

Zhang Jin y otros (Extracto 1222, *Journal of Bone and Mineral Research*, 2012, vol. 27, nº Suplemento 1, páginas 1-6) demuestran que la hormona irisina promueve la diferenciación de osteoblastos y que la irisina inducida por el ejercicio arbitra el fortalecimiento del hueso al regular el metabolismo óseo. Los autores sugieren que la irisina es una molécula potencial para la prevención y el tratamiento de enfermedades óseas como la osteoporosis. La presente invención es particularmente ventajosa, porque la irisina puede ser usada en el tratamiento de diferentes afecciones osteoporóticas, caracterizadas por la pérdida de masa ósea tales como, por ejemplo, la osteoporosis en el envejecimiento, la osteoporosis por inmovilidad, la degeneración muscular (sarcopenia), la caquexia asociada con un tumor, enfermedades neuromusculares, la osteoporosis debida a la ausencia de carga mecánica (microgravedad, tal como, por ejemplo, en el caso de la ausencia de gravedad a la que son sometidos los astronautas en los largos periodos de tiempo pasados en el espacio durante sus misiones espaciales), así como en los casos de osteoporosis postmenopáusica. Además, se ha observado con sorpresa, según la presente invención, que la irisina puede desempeñar un efecto mimético del ejercicio; en otras palabras, se ha observado que su administración produce los mismos efectos beneficiosos de un ejercicio físico regular. En virtud de su sorprendente efecto mimético del

ejercicio, según la presente invención, la irisina puede ser usada con fines terapéuticos y/o preventivos en lugar del ejercicio físico. Por ejemplo, puede ser usada ventajosamente en sujetos que tengan las afecciones anteriormente mencionadas que estén en tal estado que no puedan practicar el ejercicio físico, tales como, por ejemplo, personas de edad avanzada particularmente debilitadas, o personas que tengan discapacidades motoras o parálisis. Según la presente invención, además de las ventajas ya expuestas, la irisina puede ser usada como suplemento, también con un fin preventivo. A título de ejemplo, la irisina puede ser administrada con fin preventivo en sujetos sanos, también jóvenes, en particular si existe riesgo de osteoporosis, que realicen poco ejercicio físico o ninguno.

En el tratamiento de la osteoporosis, según la presente invención, puede administrarse irisina, en dosis convenientemente calibradas, sola o junto con otros fármacos, preferentemente fármacos ya conocidos para el tratamiento de la osteoporosis.

Otro objeto de la presente invención es una composición que comprende irisina usada para el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis. Según una realización preferente, tales composiciones pueden comprender excipientes y/o aditivos para su uso farmacéutico.

Según una realización, la irisina según la invención es irisina recombinante. Según la presente invención, la expresión "irisina recombinante" se refiere a irisina obtenida por transcripción y traducción de un fragmento de ADN codificante, precisamente irisina, en un organismo anfitrión que normalmente no la expresa. También según la invención, como organismo anfitrión pueden usarse, por ejemplo, bacterias, a partir de las cuales se extrae y purifica subsiguientemente la proteína, es decir, la irisina recombinante.

En una realización preferente, tal irisina recombinante comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

DSPSAPVNVTVRHLKANSVVSVDVLEDEVVIGFAISQQKKDVRMLRFIQE
VNTTTRSCALWDLEEDTEYIVHVQAIISIQGQSPASEPVLFKTPREAEMASK
NKDEVTMKE (SEQ. ID NO. 1)

Preferentemente, la irisina recombinante según la presente invención está constituida por la secuencia de aminoácidos SEQ. ID NO. 1.

Según otra realización, la secuencia de aminoácidos de la irisina para su uso en el tratamiento y la prevención de la osteoporosis según la presente invención muestra un porcentaje de identidad de secuencia con respecto a la SEQ. ID NO. 1 entre el 60% y el 99%, preferentemente entre el 80% y el 99%, más preferentemente entre el 90% y el 99%, y aún más preferentemente entre el 95% y el 99%.

Según la presente invención, con "porcentaje de identidad" se quiere decir el grado de coincidencia entre la secuencia de referencia y otras posibles secuencias según la invención.

Según otra realización de la presente invención, se administra irisina, preferentemente irisina recombinante, a una dosificación entre 500 µg/kg y 50 µg/kg, preferentemente entre 250 µg/kg y 75 µg/kg. Según otra realización preferente de la presente invención, se administra irisina, preferentemente irisina recombinante, a una dosificación de 100 µg/kg.

La unidad de medición de µg/kg denota que la dosificación de irisina se calibra al peso corporal del sujeto o del animal al que se administrará tal molécula; en particular, está definida como la cantidad de irisina (en peso, expresado en µg) que ha de administrarse por cada kg del paciente o del modelo animal.

La presente invención, cuyo objeto es la irisina usada en el tratamiento de la osteoporosis, presenta una ventaja adicional. La irisina, según la invención, es usada con resultados sorprendentes en el tratamiento de la osteoporosis, también en ausencia del ejercicio físico necesario, en lugar del mismo, como soporte de la acción de los tratamientos conocidos hasta la fecha. De hecho, todas las terapias actualmente conocidas para la prevención y/o el tratamiento de la osteoporosis se basan, para su éxito óptimo, en la asociación entre la terapia farmacológica y el ejercicio físico de apoyo. Este aspecto también puede representar un problema notable en el caso de sujetos incapaces (por la edad, por condiciones generales temporales o permanentes, etc.) de practicar ni tan siquiera ejercicio físico suave.

Los beneficios del ejercicio físico son reconocidos de forma generalizada, por lo que el ejercicio físico está considerado entre los mejores tratamientos no farmacológicos que apoyan a los propios tratamientos farmacológicos, para afecciones importantes como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, la obesidad y, precisamente, la osteoporosis. De hecho, se cree que muchos de los factores implicados en la aparición de la osteoporosis, como, por ejemplo, cambios hormonales, ausencia de ejercicio físico, baja ingesta de proteína en la dieta y la inflamación crónica, contribuyen a la aparición concomitante de la sarcopenia y de la osteoporosis. Por ejemplo, un niño que crezca con enfermedades neuromusculares congénitas desarrolla huesos largos y frágiles con

una circunferencia perióstica reducida. El fenotipo paralítico de los niños afectados por espina bífida se caracteriza por una demora en la mineralización de la matriz ósea en los huesos largos de la extremidad paralizada.

5 Según la presente invención, se ha observado con sorpresa que el tratamiento con irisina no solo reduce y/o previene la degeneración de la masa ósea y, así, la aparición de osteoporosis, sino que también es capaz de imitar el efecto combinado del tratamiento farmacológico asociado con un ejercicio físico significativo.

Es objeto de la invención, según otro de sus aspectos, un procedimiento de prevención y/o de tratamiento de la osteoporosis que comprende la administración de una cantidad efectiva de irisina a un sujeto necesitado de la misma.

10 Las realizaciones preferentes de la invención anteriormente indicadas también se aplican al procedimiento de tratamiento de la invención.

Entonces, según se definirá con mayor detalle en la sección experimental, la efectividad de la irisina en el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis ha sido observada por un estudio realizado *in vivo*, usando modelos murinos experimentales de ratones sanos y osteoporóticos a los que se les administró irisina durante 4 semanas. Al final del tratamiento, algunos segmentos esqueléticos de los animales fueron sometidos a análisis de esqueleto por micrografía computarizada (microCT).

En un primer grupo de animales de ratones C57BL6 de 3 meses de edad (grupo 1, ratón joven y sano), se observó que las tibias de ratones tratados con irisina presentaron un aumento de la densidad mineral ósea (DMO) cortical de aproximadamente el 10% con respecto a la de ratones mantenidos en las mismas condiciones e inyectados con placebo. Además, fue posible formular la hipótesis de que la administración de irisina modificaría la geometría del hueso cortical, porque se observó un aumento de la circunferencia perióstica y del momento polar de inercia (MPI). Estos dos parámetros son indicativos, respectivamente, de la resistencia de los huesos largos a la flexión y la torsión. En otros grupos de animales —concretamente en modelos murinos de osteoporosis que formaron grupos adicionales de animales (2, 3, 4 y 5)—, la sorprendente efectividad de la irisina en el tratamiento de la osteoporosis encontró confirmación adicional. En los modelos murinos de osteoporosis, que formaron grupos adicionales de animales empleados (2, 3, 4 y 5), la afección de la osteoporosis se logró usando el ratón joven suspendido, el ratón de edad avanzada, el ratón de edad avanzada suspendido y ratonas jóvenes ovariectomizadas. Específicamente, el modelo murino “suspendido” es el usado y aceptado de manera generalizada en la comunidad científica para evaluar la pérdida de masa ósea dependiendo de la ausencia de carga mecánica (condición a la que están sometidos, por ejemplo, las personas inmovilizadas y los astronautas durante misiones espaciales). En particular, según la presente invención, el denominado modelo murino “suspendido” contempla que el roedor sea suspendido por la cola, para que las extremidades traseras estén levantadas del suelo y ya no estén sometidas a carga mecánica. En tales animales, la ambulación solo está permitida por las extremidades delanteras.

La suspensión de roedores por la cola es un planteamiento consolidado para crear, en la tierra, un modelo de microgravedad y/o un desuso musculoesquelético que simulan los cambios fisiológicos asociados con el vuelo en el espacio, o los que se producen durante la inmovilización en cama durante periodos prolongados.

El tratamiento con irisina recombinante en ratones de edad avanzada permitió confirmar el efecto de la irisina en el tejido óseo degenerado por el envejecimiento.

En el segundo grupo de animales de ratones C57BL6 de 3 meses de edad (grupo 2, modelo murino osteoporótico joven: ratón “suspendido”), los resultados obtenidos por el análisis de microCT demostraron que los ratones jóvenes mantenidos durante 4 semanas en ausencia de carga mecánica, perdieron un 5% de densidad mineral ósea cortical (DMO) con respecto a los ratones mantenidos en condiciones de control (ambulación normal). Por el contrario, en ratones suspendidos y, a la vez, tratados con irisina, la reducción en DMO quedó, sorprendentemente, anulada por completo. También en el ámbito del componente trabecular de la tibia, en el que se encontró una reducción en la DMO del 39% en el ratón suspendido con respecto a uno normalmente capaz de ambular, se observó que el tratamiento con irisina minimizó la pérdida hasta un 23%, con una mejora, así, del 16% de la densidad mineral ósea con respecto a los controles. Además, en los ratones suspendidos se observó una reducción de la proporción entre volumen óseo y volumen total (BV/TV) del 47%, mientras que en los suspendidos y, a la vez, tratados con irisina, tal reducción es aminorada en un 6%. Esta disminución puede ser explicada por un aumento en el número de trabéculas óseas. De hecho, se observó que, mientras que los ratones suspendidos y tratados con placebo presentaron un 65% menos en el número trabecular con respecto a los controles, los ratones suspendidos e inyectados con irisina presentaron solo un 52% menos de trabéculas, mostrando así una pérdida de reducción del número trabecular del 13%. Tal cifra cobra gran importancia si consideramos que la integridad del hueso trabecular es fundamental para la resistencia del hueso cortical a las fracturas y representa, además, el componente sujeto a mayor deterioro en todas las formas de osteoporosis.

55 Así, tales resultados confirmaron que la irisina puede ser usada de manera efectiva en el tratamiento de la osteoporosis; por ejemplo, en la osteoporosis debida a la ausencia de carga mecánica (microgravedad).

La efectividad de la irisina en la osteoporosis senil fue confirmada usando ratones de edad avanzada. La osteoporosis senil se caracteriza por una reducción gradual de la masa ósea, causada por la condición metabólica generada a partir de la reducción de los niveles de estrógeno y que también se agrava muchísimo debido a la ambulación reducida y a la degeneración muscular. De hecho, está bien documentado que, en sujetos de edad avanzada, tanto hombres como mujeres, el estradiol biodisponible en circulación (denominado 17β-estradiol o E2) declina hasta una concentración de 11 pg/ml y, por debajo de este umbral, la tasa de pérdida de masa ósea se hace inversamente proporcional a su concentración. Es importante subrayar que los estrógenos son capaces de enlazarse con el receptor del andrógeno y, sobre todo, que los andrógenos pueden convertirse en estrógenos. La conversión de andrógenos en estrógenos se produce a través de un proceso que implica a la enzima aromatasa, que está distribuida de forma generalizada y muy conservada entre los vertebrados. Esta enzima convierte la androstenediona, la testosterona y la 16α-hidroxitestosterona en estrona, estradiol y estriol, respectivamente.

En el tercer grupo de animales de ratones C57BL6 de 15 meses de edad (grupo 3, modelo murino osteoporótico: ratón de edad avanzada), caracterizado por una pérdida importante de masa ósea que implicaba componentes tanto corticales como trabeculares, se confirmó la efectividad de la irisina en el tratamiento de la osteoporosis senil. De hecho, en ratones tratados con irisina, se observaron un aumento de la densidad mineral ósea cortical de aproximadamente un 8% y un aumento de la trabecular de un 24% con respecto al placebo. Además, en ratones de edad avanzada, en los que la masa ósea trabecular (BV/TV) de la tibia es, de promedio, inferior en un 55% con respecto a la de un ratón joven de 3 meses de edad, el tratamiento con irisina ha sido eficaz en la estimulación de la recuperación de masa ósea: de hecho, se observó una recuperación de masa ósea del 12%, relacionado con el aumento del número trabecular.

El cuarto grupo de animales de ratones C57BL6 de 15 meses de edad (grupo 4, modelo murino osteoporótico: ratón de edad avanzada “suspendido”), que representaba un modelo murino de osteoporosis en el envejecimiento acompañado de inmovilidad, confirmó los efectos de la irisina en la recuperación de masa ósea en aquellas condiciones patológicas en las que una ambulación reducida o ausente también está asociada con la caída del nivel de hormonas esteroideas, tales como, por ejemplo, en pacientes de edad avanzada postrados en cama.

Los resultados de microCT demostraron que, en las tibias de ratones suspendidos de edad avanzada, en los que, normalmente, la pérdida de DMO cortical empeora un 10% con respecto a la de los ratones que ambulan libremente, el tratamiento con irisina reduce tal pérdida a un 5%. En cuanto a la densidad mineral del hueso trabecular en ratones suspendidos de edad avanzada en los que se reduce en aproximadamente un 45% con respecto a la de ratones de edad avanzada con ambulación, el tratamiento con irisina reduce tal pérdida en un 15%; de hecho, en tales animales, se ha observado una reducción de la densidad mineral ósea en solo un 30%. La drástica reducción de la masa ósea observada en el ratón suspendido de edad avanzada también se ve confirmada por las alteraciones de los otros parámetros del hueso trabecular. La reducción de la masa trabecular, que caracteriza al ratón suspendido de edad avanzada con respecto al ratón de edad avanzada que puede ambular normalmente, confirma el empeoramiento de la fragilidad ósea que aparece cuando la inmovilización también está asociada con la osteoporosis en el envejecimiento causado por el declive de las hormonas sexuales y otras alteraciones metabólicas. De hecho, la BV/TV (proporción entre volumen óseo y volumen total) en el ámbito de las trabéculas de las tibias en ratones suspendidos de edad avanzada se reduce un 70% con respecto a los controles; se ha observado que el tratamiento con irisina reduce tal pérdida un 20%; de hecho, en los animales tratados se observó una reducción de la BV/TV de un 50%. Además, se ha observado que el número trabecular en el ratón suspendido de edad avanzada se reduce en 1/3 y que el tratamiento con irisina reduce tal pérdida en un 20%.

El quinto grupo de animales de ratonas C57BL6 de 6 semanas de edad ovariectomizadas (grupo 5: modelo murino con osteoporosis postmenopáusica), que representa un modelo murino de osteoporosis menopáusica, confirmó la efectividad de la irisina también en este tipo de osteoporosis.

En estas ratonas se observó una reducción en BV/TV del 28% con respecto a los controles. Se ha observado que el tratamiento con irisina en ratonas ovariectomizadas induce la recuperación completa de la pérdida de masa ósea.

Los experimentos llevados a cabo en los modelos murinos anteriormente descritos han confirmado la sorprendente efectividad de la irisina en el tratamiento de la osteoporosis; en particular, ha sido posible confirmar que la irisina puede ser usada de forma efectiva en el tratamiento de la osteoporosis, con independencia de que esta sea debida a uno o más factores, como, por ejemplo, la senilidad, la inmovilidad, la microgravedad o la menopausia.

La siguiente evidencia experimental se presenta como apoyo adicional de la presente invención.

Los resultados experimentales acompañan a las Figuras adjuntas.

– La Figura 1 muestra la reconstrucción tridimensional de exploraciones realizadas por microCT de tibias de ratones pertenecientes al Grupo 1 de animales, es decir, el modelo murino de ratones jóvenes y sanos. Las exploraciones fueron realizadas mediante Skyscan 1172, cámara 11 MPix. Los cambios estructurales fueron calculados usando el soporte lógico Skyscan CT Analyzer. Para las propiedades del hueso cortical (Panel “a”), se escanearon tibias de ratones a media diáfisis, a una distancia de 5,5 mm de los cóndilos tibiales proximales. Para las propiedades del hueso trabecular (Panel “b”), se escanearon tibias de ratones a una distancia de 1,9 mm de los

cóndilos tibiales proximales, en una posición distal con respecto a la placa epifisaria, en la dirección de la metáfisis. Se muestran las reconstrucciones de muestras derivadas de ratones tratados con placebo (iny. con placebo) y de los tratados con irisina (iny. con irisina).

5 – La Figura 2 muestra la reconstrucción tridimensional de exploraciones realizadas por microCT de tibias de ratones pertenecientes al Grupo 2 de animales, es decir, el modelo murino de ratón “suspendido” osteoporótico joven. Se realizaron escaneos según se ha descrito para la Figura 1. El Panel “a” muestra reconstrucciones de hueso cortical, mientras que el Panel “b” muestra reconstrucciones de hueso trabecular. Se muestran las reconstrucciones de muestras derivadas de ratones tratados con placebo (iny. con placebo) y de los tratados con irisina (iny. con irisina).

10 – La Figura 3 muestra la reconstrucción tridimensional de exploraciones realizadas por microCT de tibias de ratones pertenecientes al Grupo 3 de animales, es decir, el modelo murino de ratón osteoporótico de edad avanzada. Se realizaron escaneos según se ha descrito para la Figura 1. El Panel “a” muestra reconstrucciones de hueso cortical, mientras que el Panel “b” muestra reconstrucciones de hueso trabecular. Se muestran las reconstrucciones de muestras derivadas de ratones tratados con placebo (iny. con placebo) y de los tratados con irisina (iny. con irisina).

15 – La Figura 4 muestra la reconstrucción tridimensional de exploraciones realizadas por microCT de tibias de ratones pertenecientes al Grupo 4 de animales, es decir, el modelo murino de ratón “suspendido” osteoporótico de edad avanzada. Se realizaron escaneos según se ha descrito para la Figura 1. El Panel “a” muestra reconstrucciones de hueso cortical, mientras que el Panel “b” muestra reconstrucciones de hueso trabecular. Se muestran las reconstrucciones de muestras derivadas de ratones tratados con placebo (iny. con placebo) y de los tratados con irisina (iny. con irisina).

20 – La Figura 5 muestra secciones (de 10 mm de grosor) de las vértebras lumbares L3 y L4 de ratonas pertenecientes al Grupo 5 de animales, es decir, el modelo murino con osteoporosis postmenopáusica: ratonas ovariectomizadas jóvenes. Tales secciones fueron embebidas en metilmetacrilato y marcadas por tinción de Von Kossa/Van Gieson. Las ratonas (n=3 por grupo) fueron sometidas a ovariectomía bilateral (Ovx) o a cirugía sin extirpación de los ovarios (Simulación), inyectadas con placebo (iny. con placebo) o Irisina a razón de 100 µg/kg (iny. con irisina).

25 – En la Figura 6, los Paneles “a”, “b”, “c” y “d” muestran los resultados de experimentos llevados a cabo para evaluar el efecto biológico y los mecanismos celulares de la irisina sobre los osteoblastos murinos *in vitro*.

35 Sección experimental

La acción anabolizante de la irisina sobre el esqueleto fue confirmada y demostrada, mediante análisis por micrografía computarizada (micro CT) y el estudio de los parámetros diferenciadores de las células formadoras de hueso, después de administrar de forma intraperitoneal 100 µg/kg de irisina recombinante en ratones C57BL6. Esto permitió demostrar que la acción de la irisina sobre el hueso es arbitrada por un efecto directo de la molécula sobre los osteoblastos, que son las células que forman la nueva matriz ósea. La elección de la dosis administrada se hizo para que, en las 24 horas siguientes a la administración, la irisina alcance niveles séricos de circulación similares a aquellos que alcanza la molécula en los animales sometidos a ejercicio físico.

La actividad experimental que permitió que se demostrara el efecto de la irisina sobre el huso se llevó a cabo en diferentes grupos de animales: *grupo 1*, animales sanos para el estudio del efecto basal de la irisina; *grupos 2, 3, 4 y 5*, animales osteoporóticos para el estudio de la irisina sobre el cuidado y la prevención de la enfermedad.

Grupo 1, modelo murino sano: ratón joven y sano. Se inyectaron de forma intraperitoneal a ratones C57BL6 sanos de 8 semanas de edad 100 µg/kg/semana de irisina recombinante durante 4 semanas. Al final del tratamiento, las tibias de los ratones tratados con irisina (iny. con irisina) mostraron, por análisis de microCT, un aumento de la densidad mineral ósea cortical (DMO) de aproximadamente un 10% en comparación con las de ratones mantenidos en las mismas condiciones e inyectados con placebo (iny. con placebo). Además, también se ha demostrado que la administración de irisina modifica la geometría del hueso cortical; esto ha sido posible mediante el análisis de dos parámetros que son el índice de resistencia de los huesos largos a la flexión y la torsión, respectivamente. En particular, tales parámetros son la circunferencia perióstica (según la terminología común, “perímetro del hueso”), que aumenta un 7,25% con respecto al placebo, y el momento polar de inercia (MPI), que aumenta un 19,2% con respecto al placebo. Por el contrario, no se ha encontrado ninguna variación relativa a los parámetros del hueso trabecular. Los resultados se describen en detalle en la Tabla 1a (hueso cortical) y en la Tabla 1b (hueso trabecular) y se representan en la Figura 1, Paneles “a” y “b”.

En las tablas expuestas en la presente sección experimental, se documentan los valores de diferentes parámetros; para identificar tales parámetros se han usado los siguientes acrónimos y/o definiciones: DMO (densidad mineral ósea), superficie ósea, circunferencia perióstica (perímetro del hueso), MPI (momento polar de inercia) BV/TV, Volumen óseo/Volumen total (proporción entre volumen óseo y volumen total); número trabecular (Tb.N.); grosor

trabecular (Tb.Th.); separación trabecular (Tb.Sep.). Todos los valores están expresados como media \pm error estándar de la media (EEM). En las Tablas 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a y 4b documentadas en la presente sección experimental, el asterisco y el subrayado son usados para destacar los resultados en los que el valor P (según la terminología común) es menor de 0,05; es decir, los datos definidos como estadísticamente "significativos".

5

Tabla 1a: Ratón joven y sano - Hueso cortical de la tibia

<i>Ratón joven sano</i>	iny. con placebo	iny. con irisina	valor P
DMO (gr HA/cm ³)	1,009 \pm 0,02	<u>1,081 \pm 0,01*</u>	0,01
Superficie ósea (mm ²)	14,131 \pm 0,26	<u>15,195 \pm 0,25*</u>	0,02
Circunferencia perióstica (mm)	12,014 \pm 0,23	<u>12,884 \pm 0,24*</u>	0,03
MPI (mm ⁴)	0,418 \pm 0,02	<u>0,499 \pm 0,01*</u>	0,007

Tabla 1b: Ratón joven y sano - Hueso trabecular de la tibia

<i>Ratón joven sano</i>	iny. con placebo	iny. con irisina	valor P
DMO (gr HA/cm ³)	0,124 \pm 0,01	0,133 \pm 0,01	0,37
BV/TV (%)	5,113 \pm 0,23	4,432 \pm 0,26	0,07
Grosor trabecular (μ m)	31,713 \pm 0,80	32,210 \pm 1,60	0,77
Número trabecular (1/ μ m)	0,0016 \pm 0,0001	0,0014 \pm 0,0001	0,08
Separación trabecular (μ m)	218,96 \pm 7,11	235,54 \pm 11,4	0,23

10

Grupo 2, modelo murino osteoporótico: ratón joven "suspendido". Se sometió a ratones C57BL6 de 8 semanas de edad a ausencia de carga mecánica, mediante suspensión de las extremidades traseras, y a tratamiento por inyección intraperitoneal con 100 μ g/kg/semana de irisina recombinante durante 4 semanas. Al final del tratamiento, las tibias de los ratones no tratados (tratados con placebo, iny. con placebo) mostraron, por análisis de microCT, una reducción de un 5% en la densidad mineral ósea cortical (DMO) con respecto a la de los ratones mantenidos en condiciones de ambulación normal y usados como control. Los datos relativos a los controles —es decir, a ratones mantenidos en condiciones de ambulación normal— son los datos previamente descritos relativos al Grupo 1.

15

Por el contrario, los ratones suspendidos tratados con irisina (iny. con irisina) no mostraron pérdida de DMO con respecto a los ratones de control, demostrando así que la pérdida del 5% en DMO de ratones suspendidos tratados con placebo se recuperó por completo por la administración de irisina.

20

A partir del análisis del componente trabecular de las tibias, en el ratón suspendido surgió una reducción en la DMO del 39% con respecto a la del que podía ambular normalmente, y una reducción en la DMO del 23% en ratones suspendidos y tratados con irisina. Por lo tanto, se ha observado que el tratamiento con irisina llevó a una dirección de la pérdida de DMO del 16% con respecto a los ratones suspendidos tratados con placebo. Además, en los ratones suspendidos se ha observado una reducción de la proporción entre volumen óseo y volumen total (BV/TV) del 47%, mientras que en los suspendidos y, a la vez, tratados con irisina tal reducción fue del 42%; así, tal pérdida se aminoró un 5%. Esta reducción de la pérdida puede estar asociada con un aumento del número trabecular. De hecho, en los ratones suspendidos se ha observado una reducción del número trabecular del 65%, mientras que en los suspendidos y, a la vez, tratados con irisina, tal reducción fue del 52%. Por lo tanto, se ha observado que el tratamiento con irisina causó una reducción de la pérdida del número trabecular del 13%.

25

Los resultados se describen con detalle en la Tabla 2a (hueso cortical) y en la Tabla 2b (hueso trabecular) y se representan en la Figura 2, Paneles "a" y "b".

Tabla 2a: Ratón joven suspendido - Hueso cortical de la tibia

<i>Ratón joven suspendido</i>	iny. con placebo	iny. con irisina	valor P
DMO (gr HA/cm ³)	0,963 \pm 0,01	<u>1,02 \pm 0,001*</u>	0,03
Superficie ósea (mm ²)	13,072 \pm 0,07	<u>13,902 \pm 0,17*</u>	0,04
Circunferencia perióstica (mm)	11,296 \pm 0,01	<u>11,941 \pm 0,10*</u>	0,02
MPI (mm ⁴)	0,318 \pm 0,01	<u>0,387 \pm 0,03*</u>	0,05

30

Tabla 2b: Ratón joven suspendido - Hueso trabecular de la tibia

<i>Ratón joven suspendido</i>	iny. con placebo	iny. con irisina	valor P
DMO (gr HA/cm ³)	0,076 \pm 0,007	<u>0,096 \pm 0,01*</u>	0,02
BV/TV (%)	2,723 \pm 0,84	<u>3,009 \pm 0,41*</u>	0,01
Grosor trabecular (μ m)	46,32 \pm 5,73	37,93 \pm 1,89	0,2
Número trabecular (1/ μ m)	0,00057 \pm 0,0001	<u>0,00079 \pm 0,0001*</u>	0,03
Separación trabecular (μ m)	337,42 \pm 7,02	<u>284,83 \pm 1,39*</u>	0,05

Grupo 3, modelo murino osteoporótico: ratón de edad avanzada. Se trató a ratones C57BL6 de edad avanzada de 15 meses de edad mediante inyección intraperitoneal con 100 µg/kg/semana de irisina recombinante durante 4 semanas. Considerando el presente modelo murino, debería hacerse notar que los ratones de esta edad presentan una severa fragilidad ósea causada por una reducción de masa ósea en el ámbito tanto cortical como trabecular. Al final del tratamiento, las tibias de ratones tratados con irisina (iny. con irisina) mostraron un aumento de la DMO cortical de aproximadamente un 8% y un aumento de la DMO trabecular del 24% con respecto a los ratones de edad avanzada inyectados con placebo (iny. con placebo). Además, en ratones de edad avanzada, en los que la masa ósea trabecular (BV/TV) de la tibia es de promedio inferior en un 55% con respecto a la de un ratón joven de 3 meses de edad, el tratamiento con irisina causa una reducción de la pérdida de masa ósea del 12%. Esta recuperación de masa ósea depende del aumento del número trabecular. De hecho, en un ratón de edad avanzada que muestre normalmente, de promedio, un número trabecular igual a 1/3 del de un ratón joven sano, el tratamiento con irisina causó una reducción de la pérdida del número trabecular del 7% con respecto al ratón de edad avanzada inyectado con placebo. Por lo tanto, se ha observado que, en este modelo murino de envejecimiento caracterizado por la fragilidad ósea, el tratamiento con irisina reduce la rarefacción de las trabéculas, haciendo todo el segmento óseo menos frágil y reduciendo así el riesgo de fractura. Los resultados se describen con detalle en la Tabla 3a (hueso cortical) y en la Tabla 3b (hueso trabecular) y se representan en la Figura 3, Paneles “a” y “b”.

Tabla 3a: Ratones osteoporóticos de edad avanzada - Hueso cortical de la tibia

<i>Ratón de edad avanzada</i>	iny. con placebo	iny. con irisina	valor P
DMO (gr HA/cm ³)	1,012 ± 0,01	1,02 ± 0,02*	0,003
Superficie ósea (mm ²)	14,08 ± 0,5	12,7 ± 0,26	0,16
Circunferencia perióstica (mm)	12,37 ± 0,32	11,023 ± 0,42	0,07
MPI (mm ⁴)	0,369 ± 0,03	0,262 ± 0,05	0,11

Tabla 3b: Ratones osteoporóticos de edad avanzada - Hueso trabecular de la tibia

<i>Ratón de edad avanzada</i>	iny. con placebo	iny. con irisina	valor P
DMO (gr HA/cm ³)	0,073 ± 0,009	0,09 ± 0,01*	0,03
BV/TV (%)	1,96 ± 0,54	2,21 ± 0,17*	0,05
Grosor trabecular (µm)	34,95 ± 0,98	32,86 ± 0,79	0,27
Número trabecular (1/µm)	0,00053 ± 0,0001	0,00065 ± 0,00004*	0,04
Separación trabecular (µm)	404,69 ± 31,53	376,88 ± 12,86*	0,05

Grupo 4, modelo murino osteoporótico: ratón de edad avanzada “suspendido”. Se sometió a ratones C57BL6 de edad avanzada de 15 semanas a la ausencia de carga mecánica mediante suspensión de las extremidades traseras, y a estimulación intraperitoneal con 100 µg/kg/semana de irisina recombinante durante 4 semanas. El modelo murino del ratón suspendido de edad avanzada simula la condición patológica de la osteoporosis peculiar del envejecimiento, agravado por una condición de inmovilidad, y está caracterizado por una pérdida drástica de masa ósea. Al final del tratamiento, las tibias de ratones suspendidos presentaron una pérdida de DMO cortical del 10% con respecto a la de los ratones de edad avanzada mantenidos en la condición de control (ambulación normal). Los datos relativos a los controles —es decir, a ratones de edad avanzada mantenidos en condiciones de ambulación normal— son los datos previamente descritos relativos al Grupo 3. Se ha observado que el tratamiento con irisina reduce tal pérdida y, de hecho, en los animales tratados con irisina (iny. con irisina), la reducción de la DMO cortical fue de únicamente el 5% con respecto a los ratones suspendidos de edad avanzada inyectados con placebo (iny. con placebo). En cuanto a la DMO del hueso trabecular, que en los ratones suspendidos de edad avanzada se reduce en aproximadamente un 45% con respecto a la de los ratones de edad avanzada mantenidos en la condición de control (ambulación normal), el tratamiento con irisina redujo tal pérdida en un 15%; de hecho, en tales animales se observó una reducción de la DMO trabecular de únicamente un 30%. La drástica reducción de masa ósea observada en el ratón suspendido de edad avanzada es también confirmada por las alteraciones de los otros parámetros del hueso trabecular. Tales variaciones confirman el empeoramiento de la fragilidad ósea que aparece cuando la inmovilización también está asociada con la osteoporosis en el envejecimiento causado por el declive de las hormonas sexuales. De hecho, la BV/TV en el ámbito de las trabéculas de las tibias en ratones suspendidos de edad avanzada se reduce en un 70% con respecto a los controles, pero el tratamiento con irisina reduce tal pérdida en un 20%; de hecho, en tales animales (iny. con irisina), se ha observado una reducción de BV/TV del 50% con respecto a los controles. Además, el número trabecular, en el ratón suspendido de edad avanzada, se reduce en 1/3 con respecto al de los ratones de control y el tratamiento con irisina reduce tal pérdida en un 20%. Los resultados se describen con detalle en la Tabla 4a (hueso cortical) y en la Tabla 4b (hueso trabecular) y se representan en la Figura 4, Paneles “a” y “b”.

Tabla 4a: Ratones osteoporóticos “suspendidos” de edad avanzada - Hueso cortical de la tibia

<i>Ratón suspendido de edad avanzada</i>	iny. con placebo	iny. con irisina	valor P
DMO (gr HA/cm ³)	0,905 ± 0,01	0,959 ± 0,02*	0,02
Superficie ósea (mm ²)	13,36 ± 0,57	12,84 ± 0,21	0,4
Circunferencia perióstica (mm)	9,49 ± 0,12	8,09 ± 0,27	0,07

<i>Ratón suspendido de edad avanzada</i>	iny. con placebo	iny. con irisisina	valor P
MPI (mm ⁴)	0,353 ± 0,04	0,334 ± 0,02	0,71

Tabla 4b: Ratonos osteoporóticos “suspendidos” de edad avanzada - Hueso trabecular de la tibia

<i>Ratón suspendido de edad avanzada</i>	iny. con placebo	iny. con irisisina	valor P
DMO (gr HA/cm ³)	0,039 ± 0,01	0,052 ± 0,004*	0,05
BV/TV (%)	0,56 ± 0,33	0,95 ± 0,08*	0,05
Grosor trabecular (µm)	32,47 ± 6,78	29,9 ± 2,80	0,7
Número trabecular (1/µm)	0,0002 ± 0,0001	0,00032 ± 0,0001*	0,04
Separación trabecular (µm)	376,88 ± 8,14	317,38 ± 20,69*	0,05

Grupo 5, modelo murino con osteoporosis postmenopáusica: ratonas ovariectomizadas jóvenes. Las ratonas ovariectomizadas jóvenes son el modelo murino con osteoporosis postmenopáusica comúnmente aceptado y usado por la comunidad científica. Se dividió a ratonas C57BL6 vírgenes de 6 semanas de edad en 2 grupos: ratonas sometidas a ovariectomía bilateral (Ovx) y ratonas sometidas a cirugía sin extirpación de los ovarios (Simulación), que representaban los controles. Las ratonas de cada grupo fueron tratadas con irisisina (100 µg/kg) o placebo durante 4 semanas a partir del día que siguió a la cirugía. Un análisis histomorfométrico de las vértebras lumbares L3 y L4, efectuado en secciones de muestra embebidas en metilmetacrilato marcado por tinción de Von Kossa/Van Gieson, mostró que, en las ratonas ovariectomizadas, como cabía esperar, se desarrolló una reducción de masa ósea, según se demostró por el análisis de los parámetros histomorfométricos documentados en la Tabla 5a. En particular, en tales ratonas (Ovx iny. con placebo) se encontró una reducción significativa de proporción entre volumen óseo mineralizado y volumen total (BV/TV) del 28% con respecto a las ratonas de control (Simulación iny. con placebo, es decir, ratonas de Simulación inyectadas con placebo). En las ratonas ovariectomizadas y tratadas con irisisina (Ovx iny. con irisisina) tal pérdida de masa ósea se recuperó por completo. El efecto se debió a un aumento del grosor trabecular (Tb.Th.). De hecho, según se destaca por los datos documentados en la tabla, en las ratonas ovariectomizadas tratadas con placebo (Ovx iny. con placebo), la reducción del grosor trabecular fue igual al 35% con respecto a los controles (Simulación iny. con placebo). Tal reducción fue anulada en las ratonas ovariectomizadas tratadas con irisisina (Ovx iny. con irisisina). Por el contrario, el número trabecular (Tb.N.) y la separación trabecular (Tb.Sep.) quedaron inalterados. Los resultados se describen con detalle en la Tabla 5a y se representan en la Figura 5.

Tabla 5a: Ratonas ovariectomizadas jóvenes - Hueso trabecular de las vértebras lumbares

<i>Ovariectomizadas jóvenes</i>	Simulación iny. con placebo	Simulación iny. con irisisina	Ovx iny. con placebo	Ovx iny. con irisisina
BV/TV (%)	17,899 ± 0,836	17,499 ± 2,588	12,913 ± 2,568 *.a	17,186 ± 0,399 *.b
Número trabecular (1/mm)	24,386 ± 0,381	25,772 ± 0,775	25,022 ± 0,016	23,983 ± 1,125
Grosor trabecular (mm)	0,734 ± 0,038	0,680 ± 0,089	0,477 ± 0,058 *.a	0,718 ± 0,044*.b
Separación trabecular (mm)	3,376 ± 0,058	3,211 ± 0,187	3,529 ± 0,096	3,468 ± 0,519

En la Tabla 5a se documentan los resultados obtenidos en el análisis histomorfométrico de las vértebras lumbares en el modelo murino con osteoporosis postmenopáusica: ratonas ovariectomizadas jóvenes, vértebras lumbares L3 y L4 de ratonas (n=3 por grupo) sometidas a ovariectomía bilateral (Ovx) o cirugía sin extirpación de los ovarios (Simulación) e inyectadas con placebo (iny. con placebo) o 100 µg/kg de irisisina (iny. con irisisina); BD/TV, Volumen óseo/Volumen total (proporción entre volumen óseo y volumen total); número trabecular (Tb.N.); grosor trabecular (Tb.Th.); separación trabecular (Tb.Sep.). Todos los valores están expresados como media ± EEM.

En la Tabla 5a se comparan 4 grupos de ratonas; concretamente, “Simulación iny. con placebo”, “Simulación iny. con irisisina”, “Ovx iny. con placebo” y “Ovx iny. con irisisina”. El asterisco denota que el valor es estadísticamente “significativo” (es decir, que p<0,05). “a” es para especificar que el valor es significativo en relación con la Simulación iny. con placebo. “b” es para especificar que el valor es significativo en relación con Ovx iny. con placebo.

Por ejemplo, en el caso de BV/TV, el valor es significativo (reducción) en Ovx iny. con placebo cuando se compara con Simulación iny. con placebo. En cambio, la BV/TV de Ovx iny. con irisisina es significativamente mayor que la de Ovx iny. con placebo. No hay ninguna diferencia significativa entre Ovx iny. con irisisina y Simulación iny. con placebo, demostración del hecho de que la irisisina, en una ratona privada de ovarios, devolvía la masa ósea (BV/TV) a una situación normal (igual al control: Simulación iny. con placebo).

Efecto biológico y mecanismos celulares de la irisisina en osteoblastos murinos *in vitro*

Para entender los mecanismos celulares de los datos obtenidos *in vivo*, que han confirmado la efectividad de la irisisina en el tratamiento de la osteoporosis en diferentes modelos murinos, la acción de esta molécula ha sido caracterizada adicionalmente por experimentos *in vitro*. Los resultados obtenidos confirmaron que la irisisina ejerce un efecto anabolizante en la masa ósea. En particular, se ha formulado la hipótesis de que tal efecto es debido a la acción directa sobre los precursores de los osteoblastos. De hecho, la irisisina estimula su diferenciación en células

5 maduras, según se destaca por un mayor número de colonias positivas a la fosfatasa alcalina (ALP), es decir, al marcador de osteoblastos (Figura 6, Panel "a"). La fosforilación de la ERK MAP quinasa en los osteoblastos, que se produce después de 5 minutos de estimulación en cultivo con irisina recombinante (Figura 6, Panel "b"), destaca la acción directa de esta molécula en las células formadoras de hueso. Además, en los osteoblastos estimulados con irisina durante 3 y 8 horas, se produce un aumento de la expresión del factor de transcripción ATF4 (Figura 6, Panel "c"). Siendo este uno de los factores de transcripción de la proteína ósea más abundante, el colágeno de tipo I (COLL I), induce un aumento de la síntesis de esta proteína, así como la síntesis de ALP, demostrada después de 48 horas de tratamiento con irisina (Figura 6, Panel "d").

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Università degli Studi di Bari Università Politecnica delle Marche
 <120> IRISINA PARA EL CUIDADO Y LA PREVENCIÓN DE LA OSTEOPOROSIS
 <130> 16457D53
 <150> MI2015A000558
 <151> 2015-04-16
 15 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 112
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Irisina recombinante
 <400> 1
 Asp Ser Pro Ser Ala Pro Val Asn Val Thr Val Arg His Leu Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn Ser Ala Val Val Ser Trp Asp Val Leu Glu Asp Glu Val Val Ile
 20 25 30
 Gly Phe Ala Ile Ser Gln Gln Lys Lys Asp Val Arg Met Leu Arg Phe
 35 40 45
 Ile Gln Glu Val Asn Thr Thr Thr Arg Ser Cys Ala Leu Trp Asp Leu
 50 55 60
 Glu Glu Asp Thr Glu Tyr Ile Val His Val Gln Ala Ile Ser Ile Gln
 65 70 75 80
 Gly Gln Ser Pro Ala Ser Glu Pro Val Leu Phe Lys Thr Pro Arg Glu
 85 90 95
 Ala Glu Lys Met Ala Ser Lys Asn Lys Asp Glu Val Thr Met Lys Glu
 100 105 110

REIVINDICACIONES

1. Irisina para ser usada en el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis.
2. Irisina para ser usada según la reivindicación 1 caracterizada porque dicha irisina es irisina recombinante.
3. Irisina para ser usada según la reivindicación 2 caracterizada porque dicha irisina recombinante comprende la secuencia de aminoácidos:

5

**DSPSAPVNVTVRHLKANSVVSWDVLEDEVVIGFAISQQKKDVRML
RFIQEVNTTTRSCALWDLEEDTEYIVHVQAISIQQSPASEPVLFKTPR
EAEKMASKNKDEVTMKE (SEQ. ID NO. 1).**

4. Irisina para ser usada según la reivindicación 1 caracterizada porque la dosificación de dicha irisina se encuentra entre 500 µg/kg y 50 µg/kg.
5. Irisina para ser usada según la reivindicación 4 caracterizada porque dicha dosificación se encuentra entre 250 µg/kg y 75 µg/kg.
6. Irisina para ser usada según la reivindicación 5 caracterizada porque dicha dosificación es de 100 µg/kg.
7. Composiciones que comprenden irisina para ser usadas en el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis.
8. Composiciones para ser usadas según la reivindicación 7 caracterizadas porque dicha irisina es irisina recombinante.
9. Composiciones para ser usadas según la reivindicación 8 caracterizadas porque dicha irisina recombinante comprende la secuencia de aminoácidos:

10

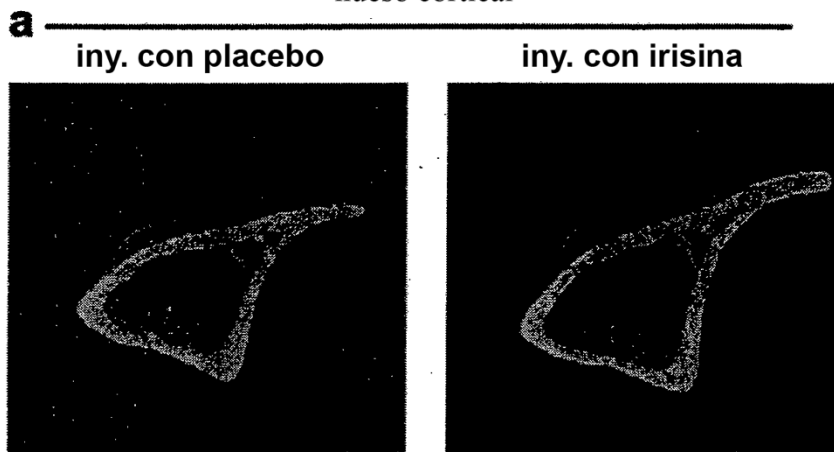
15

**DSPSAPVNVTVRHLKANSVVSWDVLEDEVVIGFAISQQKKDVRML
RFIQEVNTTTRSCALWDLEEDTEYIVHVQAISIQQSPASEPVLFKTPR
EAEKMASKNKDEVTMKE (SEQ. ID NO. 1).**

10. Composiciones para ser usadas según la reivindicación 7 caracterizadas porque dicha irisina comprende excipientes y/o aditivos para un uso farmacéutico.

Modelo murino sano: ratón joven

hueso cortical



hueso trabecular

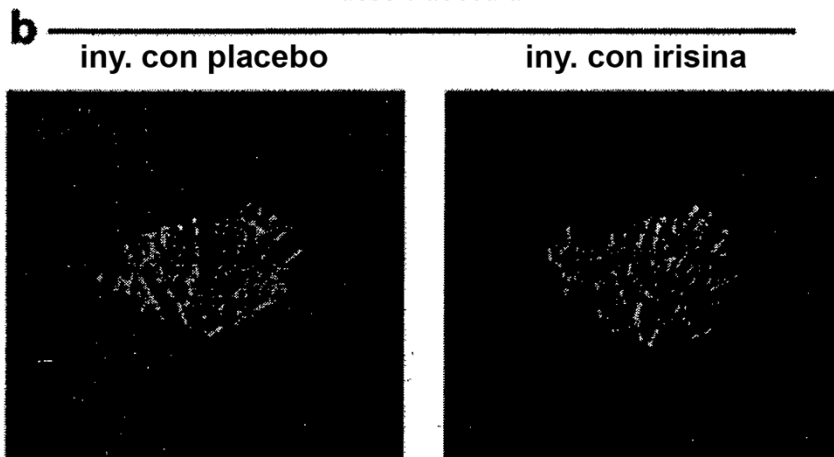


Figura 1

Modelo murino osteoporótico: ratón joven suspendido

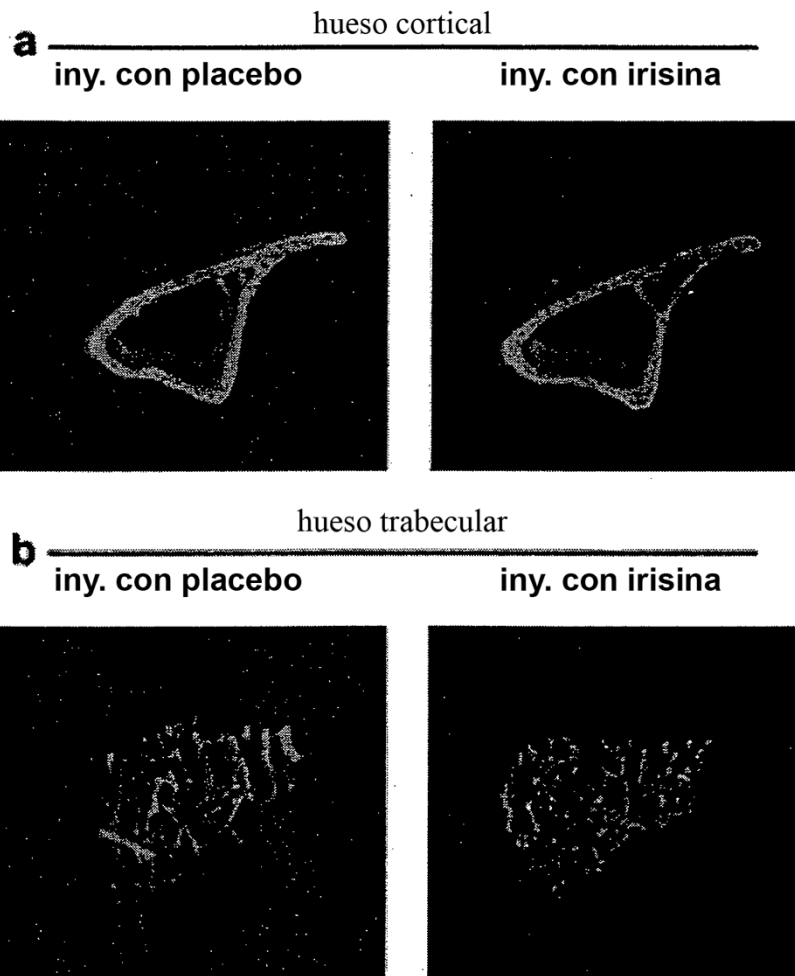
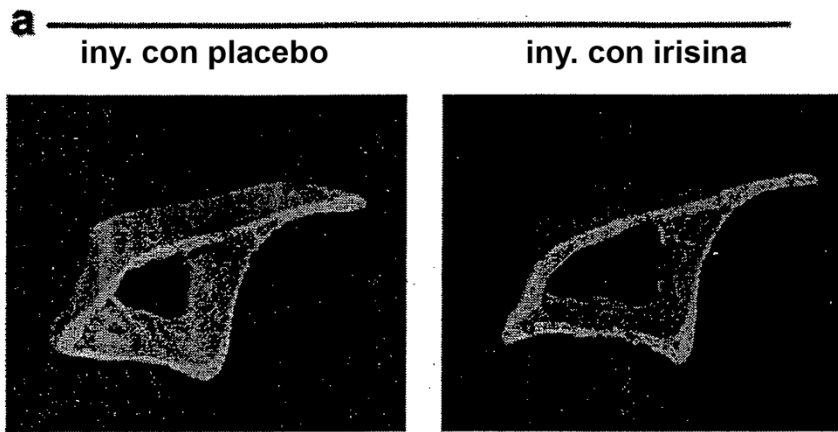


Figura 2

Modelo murino osteoporótico: ratón de edad avanzada
hueso cortical



hueso trabecular

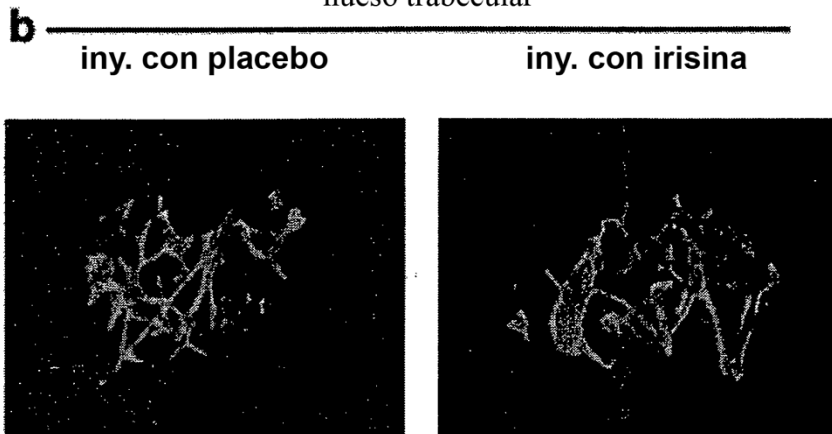


Figura 3

Modelo murino osteoporótico: ratón de edad avanzada suspendido

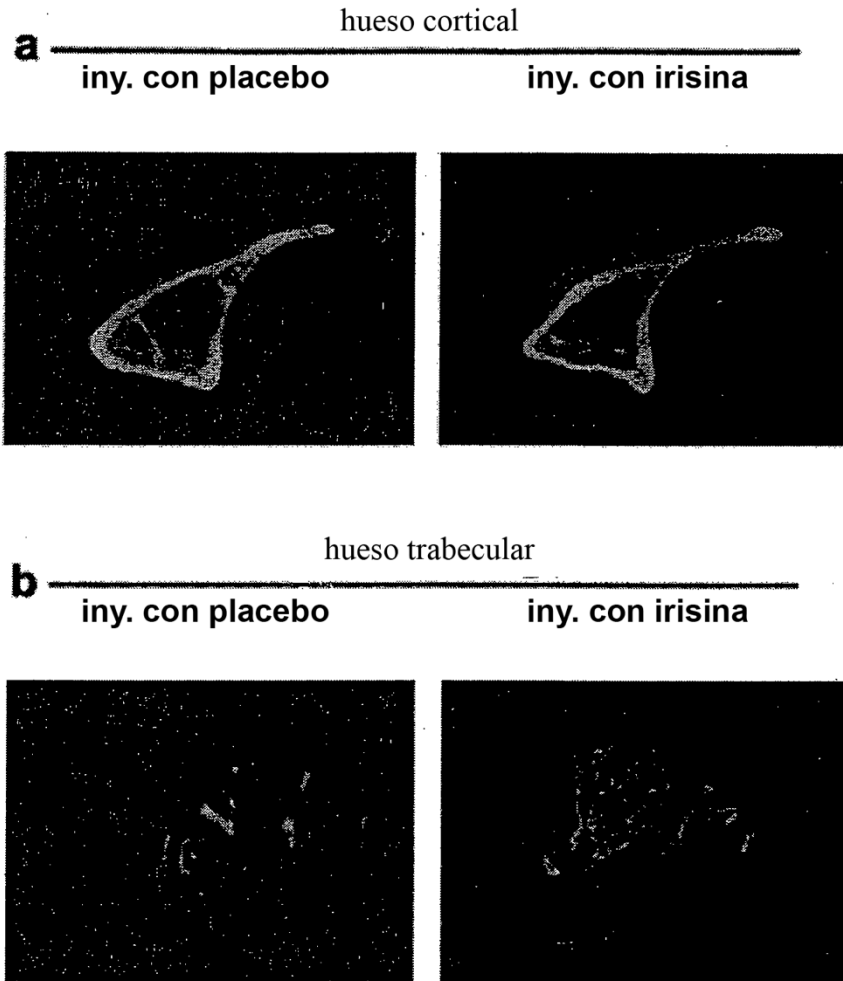


Figura 4

Modelo murino con osteoporosis posmenopáusica:
ratona joven ovariectomizada

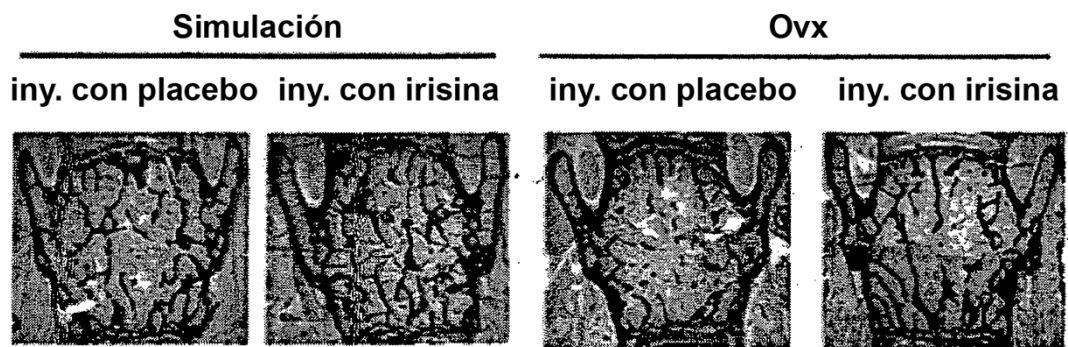


Figura 5

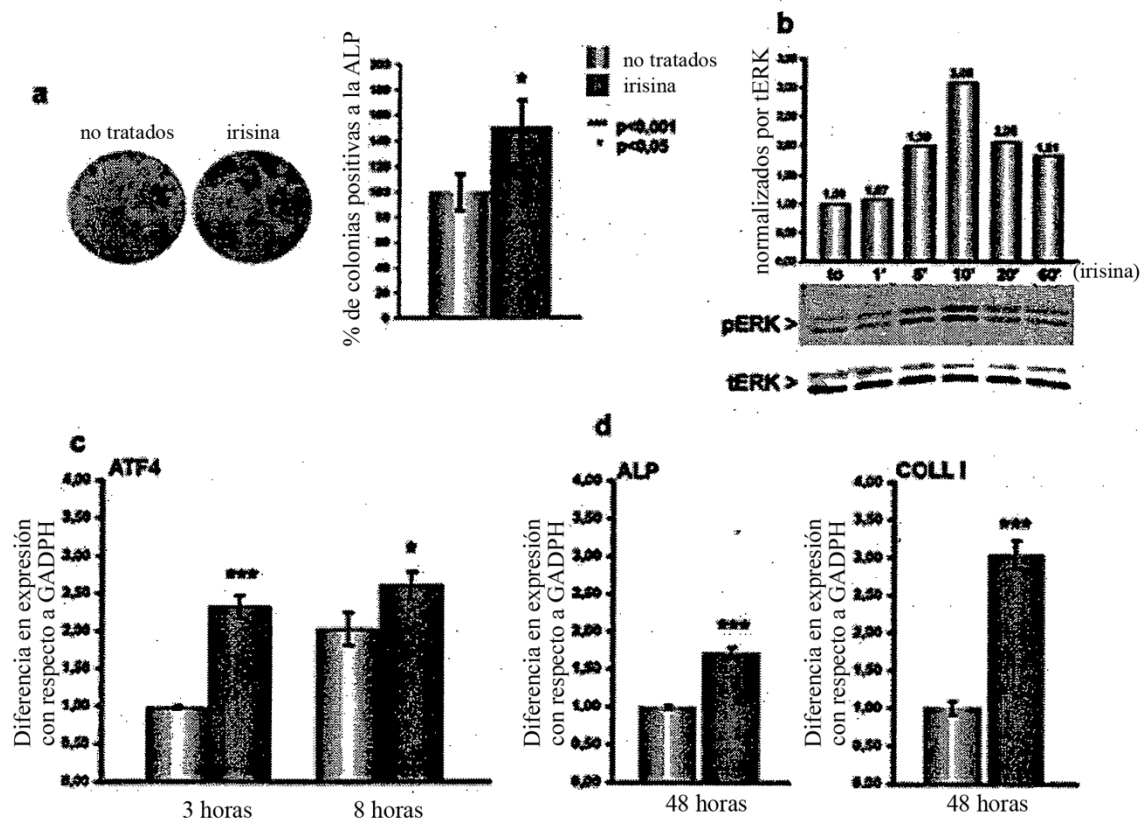


Figura 6