



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 734**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/64** (2006.01)

**C12Q 1/37** (2006.01)

**A01N 37/18** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 7/00** (2006.01)

**C07K 14/475** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03749716 .1**

96 Fecha de presentación : **16.09.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1578928**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.09.2005**

54

Título: **Activación de miostatina por metaloproteasa, y métodos para modular la actividad de miostatina.**

30

Prioridad: **16.09.2002 US 411133 P**  
**09.01.2003 US 439164 P**  
**10.07.2003 US 486863 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.09.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.09.2010**

73

Titular/es: **Johns Hopkins University**  
**100 N. Charles Street, 5th Floor**  
**Baltimore, Maryland 21201, US**  
**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION y**  
**Wyeth L.L.C.**

72

Inventor/es: **Lee, Se-Jin;**  
**McPherron, Alexandra, C.;**  
**Greenspan, Daniel, S.;**  
**Pappano, William, N.;**  
**Wolfman, Neil y**  
**Tomkinson, Kathy**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 344 734 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

Activación de miostatina por metaloproteasa, y métodos para modular la actividad de miostatina.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La invención se refiere en general a la regulación con metaloproteinasas de la actividad de la miostatina, y más específicamente, a métodos para emplear agonistas o antagonistas de la familia de metaloproteinasas BMP-1/TLD para modular la actividad de la miostatina, que incluyen, por ejemplo, regular el desarrollo muscular en un organismo, métodos para identificar agonistas y antagonistas de tales metaloproteinasas y los agonistas y los antagonistas identificados de este modo.

15 **Antecedentes**

La miostatina es un miembro de la familia de factores de crecimiento de transformación  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que es esencial para una regulación adecuada del crecimiento del músculo esquelético. La miostatina es una proteína secretada que se expresa de manera específica en las células de la estirpe del músculo esquelético, durante el desarrollo embrionario y en animales adultos; en células adiposas de animales adultos también hay niveles bajos de ARNm de miostatina. Durante la embriogénesis temprana, el ARNm de la miostatina se puede detectar en el miotomo de las somitas en desarrollo. En las etapas embrionarias tardías y en la vida postnatal, la miostatina se expresa generalmente en todos los músculos esqueléticos que se han examinado.

25 La función de la miostatina fue determinada mediante estudios en ratones de direccionamiento génico hacia una diana. Los ratones que carecen de miostatina mostraron un incremento extendido y espectacular de la masa muscular esquelética, debido a una hiperplasia e hipertrofia de las fibras musculares, indicando que la miostatina es un regulador negativo del crecimiento muscular. El gen de la miostatina está muy conservado a lo largo de la evolución, siendo la secuencia que se predecía para la proteína de miostatina madura, idéntica entre ratones, ratas, seres humanos, pollos, pavos y cerdos, y muy homóloga incluso en relación con organismos acuáticos. La función de la miostatina también está conservada, correlacionándose las mutaciones en el gen de la miostatina con el fenotipo de doble musculatura en el ganado.

35 El papel de la miostatina en la regulación del crecimiento y del desarrollo muscular indica que los métodos y las composiciones que regulan la actividad de la miostatina pueden tener una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, el tratamiento de enfermedades humanas y la mejora de la producción ganadera. En relación con las aplicaciones terapéuticas humanas, los inhibidores de la expresión o de la función de la miostatina pueden aportar un beneficio clínico en el tratamiento de trastornos de desgaste muscular, tales como distrofia muscular, caquexia y sarcopenia. Además, los animales que carecen de miostatina, tienen una reducción significativa de la acumulación de grasa, y la pérdida de miostatina protege contra el desarrollo de obesidad y de diabetes de tipo 2 en modelos genéticos en ratones. Así, la modulación de la actividad de la miostatina también puede ser útil en el tratamiento de trastornos metabólicos, tales como la obesidad y la diabetes de tipo 2. Además, a este respecto, los inhibidores de la expresión o de la función de miostatina no sólo pueden ser útiles para incrementar la eficacia de la producción ganadera, sino que también pueden tener como resultado la producción de carne con menos contenido en grasa.

45 Se han descrito diversas estrategias para manipular las actividades biológicas de la miostatina. La miostatina se sintetiza como una proteína precursora que experimenta un procesamiento proteolítico para generar un fragmento N-terminal, denominado el fragmento "propéptido" y un fragmento C-terminal, un dímero enlazado con disulfuro, que es la especie biológicamente activa. Las estrategias descritas en la actualidad para inhibir la actividad de la miostatina, han utilizado moléculas que se pueden unir al dímero C-terminal de la miostatina e inhibir su actividad. Por ejemplo, la miostatina se une a dos receptores de activina de tipo II, Act RIIA y Act RIIB, *in vitro*, y la expresión de una forma negativa, dominante y truncada de Act RIIB en ratones transgénicos, dio como resultado que los ratones tenían incrementos en la masa muscular, comparables a los de ratones transgénicos desprovistos del gen de miostatina.

55 El propéptido de la miostatina también se ha utilizado para inhibir la actividad de la miostatina. Después del procesamiento proteolítico, el propéptido de la miostatina permanece asociado no covalentemente con el dímero C-terminal y mantiene el dímero en un estado latente e inactivo. Se ha observado que el propéptido bloquea la actividad del dímero C-terminal purificado de la miostatina en diversos ensayos *in vitro*, y la hiperexpresión del propéptido en ratones transgénicos daba como resultado un fenotipo característico de la mutación nula en miostatina. La folistatina es otra proteína que actúa como inhibidor de la miostatina. La folistatina puede unirse a una variedad de miembros de la familia de TGF- $\beta$ , que incluyen la miostatina, e inhibir su actividad, y ratones transgénicos que hiperexpresan la folistatina en el músculo, tienen un incremento extraordinario del crecimiento muscular, lo que concuerda con la inhibición de la actividad de la miostatina.

65 Los inhibidores de la miostatina descritos anteriormente, interaccionan específicamente cada uno con la miostatina madura para inhibir su actividad. Aunque la inhibición de la actividad de una proteína tal como la miostatina, empleando un agente que interacciona directamente con la proteína, proporciona una gran especificidad, dicho método puede requerir que todas o la mayoría de las proteínas estén unidas al agente para que se manifieste el efecto inhibidor. Una

vía alternativa para inhibir la actividad de una proteína, particularmente de una proteína que ella misma debe ser activada con una segunda proteína, tal como una enzima, para que la primera proteína sea funcional, es poner como diana la segunda proteína. Dicho método puede ser ventajoso porque las proteínas activadoras, tales como enzimas, están presentes generalmente en niveles muy inferiores a los de sus sustratos. De este modo, hay una mayor probabilidad de que toda o una gran parte de la proteína activadora, tal como una enzima, pueda ser inhibida.

En relación con la miostatina, se conocen al menos dos proteasas implicadas en el procesamiento de la promiostatina, el producto primario del gen, en un péptido señal, un propéptido y un fragmento C-terminal, el último de los cuales forma homodímeros que tienen la actividad biológica de la miostatina. Desafortunadamente, estas proteasas también pueden actuar sobre una variedad de proteínas diferentes y, por tanto, sobre agentes que se dirigen hacia esas proteasas y las inhiben, por ejemplo, la peptidasa señal, y tendrían probablemente diversos efectos nocivos si se administran a un organismo vivo. Por tanto, existe una necesidad de identificar moléculas biológicas que estén implicadas más específicamente en la regulación de la activación y la actividad de la miostatina. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona unas ventajas adicionales.

En la técnica anterior, Huet y col., Am. J. Physiol. Cell Physiol., 281:C1624-C-1634, 2001, describen que células tratadas con inhibidores de metaloproteinasas basados en hidroxamato, han reducido la cantidad de miostatina madura y sugieren que las metaloproteinasas están implicadas en la regulación y la diferenciación del crecimiento del músculo esquelético. El documento WO-A-02/09641 describe porciones de péptido sustancialmente purificadas de un polipéptido de promiostatina.

IBC, artículo en prensa, manuscrito M206379200 (22-08-2002) describe el uso del propéptido de miostatina y de folistatina para unirse al dímero C-terminal de miostatina e inhibir de este modo su actividad.

## Sumario de la invención

La presente invención se basa en la identificación de proteasas que escinden el propéptido de miostatina, incluyendo cuando el propéptido de miostatina está presente en un complejo con un dímero C-terminal de miostatina. De este modo, las proteasas pueden convertir un complejo de miostatina inactivo y latente, que comprende un propéptido de miostatina asociado con un polipéptido de miostatina C-terminal, en miostatina activa que es un regulador negativo del crecimiento y del desarrollo muscular. Tales proteasas que se ilustran con metaloproteinasas de la familia de proteínas morfogenéticas óseas 1/toloides (BMP-1/TLD), proporcionan dianas para fármacos que pueden incrementar o disminuir la actividad proteasa y, de este modo, incrementar o disminuir la actividad de la miostatina.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para reducir la activación de la miostatina, que comprende la puesta en contacto de una muestra que comprende un complejo de miostatina latente que comprende un propéptido de miostatina y un fragmento C-terminal de la miostatina, y una metaloproteinasa que puede escindir el propéptido de miostatina, con un agente que reduce la escisión proteolítica del propéptido a través de la metaloproteinasa, disminuyendo de este modo la activación de la miostatina

en donde la metaloproteinasa es un miembro de la familia de proteínas morfogenéticas óseas 1/toloides (BMP-1/TLD) y el agente es un péptido seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NOs: 11, 14, 17, 20 y 23.

El método se puede realizar empleando, por ejemplo, células o un tejido en cultivo, un extracto celular, o reactivos sustancialmente purificados que incluyen metaloproteinasas sustancialmente purificadas y/o un complejo de miostatina latente. Por tanto, el método se puede realizar poniendo en contacto una muestra que comprende un complejo de miostatina latente y una metaloproteinasa (p. ej., una muestra de tejido y/o un fluido biológico) con un agente *in vitro*.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un agente que disminuye la escisión proteolítica con una metaloproteinasa, de un propéptido de miostatina en un complejo de miostatina que comprende el propéptido de miostatina y un fragmento C-terminal de la miostatina, para uso en la disminución de la activación de la miostatina en un individuo,

en donde la metaloproteinasa es un miembro de la familia de proteínas morfogenéticas óseas 1/toloides (BMP-1/TLD) y el agente es un péptido seleccionado entre el grupo consistente en las SEQ ID NOs: 11, 14, 17, 20 y 23.

El miembro de la familia BMP-1/TLD puede ser BMP-1, TLD, proteína 1 similar a toloide (TLL-1) o proteína 2 similar a toloide (TLL-2), particularmente miembros de la familia BMP-1/TLD de mamífero, tales como TLD de mamífero (m) (mTLD), mTLL-1 y mTLL-2.

El propéptido de miostatina libre, el complejo de miostatina latente y una metaloproteinasa que puede escindir un propéptido de miostatina, pueden estar presentes intra o extracelularmente. Sin embargo, el propéptido o el complejo de miostatina latente generalmente no está presente en las mismas células o en el mismo tipo celular que la metaloproteinasa y, por ello, la escisión del propéptido de miostatina con una metaloproteinasa tiene lugar generalmente de forma extracelular después de la puesta en contacto de la metaloproteinasa con el propéptido. De este modo, la puesta en contacto de un agente con el propéptido, el complejo y/o la metaloproteinasa dependerá en parte de cómo actúa el agente para modular la escisión. Por ejemplo, cuando se puede unir el agente y alterar la conformación de la metaloproteinasa, de modo que inhiba su actividad de escisión en relación con un propéptido de miostatina, las células que

## ES 2 344 734 T3

5 producen la metaloproteinasas se pueden poner en contacto con el agente, de modo que la metaloproteinasas secretada carezca de dicha actividad, o el agente se puede administrar en un medio en el cual se secreta la metaloproteinasas (p. ej., en la corriente sanguínea de un organismo vivo), de modo que, después de ponerse en contacto con el agente en el medio, se reduce o se inhibe la escisión del propéptido con la metaloproteinasas. En comparación, cuando el agente actúa, por ejemplo, para desestabilizar una interacción entre la metaloproteinasas y el propéptido, o cuando el agente actúa como un inhibidor competitivo o no competitivo de la metaloproteinasas en relación con el propéptido, generalmente el agente se pone en contacto con el medio en el que probablemente interaccionarán la metaloproteinasas y el propéptido (p. ej., la sangre).

10 En una realización, el agente disminuye la actividad proteolítica de una metaloproteinasas que escinde el propéptido de miostatina, de un complejo de miostatina latente, reduciendo o inhibiendo de este modo la activación de la miostatina por debajo de un nivel de activación de la miostatina que tiene lugar o tendría lugar en ausencia del agente. Cuando un agente tal se administra a un individuo, el agente puede producir en el individuo un incremento de la masa muscular o una disminución del contenido en grasas, o ambos. El individuo puede ser cualquier individuo en el que la miostatina se exprese, particularmente un organismo vertebrado, por ejemplo, animales domésticos o animales que se crían como fuente de alimentos, tales como especies de mamíferos (p. ej., especies ovinas, porcinas o bovinas), especies aviares (p. ej., pollos o pavos), o especies piscícolas (p. ej., salmón, trucha o bacalao). El individuo también puede ser una persona humana, por ejemplo, una persona que padece un trastorno muscular (p. ej., una distonía o distrofia), una persona que padece un trastorno de desgaste muscular (p. ej., caquexia), o una persona que padece una obesidad clínica u otro trastorno metabólico, tal como diabetes de tipo 2. También es posible que el agente incremente la actividad proteolítica de una metaloproteinasas que escinde el propéptido de miostatina desde un complejo de miostatina latente, incrementando de este modo la activación de la miostatina sobre un nivel, si es que hubiera uno, de activación de la miostatina que tiene lugar o tendría lugar en ausencia del agente. Cuando se administra un agente tal a un individuo, el agente puede producir una disminución de la masa muscular o incrementar el contenido en grasas, o ambos en el individuo.

25 La presente invención puede causar un incremento de la masa muscular en un individuo. El individuo al que se va a incrementar la masa muscular, generalmente es un vertebrado, por ejemplo, un animal doméstico o de granja, incluyendo un mamífero tal como una especie ovina, una especie porcina o una especie bovina; una especie aviar tal como un pollo o un pavo; o una especie piscícola; o puede ser una persona humana.

30 La presente invención puede mejorar un trastorno metabólico en un individuo. El trastorno metabólico puede ser cualquier trastorno asociado con una activación o una actividad incrementada o indeseable de la miostatina, por ejemplo un trastorno de desgaste muscular, tal como el que se asocia con la distrofia muscular, la caquexia (p. ej., asociada con un cáncer o una enfermedad de inmunodeficiencia adquirida), o sarcopenia; o un trastorno metabólico tal como obesidad clínica o diabetes de tipo 2. El individuo en el que se alivia el trastorno metabólico, puede ser cualquier individuo, y generalmente es un vertebrado, por ejemplo, un animal doméstico tal como un gato o un perro, o un animal criado como fuente de alimento (p. ej., ganado, ovejas, cerdos o peces); o puede ser una persona humana. La mejora del trastorno se puede identificar empleando cualquier ensayo empleado generalmente para vigilar el trastorno metabólico en particular, por ejemplo, una prueba de tolerancia a la glucosa para la diabetes, o un ensayo de leptina en suero para el análisis de la grasa corporal.

35 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para identificar un agente que modula la activación mediada con metaloproteinasas de la miostatina latente, que comprende:

40 a) poner en contacto un propéptido de miostatina, una metaloproteinasas que puede escindir el propéptido de miostatina y un agente para el ensayo, bajo condiciones suficientes para que tenga lugar la escisión del propéptido con la metaloproteinasas; y

50 b) detectar un cambio en la cantidad de escisión del propéptido en ausencia del agente del ensayo, comparando con la presencia del agente del ensayo, identificando de este modo el agente del ensayo como un agente que modula la activación mediada con metaloproteinasas de la miostatina latente,

55 en donde la metaloproteinasas es un miembro de la familia de proteínas morfogenéticas óseas 1/toloides (BMP-1/TLD).

El propéptido de la miostatina puede estar en forma aislada o puede ser un componente de un complejo de miostatina latente que contiene adicionalmente un fragmento de miostatina C-terminal o un dímero C-terminal de miostatina.

60 Cuando se identifica un agente del ensayo que tiene actividad moduladora de la miostatina mediada con metaloproteinasas, un método del tercer aspecto de la invención puede incluir adicionalmente una etapa de determinación de una cantidad con la que el agente incrementa o disminuye la escisión del propéptido de miostatina o la activación de la miostatina. Por ejemplo, cuando se identifica un agente que incrementa la actividad proteolítica de la metaloproteinasas sobre un nivel basal en una célula, un método de la invención puede incluir adicionalmente determinar una cantidad con la que el agente incrementa la activación de la miostatina sobre el nivel basal. De este modo, un método de la invención proporciona unos medios para obtener agentes o cuadros de agentes que modulan de manera variada la activación de la miostatina a través de una metaloproteinasas. Un método tal proporciona adicionalmente unos medios para determinar las cantidades de un agente particular, útil para proporcionar un nivel deseado de actividad de la miostatina.

Una diferencia en la cantidad de escisión del propéptido debido al contacto con un agente del ensayo, se puede detectar, por ejemplo, detectando el propéptido o un producto de la escisión del propéptido, por ejemplo, empleando un método tal como la electroforesis, la cromatografía o la espectrometría de masas, con el que se puede detectar un propéptido de miostatina o un producto de su escisión, basándose en su tamaño, su carga o ambos; un ensayo inmunológico basado en un análisis tal como un análisis de inmunotransferencia, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), o similar, que emplea un anticuerpo específico para el propéptido intacto o el propéptido escindido, pero no un anticuerpo que se une al propéptido intacto y escindido; o un ensayo basado en la fluorescencia, que incluye, por ejemplo, un ensayo de transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET), en donde la fluorescencia del propéptido intacto se enfría rápidamente y el enfriado rápido se alivia después de la escisión del propéptido. Dependiendo de la cantidad relativa de propéptido de miostatina intacto, de producto de la escisión del propéptido o una combinación de los mismos que se detecta, se puede identificar un agente del ensayo como un agente que incrementa o reduce la escisión del propéptido de miostatina mediada con metaloproteinasas y la activación de la miostatina latente. También se puede determinar la cantidad con la que el agente modula la activación mediada con la metaloproteinasas de la miostatina latente.

Una diferencia en la cantidad de escisión del propéptido, también se puede detectar detectando un cambio en la unión de miostatina a un receptor de miostatina *in vitro* o expresado en una superficie celular, o detectando un cambio en una transducción de una señal mediada con miostatina en una célula que expresa un receptor de miostatina. Cuando el ensayo es un ensayo basado en una célula, la célula puede ser una que exprese un receptor de miostatina endógeno, por ejemplo, miocitos L6 o puede ser una célula que expresa un transgén que codifica el receptor de la miostatina, por ejemplo, una célula transfectada con un polinucleótido que codifica un receptor de activina, tal como un receptor de activina de tipo II. La transducción de la señal mediada con miostatina se puede detectar en cualquier nivel en la ruta de la transducción de la señal, incluyendo desde la unión de la miostatina a un receptor de la superficie celular, hasta la expresión de un gen que está regulado debido a la unión de la miostatina con un receptor de miostatina, en donde en un ensayo de detección de la invención, la transducción de la señal depende de la escisión mediada con metaloproteinasas de un propéptido de miostatina y de la activación de un complejo de miostatina latente. De este modo, la transducción de la señal mediada con miostatina se puede detectar, detectando la unión de miostatina a un receptor de miostatina empleando un ensayo de unión al receptor, o detectando la expresión de un gen regulado con miostatina, que incluye, por ejemplo, un gen informador que puede comprender, por ejemplo, un elemento regulador de TGF- $\beta$  ligado funcionalmente a un polinucleótido que codifica un polipéptido detectable.

El presente método también es útil para confirmar que un agente modula la escisión de un propéptido de miostatina mediada con metaloproteinasas y la activación de la miostatina, incluyendo si se desea, la actividad específica del agente.

Un agente que modula la activación mediada con metaloproteinasas de la miostatina latente, puede ser un agonista o un antagonista de la activación mediada con metaloproteinasas de la miostatina latente, y puede reducir o inhibir la activación mediada con metaloproteinasas de la miostatina latente, o puede incrementar la activación mediada con metaloproteinasas de la miostatina latente. Un agente que modula la activación mediada con metaloproteinasas de la miostatina latente, puede ser cualquier tipo de molécula, incluyendo, por ejemplo, un agente peptídico, un agente polinucleotídico, un agente de anticuerpo o un agente de molécula orgánica pequeña.

Un agente peptídico que modula la activación mediada con metaloproteinasas de la miostatina latente puede incluir, por ejemplo, una porción peptídica de un polipéptido de miostatina o un derivado de dicha porción peptídica de miostatina. Un derivado de una porción peptídica de una miostatina puede ser un péptido que se corresponde con un propéptido de miostatina. El derivado puede ser un propéptido que tenga una mutación del sitio de corte de la metaloproteinasas, por ejemplo, una sustitución, una delección o una inserción de un aminoácido en el sitio de la escisión o suficientemente próximo al mismo, de modo que la metaloproteinasas tiene una actividad de escisión incrementada o disminuida en relación con el agente peptídico. El derivado de una porción peptídica de miostatina puede ser un agente peptídico que reduce o inhibe la activación mediada con metaloproteinasas de la miostatina latente. El agente que modula la activación mediada con metaloproteinasas de la miostatina latente puede estar ligado funcionalmente a una segunda molécula que facilita la acción o la actividad del agente, o incrementa o disminuye la estabilidad del agente en un entorno particular. Por ejemplo, un agente peptídico puede estar estabilizado mediante la unión funcional del agente peptídico con un polipéptido tal como un dominio Fc de una molécula de anticuerpo, incrementando de este modo la semi-vida del agente peptídico *in vivo*.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra que la incubación del complejo de miostatina (MSTN; dímero de miostatina C-terminal y propéptido) con mTLL-1 daba como resultado un incremento espectacular de la expresión de un gen informador de luciferasa (barra punteada; véase el Ejemplo 2), cuya expresión está regulada en células de rhabdomyosarcoma transfectadas después de la puesta en contacto de las células con miostatina activa. Sólo se observó la expresión de señal de fondo en las células puestas en contacto únicamente con el complejo de miostatina (barra negra), o únicamente con mTLL-1 (barra rayada).

La Figura 2 muestra una curva patrón generada empleando el ensayo informador con luciferasa, en donde las células transfectadas (véase la Figura 1, arriba) se pusieron en contacto con las cantidades específicas del dímero de

miostatina C-terminal purificado y activo (rombos). La actividad de la luciferasa testigo (sin miostatina) se muestra con círculos.

Las Figuras 3A a 3E muestran la determinación de la escisión del propéptido de miostatina con la familia de proteinasas BMP-1/TLD.

Las Figuras 3A a 3B muestran la detección de un producto de la degradación del propéptido en medio acondicionado de células CHO. Medios acondicionados preparados a partir de células CHO que expresan el propéptido (Figura 3A) o formas de tipo silvestre o mutantes de proteínas de fusión propéptido/Fc (Figura 3B), se analizaron mediante SDS/PAGE seguido de análisis de transferencia de tipo Western empleando anticuerpos dirigidos contra el propéptido de miostatina (Figura 3A) o IgG. (Figura 3B). Obsérvese que la mutación de D76 a A dio como resultado la pérdida del producto de degradación.

La Figura 3C muestra la purificación de los complejos de propéptido de tipo silvestre y mutante/dímero C-terminal. Los complejos proteicos fueron analizados con SDS-PAGE en presencia o en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, seguido de análisis de transferencia de tipo Western, tal y como se ha indicado. Obsérvese que igual que el propéptido de tipo silvestre, el propéptido mutante D76A se purificó en un complejo con el dímero C-terminal. El producto de la degradación del propéptido no se purificó junto con el complejo y, por tanto, no formaba parte del complejo. Las bandas marcadas con el asterisco indican las especies de miostatina mal plegadas, que eran evidentes en condiciones no reductoras.

Las Figuras 3D a 3E muestran la escisión del propéptido con proteinasas BMP-1/TLD. Los complejos de tipo silvestre y mutante se incubaron con proteinasas purificadas y se analizaron con SDS-PAGE seguido de transferencia de tipo Western, empleando anticuerpos dirigidos contra el propéptido. Las incubaciones se realizaron con 1  $\mu$ g de complejo latente y 250 ng de proteinasa, durante 16 horas a 37°C, excepto en la Figura 3D, las muestras se incubaron con 250 ng adicionales de BMP-1 durante 4 horas más. En la Figura 3E, las pistas marcadas con "sin enzima" indican muestras incubadas durante 16 horas a 37°C, en ausencia de enzima. Obsérvese que todas las enzimas eran capaces de generar el producto de la escisión y que la proteína mutante D76A era completamente resistente al corte.

Las Figuras 4A a 4D muestran la activación de la actividad de la miostatina latente con proteinasas BMP-1/TLD. En las Figuras 4B a 4D, las barras negras representan el tipo silvestre, y las barras grises representan los complejos mutantes D76A. Obsérvese que aunque el tratamiento térmico activó los complejos de tipo silvestre y mutante (Figura 4B), cada proteinasa era capaz de activar solamente el complejo de tipo silvestre (Figuras 4C y 4D). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

La Figura 4A muestra la activación de la actividad del gen informador pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-luciferasa mediante el dímero C-terminal de la miostatina purificado.

La Figura 4B muestra la activación del complejo latente del dímero C-terminal/propéptido de miostatina mediante tratamiento térmico. Se indica el testigo (sin miostatina (MSTN)).

La Figura 4C y 4D muestran la activación del complejo latente del dímero C-terminal/propéptido de miostatina con proteinasas BMP-1/TLD. Las muestras empleadas para los ensayos informadores en las Figuras 4C y 4D son las mismas muestras mostradas en las Figuras 3D y 3E, respectivamente.

La Figura 5 muestra la inhibición de la actividad del gen informador con las proteínas de fusión de propéptido de tipo silvestre y mutante/Fc *in vitro*. Las células A204 transfectadas con la estructura artificial informadora, se incubaron con 10 ng/ml de dímero C-terminal de miostatina purificado y diversas concentraciones de la proteína de fusión de propéptido de tipo silvestre (oscuro) o mutante D76A (claro)/Fc. Obsérvese que las proteínas de tipo silvestre y mutante eran igualmente eficaces en el bloqueo de la actividad de la miostatina.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la identificación de proteasas que escinden el propéptido de miostatina, incluyendo cuando el propéptido está presente en un complejo con un dímero C-terminal de miostatina, que convierte de este modo el complejo inactivo y latente de miostatina en miostatina activa. Las proteasas que tienen dicha actividad para escindir el propéptido de miostatina se ejemplifican con metaloproteinasas de la familia de proteínas morfogenéticas óseas 1/toloides (BMP-1/TLD). Como tales, las proteasas proporcionan dianas y reactivos para identificar fármacos que pueden incrementar o reducir la actividad proteasa, o pueden incrementar o reducir la escisión del propéptido de miostatina, mediada por las proteasas, y, de este modo, incrementar o reducir la actividad de la miostatina.

La miostatina (factor de crecimiento de diferenciación 8; GDF-8) se expresa como una pre-proproteína, promiostatina, que incluye un péptido señal (residuos de aminoácidos aproximadamente del 1 al 20), el dominio del propéptido de miostatina (residuos de aminoácidos aproximadamente del 20 al 262 o 263) y el dominio C-terminal de la miostatina (residuos de aminoácidos aproximadamente del 267 o 268 al 375). Los polipéptidos de promiostatina y los polinucleótidos que los codifican están altamente conservados en la evolución (véase, McPherron y Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12457, 1997; GenBank n° de orden AF019619, AF019620, AF019621, AF019622, AF019623, AF019624, AF019625, AF019626 y AF019627; documento de patente de EE.UU. n° 5.994.618). Los polinucleótidos

## ES 2 344 734 T3

de promiostatina y los polipéptidos codificados se ejemplifican en esta memoria con la promiostatina humana (SEQ ID NOs: 1 y 2; el propéptido está en los residuos de aminoácidos aproximadamente del 20 al 263), la promiostatina bovina (SEQ ID NOs: 3 y 4; el propéptido está en los residuos de aminoácidos aproximadamente del 20 al 262), la promiostatina de pollo (SEQ ID NOs: 5 y 6; el propéptido está en los residuos de aminoácidos aproximadamente del 20 al 262) y la promiostatina del pez cebra (SEQ ID NOs: 7 y 8; el propéptido está en los residuos de aminoácidos aproximadamente del 20 al 262).

La miostatina es activada por dos eventos de escisión proteolítica - el primero la eliminación de la secuencia señal (aproximadamente los 20 primeros residuos de aminoácidos del extremo N-terminal de la promiostatina; véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2) y el segundo en un sitio de procesamiento tetrabásico (aproximadamente en los residuos de aminoácidos 263 a 266 de la promiostatina) - dando como resultado la generación de un propéptido N-terminal de 26 kDa (aproximadamente desde los residuos de aminoácidos 20 a 262 ó 263) y un péptido C-terminal de 12,5 kDa (aproximadamente desde los residuos de aminoácidos 266 ó 267 hasta el extremo C-terminal); un dímero del péptido C-terminal es biológicamente activo. Después de la secreción desde las células, el dímero C-terminal de la miostatina se mantiene en un estado latente e inactivo debido a que permanece enlazado con el propéptido de miostatina (Lee y McPherron, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9306-9311, 2001). El complejo de miostatina latente que circula en la sangre de ratones adultos se puede activar *in vitro* tratando con ácido (Zimmers y col., *Science* 296:1486-1488, 2002)

Los ratones en los que se ha eliminado el gen de la miostatina, muestran una masa muscular incrementada y además muestran una reducción significativa en la acumulación de grasas al incrementarse la edad, en comparación con miembros de la camada de tipo silvestre (McPherron y Lee, *J. Clin. Invest.* 109:595-601, 2002). En cambio, la hiperexpresión de miostatina *in vivo*, produce las señales y los síntomas característicos del síndrome de desgaste muscular, caquexia (Zimmers y col., citado anteriormente, 2002). El desgaste muscular observado en ratones que tienen niveles incrementados de miostatina circulante, se puede invertir parcialmente introduciendo en los ratones agentes que se unen a la miostatina, tales como el propéptido de la miostatina y la folistatina (Zimmers y col., citado anteriormente, 2002). Estos resultados confirmaron que el desgaste muscular observado era debido a una miostatina incrementada, e indican que métodos para disminuir el nivel de miostatina activa o reducir o inhibir de otro modo la actividad de la miostatina, pueden ser útiles para aliviar el desgaste muscular. Dada la naturaleza altamente conservada de la miostatina entre especies tan diversas como peces y seres humanos, estos resultados indican que la miostatina también puede estar implicada en la caquexia asociada con trastornos diversos en humanos, incluyendo por ejemplo, el cáncer, el síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA) y la septicemia, así como en trastornos neuromusculares, tales como la distrofia muscular (véase, Gonzalez-Kadavid y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14938-14943, 1998).

Una función del músculo esquelético adecuada también está implicada en mantener el metabolismo normal de la glucosa y la resistencia del músculo esquelético a la toma de glucosa estimulada con insulina, es la manifestación más temprana de diabetes no dependiente de insulina (tipo 2) (véase, McPherron y Lee, citado anteriormente, 2002). En dos modelos de ratones de obesidad y de diabetes, la pérdida de miostatina evitaba un incremento de la masa del tejido adiposo con la edad y atenuaba el fenotipo obeso y diabético en los modelos de ratón (McPherron y Lee, citado anteriormente, 2002). De este modo, los métodos que modulan la actividad de la miostatina también pueden ser útiles para reducir la grasa corporal en un individuo y para tratar trastornos asociados con una función muscular anormal o con la obesidad, por ejemplo, la diabetes de tipo 2.

Tal y como se describe en esta memoria, el propéptido de miostatina tanto en una forma libre o cuando forma parte de un complejo con el dímero C-terminal de la miostatina, se puede escindir con miembros de la familia de metaloproteinasas BMP-1/TLD, y dicha escisión libera el dímero C-terminal de la miostatina de los efectos inhibidores del propéptido, generando de este modo miostatina activa. Así, las proteasas BMP-1/TLD proporcionan una diana para fármacos que pueden modular la actividad de la miostatina y, de este modo, incrementar o disminuir la masa muscular o reducir o evitar la obesidad en un organismo. Por tanto, la invención proporciona métodos para identificar agentes que modulan la escisión del propéptido de miostatina mediada con metaloproteinasas, y que modulan la activación mediada con metaloproteinasas de la miostatina latente.

Un método de detección de la invención se puede realizar, por ejemplo, poniendo en contacto un propéptido de miostatina, una metaloproteinasa que puede escindir el propéptido de miostatina y que sea un miembro de la familia BMP-1/TLD, y un agente del ensayo, bajo condiciones suficientes para la escisión del propéptido con la metaloproteinasa; y detectando un cambio en la cantidad de la escisión del propéptido en ausencia del agente del ensayo, comparado con la presencia del agente del ensayo, identificando de este modo el agente del ensayo comparando con la presencia del agente del ensayo, identificando así el agente del ensayo como un agente que modula la escisión del propéptido de miostatina mediada con metaloproteinasa. El propéptido de miostatina puede estar de forma aislada o puede ser un componente de un complejo de miostatina latente que contiene adicionalmente un fragmento C-terminal de miostatina de un dímero C-terminal de miostatina.

Una metaloproteinasa examinada de acuerdo con un método de detección de la invención, puede ser cualquier metaloproteinasa de la familia BMP-1/TLD que corte un propéptido de miostatina, particularmente una metaloproteinasa que escinda el propéptido cuando está en un complejo de miostatina latente con un fragmento de miostatina C-terminal o un dímero del mismo, de modo que esta miostatina activa se genera a partir del complejo de miostatina latente. La familia BMP-1/TLD de metaloproteinasas incluye cuatro proteínas de mamífero, BMP-1 (Wozney y col., *Science*

242:1528-1534, 1988), toloide de mamífero (mTLD; Takahara y col., *J. Biol. Chem.* 269:32572-32578, 1994), similar a toloide 1 de mamífero (mTLL-1; Takahara y col., *Genomics* 34:157-165, 1996), y similar a toloide 2 de mamífero (mTLL-2; Scott y col., *Devel. Biol.* 213:283-300, 1999). La familia de metaloproteinasas BMP-1/TLTD, a su vez, es miembro de una familia más grande de proteínas, la familia de las astacinas, que incluyen proteasas que se expresan en diversos organismos vertebrados e invertebrados, que incluyen por ejemplo, *Xenopus* (xoloide; UVS.2), peces (coriolisina H y L; toloide de pez cebra), erizo de mar (BP-10 y SpAN) e hidra (HMP-1, véase, por ejemplo, Li y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5127-5130, 1996). Como tales, los ensayos de detección de la invención permiten una identificación de los agentes que pueden ser útiles, por ejemplo, para modular la activación de la miostatina en una variedad de organismos diferentes.

BMP-1 y mTLD son codificadas por los ARNm cortados y empalmados alternativamente, procedentes de un solo gen (Takahara y col., citado anteriormente, 1994), mientras que mTLL-1 y mTLL-2 son codificadas por distintos genes. La familia de proteasas BMP-1/TLTD es conocida por tener un papel en la regulación de la actividad de al menos tres clases de sustratos. Primero, BMP-1, mTLD y mTLL-1 son capaces de procesar precursores de procolágeno en monómeros maduros, necesarios para ensamblar las fibras multímeras que están presentes generalmente en la matriz extracelular (Kessler y col., *Science*, 271:360-362, 1996; Li y col., citado anteriormente, 1996). Segundo, BMP-1, mTLD, mTLL-1 y mTLL-2 pueden procesar cada una pro-lisil-oxidasa en la enzima madura, biológicamente activa (Uzel y col., *J. Biol. Chem.* 276:22537-22543, 2001). Tercero, BMP-1 y mTLL-1 pueden escindir la cordina (Scott y col., citado anteriormente, 1999), que se une normalmente a varios miembros del subgrupo BMP de la superfamilia TGF- $\beta$  y los mantiene en un estado latente (Blader y col., *Science* 278:1937-1940, 1997; Marques y col., *Cell* 91:417-26, 1997; Piccolo y col., *Cell* 91:407-416, 1997). La escisión de la cordina con estas metaloproteinasas libera la BMP del efecto inhibitor de la cordina. Como tales, se cree que BMP-1 y TLL-1 tienen un papel en la modulación de los efectos de las BMPs durante una variedad de procesos morfogénicos. Tal y como se describe en esta memoria, los miembros de la familia BMP-1/TLTD, que incluyen BMP-1, mTLD, mTLL-1 mTLL-2, también pueden escindir el propéptido de la miostatina, tanto en su forma libre como cuando está unido al dímero C-terminal de la miostatina (complejo de miostatina latente), en donde la escisión del propéptido da como resultado la activación del dímero C-terminal de la miostatina (véanse los Ejemplos 1 y 2).

Un agente del ensayo que se puede examinar de acuerdo con un método de la invención puede ser cualquier tipo de molécula, incluyendo, por ejemplo, un péptido, un derivado peptídico tal como un hidroxamato de péptido o un péptido fosfínico, un peptoide, un polinucleótido o una molécula orgánica pequeña (véase el Ejemplo 3). Por tanto, la expresión "agente del ensayo" se emplea de manera amplia en esta memoria para significar cualquier compuesto en el que se esté examinando su actividad agonista o antagonista en relación con la escisión del propéptido de miostatina mediada con metaloproteinasas, o la activación de miostatina. Aunque el método se emplea generalmente como un ensayo de detección para identificar moléculas que no se conocen previamente (agentes del ensayo), que pueden actuar como agentes agonistas o antagonistas, el método también se puede utilizar para confirmar que un agente conocido por tener una actividad particular, de hecho tiene la actividad, por ejemplo, al normalizar la actividad del agente; y se puede utilizar para detectar derivados u otras formas modificadas o miméticas de tales agentes conocidos.

Un método de detección de la invención se puede adaptar de forma conveniente a un análisis de alto rendimiento, por ejemplo, uno en el que cada una de una variedad de muestras que comprenden el propéptido de miostatina y la metaloproteinasas, se ponen en contacto con un agente del ensayo (que el mismo puede comprender una variedad de agentes del ensayo). De este modo, el método se puede utilizar para rastrear quimiotecas combinatorias de agentes del ensayo, que pueden ser una quimioteca de agentes del ensayo aleatorios, agentes del ensayo sesgados o agentes del ensayo diversificados (véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. n° 5.571.698), para identificar los agentes que pueden modular la escisión mediada con metaloproteinasas de un propéptido de miostatina y, de este modo, la actividad de la miostatina. Los métodos para preparar una quimioteca combinatoria de moléculas que se pueda someter a ensayo para estudiar una actividad deseada, son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, métodos para preparar una quimioteca de expresión de péptidos en fagos que pueden ser fagos constreñidos (véase, por ejemplo, los documentos de patente de EE.UU. n° 5.622.699; n° 5.206.347; Scott y Smith, *Science* 249:386-390, 1992; Markland y col., *Gene* 109:13-19, 1991); una quimioteca de péptidos (documento de patente de EE.UU. n° 5.264.563); una quimioteca de compuestos derivados de péptidos, tales como una quimioteca de compuestos de hidroxamato, una quimioteca de compuestos de hidroxamato inversos, una quimioteca de compuestos de carboxilato, una quimioteca de compuestos de tiol, una quimioteca de péptidos fosfínicos o una quimioteca de compuestos de fosfonato (véase, por ejemplo, Dive y col., *Biochem. Soc. Trans.* 28:455-460, 2000; Ye y Marshall, *Peptides: The Wave of the Future* (Lebl y Houghten, compiladores; American Peptide Society, 2001); una quimioteca peptidomimética (Blondelle y col., *Trends Anal. Chem.* 14:83-92, 1995); una quimioteca de ácido nucleico (O'Connell y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5883-5887, 1996; Tuerk y Gold, *Science* 249:505-510, 1990; Gold y col., *Ann. Rev. Biochem.* 64:763-797, 1995); una quimioteca de oligosacáridos (York y col., *Carb. Res.* 285:99-128, 1996; Liang y col., *Science* 274:1520-1522, 1996; Dign y col., *Adv. Expt. Med. Biol.* 376:261-269, 1995); una quimioteca de lipoproteínas (de Kruijff y col., *FEBS Lett.* 399:232-236, 1996); una quimioteca de glicoproteínas o glicolípidos (Karaoglu y col., *J. Cell Biol.* 130:567-577, 1995); o una quimioteca química que contenga, por ejemplo, fármacos u otros agentes farmacéuticos (Gordon y col., *J. Med. Chem.* 37:1385-1401, 1994; Ecker y Crooke, *BioTechnology* 13:351-360, 1995).

Los polinucleótidos pueden ser particularmente útiles como agentes que pueden modular la escisión del propéptido de miostatina mediada con metaloproteinasas o la activación de la miostatina, debido a que moléculas de ácido nucleico que tienen especificidad en la unión a dianas celulares, incluyendo polipéptidos celulares, se encuentran en la naturaleza, y debido a que moléculas sintéticas que tienen dicha especificidad se pueden preparar e identificar fácil-

## ES 2 344 734 T3

- mente (véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. nº 5.750.342). El término “polinucleótido” se emplea ampliamente en esta memoria y significa una secuencia de dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que están ligados entre sí con un enlace fosfodiéster. Como tal, el término “polinucleótido” incluye ARN y ADN, que puede ser un gen o una porción del mismo, un ADNc, una secuencia de ácido polidesoxirribonucleótido sintético o similar, y puede ser monocatenario o bicatenario, así como un híbrido de ADN/ARN. Un polinucleótido puede ser una molécula de ácido nucleico presente en la naturaleza, que se puede aislar a partir de una célula, o una molécula sintética que se puede preparar, por ejemplo, por métodos de síntesis química o mediante métodos enzimáticos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Un agente polinucleotídico (o un agente del ensayo) puede contener análogos nucleósidos o nucleótidos, o un enlace de la cadena principal distinto de un enlace fosfodiéster. En general, los nucleótidos que comprenden un polinucleótido son desoxirribonucleótidos presentes en la naturaleza, tales como adenina, citosina, guanina o timina ligados con 2'-desoxirribosa, o ribonucleótidos tales como adenina, citosina, guanina o uracilo ligados a ribosa. Sin embargo, un polinucleótido también puede contener análogos de nucleótidos, que incluyen nucleótidos sintéticos no presentes en la naturaleza o nucleótidos presentes en la naturaleza modificados. Tales análogos de nucleótidos son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente, como son los polinucleótidos que contienen dichos análogos de nucleótidos (Lin y col., *Nucl. Acids Res.* 22:5220-5234, 1994; Jellinek y col., *Biochemistry* 34:11363-11372, 1995; Pagratis y col., *Nature Biotechnol.* 15:68-73, 1997).
- El enlace covalente que une los nucleótidos de un polinucleótido es generalmente un enlace fosfodiéster. Sin embargo, el enlace covalente también puede ser cualquiera entre una variedad de otros enlaces, incluyendo un enlace tiodiéster, un enlace fosforotioato, un enlace similar a peptídico o cualquier otro enlace conocido en la técnica por ser útil para unir nucleótidos para producir polinucleótidos sintéticos (véase, por ejemplo, Tam y col., *Nucl. Acids Res.* 22:977-986, 1994; Ecker y Crooke, *BioTechnology* 13:351-360, 1995). La incorporación de análogos de nucleótidos no presentes en la naturaleza o de enlaces que ligan los nucleótidos o los análogos, puede ser particularmente útil cuando el polinucleótido se va a exponer a un entorno que puede contener una actividad nucleolítica, incluyendo por ejemplo, un medio de cultivo tisular o después de la administración a un individuo vivo, ya que los polinucleótidos modificados pueden ser menos susceptibles a la degradación.
- Un polinucleótido que comprende nucleótidos presentes en la naturaleza y enlaces fosfodiéster, se puede sintetizar químicamente o se puede producir empleando métodos de ADN recombinante, empleando un polinucleótido adecuado como molde. En comparación, un polinucleótido que comprende análogos nucleotídicos o enlaces covalentes distintos del fosfodiéster, generalmente se sintetiza químicamente, aunque una enzima tal como la polimerasa de T7 puede incorporar ciertos tipos de análogos de nucleótidos en un polinucleótido y, de este modo, se puede utilizar para producir de forma recombinante un polinucleótido tal, a partir de un molde adecuado (Jellinek y col., citado anteriormente, 1995).
- De forma similar, los péptidos, tal y como se ejemplifican en esta memoria (véanse los Ejemplos 3 y 4) pueden ser útiles como agentes para modular la activación de la miostatina mediada con metaloproteinasas, o como agentes del ensayo para detectar dicha actividad. Los agentes peptídicos (o péptidos del ensayo) pueden contener uno o varios D-aminoácidos y/o L-aminoácidos; y/o uno o varios análogos de aminoácidos, por ejemplo, un aminoácido que se ha derivatizado o modificado de forma distinta en su cadena lateral reactiva. Además, se pueden modificar uno o varios enlaces peptídicos en el péptido y se puede modificar un grupo reactivo en el extremo amino terminal o en el extremo carboxi terminal o en ambos. Los péptidos que contienen análogos de D-aminoácidos o de L-aminoácidos, o similares, pueden tener una estabilidad mejorada frente a una proteasa, un agente oxidante u otro material reactivo que pueda encontrar el péptido en un entorno biológico y, por tanto, ser particularmente útiles en la realización de un método para modular la activación de la miostatina mediada con metaloproteinasas, tal y como se describe en esta memoria. Tal y como se describe en esta memoria, la estabilidad de un agente peptídico (o un agente del ensayo) también se puede mejorar generando (o enlazando) una proteína de fusión que comprende el péptido y un segundo polipéptido (p. ej., un dominio Fc de un anticuerpo) que incrementa la semi-vida del agente peptídico *in vitro* (véase el Ejemplo 4; véase también el documento de publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº US 2003/0104406 A1). Los péptidos también se pueden modificar para tener una estabilidad reducida en un entorno biológico, si se desea, de modo que se reduzca el periodo de tiempo durante el cual el péptido está activo en el entorno.
- Los agentes también pueden ser anticuerpos que se obtienen contra y se unen específicamente a uno o a varios epítopos de una metaloproteinasas que escinde un propéptido de miostatina; o contra un epítipo del propéptido que puede ser un propéptido aislado o un componente del propéptido de un complejo de miostatina latente; o un complejo de la metaloproteinasas y el propéptido. Tal y como se emplea en esta memoria, el término “anticuerpo” se emplea en su sentido más amplio para incluir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de tales anticuerpos que se unen al antígeno. La expresión “se une específicamente” o “actividad de ligación específica” o similar, cuando se emplea en relación con un anticuerpo, significa que una interacción del anticuerpo y un epítipo particular tiene una constante de disociación de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  M, generalmente al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M, generalmente al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M y particularmente al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M o  $1 \times 10^{-10}$  M o menos. Como tales, los fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd y Fv de un anticuerpo que conserva la actividad de ligación específica, se incluyen dentro de la definición de un anticuerpo. Además de la ligación específica a un epítipo particular, un agente del anticuerpo modula la actividad digestiva proteasa de una metaloproteinasas para cortar un propéptido de miostatina, que incluye incrementar o disminuir dicha actividad.

El término “anticuerpo” tal y como se emplea en esta memoria incluye anticuerpos presentes en la naturaleza y anticuerpos no presentes en la naturaleza, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos, bifuncionales y humanizados, así como sus fragmentos que se unen al antígeno. Tales anticuerpos no presentes en la naturaleza se pueden construir empleando la síntesis peptídica en fase sólida, se pueden producir de forma recombinante o se pueden obtener, por ejemplo, escrutando quimiotecas combinatorias consistentes en cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase, Huse y col., *Science* 246:1275-1281, 1989). Estos y otros métodos para preparar, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, con injerto de CDR, de cadena sencilla y bifuncionales son bien conocidos (Winter y Harris, *Immunol. Today* 14:243-246, 1993; Ward y col., *Nature* 341:544-546, 1989; Harlow y Lane, *Antibodies: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); Hilyard y col., *Protein Engineering: A practical approach* (IRL Press 1992); Borrabeck, *Antibody Engineering*, 2ª ed. (Oxford University Press 1995).

Se puede obtener un cuadro de anticuerpos de agentes del ensayo inmunizando un animal empleando una porción peptídica de un propéptido de miostatina o de una metaloproteinasa, particularmente un miembro de la familia BMP-1/TLD. Cuando una porción peptídica tal del propéptido o de la metaloproteinasa no es inmunógena, se puede volver inmunógena acoplando el hapteno a una molécula vehículo tal como seroalbúmina bovina (BSA) o hemocianina de la lapa californiana (KLH) o expresando la porción peptídica como una proteína de fusión. Otras moléculas portadoras diversas y métodos para acoplar un hapteno a una molécula portadora son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, citado anteriormente, 1999). Los métodos para obtener anticuerpos policlonales, por ejemplo, en un conejo, una cabra, un ratón u otro mamífero son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Green y col., “Production of Polyclonal Antisera” en *Immunochemical Protocols* (Manson, compilador, Humana Press 1992), páginas 1-5; Coligan y col., “Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters”, en *Curr. Protocols Immunol.* (1992), sección 2.4.1. Además, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener empleando métodos que son bien conocidos y rutinarios en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256:495, 1975; véase, también Harlow y Lane, citado anteriormente, 1999). Por ejemplo, las células de bazo de un ratón inmunizado con un receptor de miostatina, o un fragmento epitópico del mismo, se pueden fusionar con una línea celular de mieloma adecuada, tal como células de mieloma SP/02, para producir células de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma clonadas se pueden escruar empleando antígeno marcado para identificar los clones que secretan anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad adecuada, y los hibridomas que expresan anticuerpos que tienen una especificidad y una afinidad deseable se pueden aislar y emplear como una fuente continua de anticuerpos. Un fago recombinante que expresa, por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla que modula la escisión del propéptido de miostatina mediada con metaloproteinasa, también proporciona un anticuerpo que se puede utilizar para preparar equipos de reactivos estandarizados.

Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar a partir de cultivos de hibridomas mediante una variedad de técnicas bien establecidas, que incluyen, por ejemplo, la cromatografía de afinidad con gel de Sefarosa y proteína A, la cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de intercambio iónico (Coligan y col., citado anteriormente, 1992, véanse las secciones 2.7.1-2.7.12 y las secciones 2.9.1-2.9.3; véase también Barnes y col., “Purification of Immunoglobulin G (IgG)”, en *Meth. Molec. Biol.* 10:79-104 (Humana Press 1992). Los métodos de multiplicación *in vitro* e *in vivo* de anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica. La multiplicación *in vivo* se puede realizar en un medio de cultivo adecuado, tal como Medio Eagle Modificado con Dulbecco o medio RPMI 1640, opcionalmente relleno con un suero de mamífero tal como suero de ternera fetal o elementos traza y suplementos que sostienen el crecimiento, tal como células de exudado peritoneal de ratón normal, células del bazo, macrófagos de la médula ósea. La producción *in vitro* proporciona preparaciones de anticuerpo relativamente puras y permite un escalamiento para producir grandes cantidades de los anticuerpos deseados. El cultivo a gran escala de hibridomas se puede realizar mediante el cultivo en suspensión homogénea en un reactor de alzado de aire, en un reactor con agitación continua o en un cultivo de células inmovilizadas o atrapadas. La multiplicación *in vivo* se puede realizar inyectando clones celulares en mamíferos histocompatibles con las células parentales, por ejemplo, ratones singénicos, para ocasionar el crecimiento de tumores que producen anticuerpos. Opcionalmente, los animales se ceban con un hidrocarburo, especialmente aceites tales como pristano (tetrametilpentadecano) antes de la inyección. Después de una a tres semanas, se recupera el anticuerpo monoclonal deseado a partir del fluido corporal del animal.

Las aplicaciones terapéuticas para los agentes de anticuerpos identificados de acuerdo con un ensayo de detección de la invención, también se proporcionan. Cuando el procedimiento terapéutico es para tratar una persona humana, los anticuerpos se pueden obtener a partir de un anticuerpo de primate subhumano (véase, por ejemplo, Goldenberg y col., documento de Publ. Int. WO 91/11465, 1991; y Losman y col., *Intl. J. Cancer* 46:310, 1990). Un anticuerpo terapéuticamente útil para el tratamiento humano también se puede obtener a partir de un anticuerpo monoclonal “humanizado”. Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen mediante la transferencia de regiones determinantes de la complementariedad de ratón, procedentes de las cadenas ligera y pesada variables de la inmunoglobulina del ratón, a un dominio humano variable y sustituyendo a continuación los residuos humanos en las regiones armazón de los duplicados de murido. El uso de componentes de anticuerpo obtenidos a partir de anticuerpos monoclonales humanizados, sortea los problemas potenciales asociados con la inmunogenicidad de las regiones constantes del murido. Las técnicas generales para la clonación de dominios variables de inmunoglobulinas son conocidas (véase, por ejemplo, Orlandi y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833, 1989). Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados también son conocidas (véase, por ejemplo, Jones y col., *Nature* 321:522, 1986; Riechmann y col., *Nature* 332:323, 1988; Verhoeven y col., *Science* 239:1534, 1988; Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285, 1992; Sandhu, *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:437, 1992; y Singer y col., *J. Immunol.* 150:2844, 1993).

Alternativamente, los anticuerpos se pueden obtener a partir de fragmentos de anticuerpo humano aislados a partir de una quimioteca combinatoria de inmunoglobulinas (véase, por ejemplo, Barbas y col., *METHODS: A Companion to Methods in Immunology* 2:119, 1991; Winter y col., *Ann. Rev. Immunol.* 12:433, 1994).

5 Los anticuerpos también se pueden obtener a partir de anticuerpos monoclonales humanos que, por ejemplo, se pueden obtener a partir de ratones transgénicos que se han modificado genéticamente para producir anticuerpos humanos específicos como respuesta a una estimulación antigénica. En esta técnica, elementos de los loci de las cadenas pesada y ligera humana se introducen en cepas de ratones obtenidas a partir de líneas de células madre embrionarias que contienen roturas que actúan como dianas en los loci endógenos de las cadenas pesada y ligera. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos de antígenos humanos, y los ratones se pueden utilizar para producir hibridomas que secretan anticuerpos humanos. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos son bien conocidos (véase, por ejemplo, Green y col., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg y col., *Nature* 368:865, 1994; y Taylor y col., *Intl. Immunol.* 6:579, 1994) y están disponibles fuentes comerciales de anticuerpos humanos (Abgenix, Inc.; Fremont CA).

15 Los fragmentos que se unen a antígenos de un anticuerpo se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en *E. coli* del ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener mediante digestión con pepsina o papaína de los anticuerpos completos, por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir mediante escisión enzimática de los anticuerpos con pepsina, para proporcionar un fragmento 5S, F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento se puede escindir adicionalmente empleando un agente reductor de tiol y, opcionalmente, un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo que son el resultado de la escisión de los enlaces disulfuro, para producir fragmentos 3.5S Fab' monovalentes. Alternativamente, una escisión enzimática en la que se emplea pepsina produce directamente dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc (véase, por ejemplo, Goldenberg, documentos de patentes de EE.UU. n° 4.036.945 y 4.331.647 y las referencias contenidas en los mismos; Nisonhoff y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960; Porter, *Biochem J.* 73:119, 1959; Edelman y col., *Meth. Enzymol.* 1:422 (Academic Press 1967); véase también, Coligan y col., citado anteriormente, 1992, véanse las secciones 2.8.1-2.8.10 y 2.10.1-2.10.4).

Otros métodos para escindir anticuerpos, tales como la separación de las cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena pesada/ligera, la escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas también se pueden utilizar, con la condición de que los fragmentos se ligan específicamente en el antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>; esta asociación puede no ser covalente (Inbar y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2659, 1972). Alternativamente, las cadenas variables pueden estar enlazadas con un enlace disulfuro intermolecular o estar reticuladas por medio de compuestos químicos, tales como glutaraldehído (Sandhu, citado anteriormente, 1992). Preferentemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> están conectados con un enlazador peptídico. Estas proteínas que se unen a antígenos de cadena sencilla (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> conectados con un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que se introduce posteriormente en una célula hospedadora, tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una cadena polipeptídica sencilla con un péptido enlazador que forma un puente entre los dos dominios V. Los métodos para producir sFvs se describen, por ejemplo, en Whitlow y col., *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97, 1991; Bird y col., *Science* 242:423-426, 1988; Ladner y col., documento de patente de EE.UU. n° 4.946.778; Pack y col., *BioTechnology* 11:1271-1277, 1993; véase también Sandhu, citado anteriormente, 1992. Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una sola región determinante de la complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimo") se pueden obtener construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, empleando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de las células productoras de anticuerpo (véase, por ejemplo, Larrick y col., *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991).

50 Una diferencia en la cantidad de escisión del propéptido, debido al contacto con un agente del ensayo, se puede detectar, por ejemplo, detectando el propéptido y/o un producto de la escisión del propéptido, empleando un método tal como la electroforesis, la cromatografía o la espectrometría de masas (véase, por ejemplo, Thies y col., *Growth Factors* 18:251-259, 2001), que puede detectar un propéptido de miostatina o un producto de la escisión del mismo, basándose en su tamaño, en su carga o en ambos; un ensayo basado en la inmunología, tal como un análisis por inmunotransferencia, un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o similares, que utiliza un anticuerpo específico para el propéptido intacto o el propéptido escindido, pero no ambos; o un ensayo basado en la fluorescencia que incluye, por ejemplo, un ensayo de transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET), en el que la fluorescencia del propéptido intacto se enfría rápidamente y el enfriado rápido se alivia después de la escisión del propéptido. Cuando se detecta una cantidad incrementada de un producto de la escisión del propéptido, en presencia del agente del ensayo (o después de la puesta en contacto con el mismo), en comparación con una cantidad del producto de la escisión en ausencia del agente del ensayo, el agente del ensayo se identifica como un agente que puede incrementar la activación mediada con la metaloproteinasas de la miostatina latente. De forma similar, cuando se detecta una cantidad reducida del propéptido en presencia del agente del ensayo (o después de la puesta en contacto con el mismo), en comparación con una cantidad de propéptido en ausencia del agente del ensayo, el agente del ensayo se identifica como un agente que puede incrementar la activación mediada con metaloproteinasas de la miostatina latente. Al contrario, cuando se detecta una cantidad reducida de un producto de la escisión del propéptido en presencia del agente del ensayo (o después de la puesta en contacto con el mismo), en comparación con una cantidad del producto de la escisión en ausencia del agente del ensayo, el agente del ensayo se identifica como un agente que puede disminuir la activación mediada

con metaloproteinasas de la miostatina latente. Cuando se detecta una cantidad mayor de propéptido en presencia del agente del ensayo (o después de la puesta en contacto con el mismo), en comparación con una cantidad de propéptido en ausencia del agente del ensayo, el agente del ensayo se identifica como un agente que puede disminuir la activación mediada con metaloproteinasas de la miostatina latente. Dicha actividad se puede confirmar empleando un ensayo en animales o basado en células, detectando por ejemplo, un cambio en la actividad transductora de la señal mediada con miostatina que es debido al agente.

Una diferencia en la cantidad de escisión del propéptido también se puede detectar detectando un cambio en la unión de la miostatina con un receptor de la miostatina, o detectando un cambio en la transducción de una señal mediada con miostatina en una célula que expresa un receptor de miostatina. Las células útiles para realizar un ensayo de detección de la invención incluyen, por ejemplo, células de mamíferos, aves, peces, levadura o de *Drosophila*. Tales ensayos funcionales pueden indicar directamente que un agente del ensayo modula la activación de la miostatina mediada con metaloproteinasas. Una célula útil para un método tal, puede ser una que exprese un receptor endógeno de la miostatina, por ejemplo, miocitos L6 o puede ser una célula modificada genéticamente de forma transitoria o estable, para expresar un transgén que codifica el receptor de la miostatina, por ejemplo, un receptor de activina tal como un receptor de activina de tipo II (Thies y col., citado anteriormente, 2001). La transducción de la señal mediada con miostatina se puede detectar a cualquier nivel en la ruta de transducción de la señal, incluyendo desde la unión de la miostatina con un receptor de la superficie celular, hasta la expresión de un gen que está regulado con miostatina, el cual en un ensayo de detección de la invención, depende de la escisión mediada con metaloproteinasas de un propéptido de miostatina y de la activación de la miostatina.

La activación de la miostatina mediada con metaloproteinasas y la transducción posterior de la señal mediada con miostatina, se puede detectar midiendo la unión de la miostatina a un receptor de miostatina, empleando un ensayo de unión a un receptor, el cual puede ser un ensayo *in vitro* o un ensayo basado en células. La activación de la miostatina mediada con metaloproteinasas y la transducción posterior de la señal mediada con miostatina también se puede detectar midiendo la expresión de un gen regulado con miostatina, el cual puede ser un gen informador que comprende, por ejemplo, un elemento regulador de TGF- $\beta$  ligado funcionalmente a un polinucleótido que codifica una marca detectable. La expresión del gen informador se puede detectar, por ejemplo, detectando un transcrito de ARN de la secuencia del gen informador, o detectando un polipéptido codificado por el gen informador o una actividad del polipéptido codificado. Un informador polipeptídico puede ser, por ejemplo,  $\beta$ -lactamasa, acetil-transferasa de cloroanfenicol, desaminasa de adenosina, fosfotransferasa de aminoglicósido, reductasa de dihidrofolato, fosfotransferasa de higromicina B, quinasa de timidina,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa o fosforribosiltransferasa de xantina guanina, y se puede detectar, por ejemplo, detectando la radiactividad, la luminiscencia, la quimioluminiscencia, la fluorescencia, la actividad enzimática o la unión específica debido al polipéptido informador, o la supervivencia en un medio selectivo de las células que expresan el polipéptido informador. Los métodos para introducir un transgén, tal como un polinucleótido que codifica un receptor de miostatina o un gen informador, bajo condiciones tales que se pueda expresar un polipéptido codificado por el transgén, se describen en esta memoria o se conocen de otro modo en la técnica.

Generalmente, un gen informador incluye una secuencia codificadora que codifica el polinucleótido o el polipéptido informador, o que está ligada funcionalmente a uno o a varios elementos de la transcripción y, si es adecuado, de elementos reguladores de la traducción y puede estar contenida en un vector, particularmente en un vector de expresión. Si se desea, la secuencia codificadora puede codificar adicionalmente un marcador peptídico ligado funcionalmente, tal como un marcador His-6, el cual se puede detectar empleando un catión divalente tal como ión níquel, ión cobalto o similares; un epítipo FLAG que se puede detectar empleando un anticuerpo anti-FLAG (véase, por ejemplo, Hopp y col., *BioTechnology* 6:1204, 1988; documento de patente de EE.UU. n.º 5.011.912); un epítipo c-myc que se puede detectar empleando un anticuerpo específico del epítipo; biotina, que se puede detectar empleando estreptavidina o avidina; S-transferasa de glutatión, que se puede detectar empleando glutatión; o un dominio Fc de un anticuerpo, que se puede detectar empleando Proteína A o un anticuerpo anti-Fc, cualquiera de los cuales se puede marcar de forma detectable, sin ser necesario, o estar fijado a un soporte sólido o, a su vez, se puede detectar empleando un segundo anticuerpo. De este modo, se reconoce que diversos medios para detectar una molécula marcada particular también se pueden utilizar para aislar la molécula marcada.

Tal y como se emplea en esta memoria, la expresión “ligado funcionalmente” significa que dos o más moléculas están situadas una en relación con la otra, de tal modo que actúan como una sola unidad y tienen una función atribuible a una o a ambas moléculas o a una combinación de las mismas. Por ejemplo, una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido informador, puede estar ligada funcionalmente a un elemento regulador, en dicho caso el elemento regulador confiere su efecto regulador sobre el polinucleótido de forma similar al modo en el que el elemento regulador afectaría a una secuencia polinucleotídica con la que está asociado normalmente en una célula. Una primera secuencia codificadora de polinucleótido también puede estar ligada funcionalmente a una segunda secuencia (o más) codificadora de modo que un polipéptido quimérico se puede expresar desde las secuencias codificadoras ligadas funcionalmente. El polipéptido quimérico puede ser un polipéptido de fusión en el que dos (o más) péptidos codificados se traducen en un único polipéptido (véase, p. ej., el Ejemplo 4), es decir, están unidos covalentemente a través de un enlace peptídico; o se pueden traducir como dos péptidos discretos que después de la traducción, se pueden asociar entre sí para formar un complejo estable.

Un polinucleótido tal como un gen informador puede estar contenido en un vector, el cual puede facilitar la manipulación del polinucleótido, incluyendo la introducción del polinucleótido en una célula diana. El vector puede ser un

vector de clonación, el cual es útil para mantener el polinucleótido, o puede ser un vector de expresión que contiene, además del polinucleótido, elementos reguladores útiles para expresar el polinucleótido y, si el polinucleótido codifica un polipéptido, para expresar el péptido codificado en una célula particular. Un vector de expresión puede contener los elementos de expresión necesarios para, por ejemplo, conseguir una transcripción sostenida del polinucleótido codificante, o los elementos reguladores se pueden ligar funcionalmente al polinucleótido antes de ser clonados en el vector.

Un vector de expresión (o el polinucleótido) contiene generalmente o codifica una secuencia promotora que puede proporcionar una expresión específica constitutiva o si se desea, específica del tejido, o específica de la etapa de desarrollo, del polinucleótido codificante, una secuencia de reconocimiento poli A y un sitio de reconocimiento de ribosomas o un sitio interno de entrada en ribosomas, u otros elementos reguladores, tales como un potenciador, que puede ser específico del tejido. El vector también puede contener elementos necesarios para la replicación en un sistema hospedador procariontico o eucariótico, o en ambos, si se desea. Tales vectores que incluyen vectores plasmídicos y vectores víricos tales como bacteriófagos, baculovirus, retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus vaccinia, virus del bosque Semliki y vectores víricos adenoasociados, son bien conocidos y se pueden adquirir a partir de una fuente comercial (Promega, Madison WI; Stratagene, La Jolla CA; GIBCO/BRL, Gaithersburg MD) o pueden ser construidos por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, *Meth. Enzymol.* Vol. 185, Goeddel, compilador (Academic Press, Inc., 1990); Jolly, *Canc. Gene Ther.* 1:51-64, 1994; Flotte, *J. Bioenerg. Biomemb.* 25:37-42, 1993; Kirshenbaum y col., *J. Clin. Invest.* 92:381-387, 1993).

Un polinucleótido que codifica un polipéptido informador puede estar ligado funcionalmente, por ejemplo, a un elemento regulador específico de tejido, por ejemplo, un elemento regulador específico de células musculares, en donde la expresión del polipéptido informador está restringida a las células musculares en un individuo, o a las células musculares en una población mixta de células en cultivo, por ejemplo, un cultivo de órganos. Los elementos reguladores específicos de células musculares incluyen, por ejemplo, el promotor de la quinasa de creatina muscular (Sternberg y col., *Mol. Cell. Biol.* 8:2896-2909, 1988) y el promotor/potenciador de la cadena ligera de la miosina (Donoghue y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5847-5851, 1991).

Los vectores de expresión vírica pueden ser particularmente útiles para introducir un polinucleótido en una célula, incluyendo si se desea, en una célula en un individuo. Los vectores víricos proporcionan la ventaja de que pueden infectar células hospedadoras con una eficacia relativamente elevada y pueden infectar tipos de células específicas. Los vectores víricos se han desarrollado para emplear en sistemas particulares de hospedador, particularmente en sistemas de mamíferos e incluyen, por ejemplo, vectores retrovíricos o vectores de lentivirus, tales como los que se basan en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de herpesvirus, vectores del virus vaccinia y similares (véase, Miller y Rosman, *BioTechniques* 7:980-990, 1992; Anderson y col., *Nature* 392:25-30 supl. 1998; Verma y Somia, *Nature* 389:239-242, 1997; Wilson, *New Engl. J. Med.* 334:1185-1187, 1996).

Un polinucleótido tal como un gen informador o un agente de polinucleótido, que puede estar contenido en un vector, se puede introducir en una célula según cualquiera entre una variedad de métodos (Sambrook y col., *Molecular Cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989); Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, MD 1987 y los suplementos hasta 1995). Tales métodos incluyen, por ejemplo, la transfección, la lipofección, la microinyección, los métodos biolísticos, la electroporación y, con vectores víricos, la infección; y pueden incluir el uso de liposomas, microemulsiones o similares que pueden facilitar la introducción del polinucleótido en la célula y pueden proteger al polinucleótido de la degradación antes de su introducción en la célula. La selección de un método particular dependerá, por ejemplo, de la célula en la que se va a introducir el polinucleótido, así como si la célula se aísla en cultivo o es un tejido o un órgano en cultivo o *in situ*.

Cuando se identifica un agente del ensayo que tiene actividad moduladora de la miostatina, el ensayo de detección puede incluir adicionalmente una etapa para determinar una cantidad con la que el agente incrementa o disminuye la activación de la miostatina. Por ejemplo, cuando se identifica un agente que incrementa la actividad proteolítica de la metaloproteinasas para el propéptido de la miostatina, por encima de un nivel basal de actividad, en un sistema particular, por ejemplo, en un ensayo *in vitro* empleando reactivos purificados, el método puede incluir adicionalmente la determinación de una cantidad con la que el agente incrementa la activación de la miostatina por encima del nivel basal. De esta manera, se pueden obtener distintos agentes o cuadros de agentes que incrementan o disminuyen la activación de la miostatina a través de una metaloproteinasas, en una cantidad relativamente definida. Dicho método proporciona adicionalmente unos medios para determinar cantidades de un agente particular útil para proporcionar un nivel deseado de actividad de miostatina. De este modo, la presente invención proporciona agentes y cuadros de agentes que modulan la activación de la miostatina mediada con metaloproteinasas, siendo dichos agentes útiles como medicamentos para modular la activación de la miostatina en un individuo, por ejemplo, en un individuo que tiene un trastorno metabólico, tal como distrofia muscular, desgaste muscular, obesidad o diabetes de tipo 2.

Por tanto, la invención proporciona un método *in vitro* para disminuir la activación de la miostatina mediada con metaloproteinasas, tal y como se ha descrito anteriormente. Tal y como se emplea en esta memoria, el término "modular" cuando se emplea haciendo referencia a un efecto sobre la escisión mediada con metaloproteinasas de un propéptido de miostatina o a la activación de la miostatina mediada con metaloproteinasas, significa que la cantidad de propéptido escindido o de activación de la miostatina se incrementa o se reduce o inhibe. Las expresiones "incrementar" y "reducir o inhibir" se emplean haciendo referencia al efecto de un agente sobre un nivel base de escisión del propéptido.

tido de miostatina mediada con metaloproteinasa o de activación de la miostatina. El nivel base de actividad puede ser un nivel de escisión o de activación que se identifica como el que tiene lugar en un ensayo *in vitro*, empleando propéptido y metaloproteinasa purificados bajo condiciones definidas, o empleando una muestra biológica, tal como una célula o un extracto de tejido obtenido a partir de un individuo que puede ser o no, un individuo normal sano; o un nivel de escisión o de activación que tiene lugar en un individuo *in vivo*. La expresión “reducir o inhibir” se emplea conjuntamente en esta memoria debido a que se reconoce que en algunos casos, el nivel de escisión del propéptido de miostatina mediada con metaloproteinasa o de activación de la miostatina se puede reducir por debajo de un nivel que se puede detectar en un ensayo particular. De este modo, puede no ser determinable el uso de un ensayo tal en cuanto a que quede, por ejemplo, un nivel bajo de escisión del propéptido de miostatina o en cuanto a que se inhiba completamente dicha escisión.

Un método para disminuir la escisión del propéptido de miostatina mediada con metaloproteinasa o la activación de la miostatina de acuerdo con la invención, se puede realizar poniendo en contacto un complejo de miostatina latente, que incluye un propéptido de miostatina y un fragmento C-terminal de miostatina, particularmente un dímero del fragmento C-terminal, con una metaloproteinasa que puede escindir el propéptido de miostatina y que es un miembro de la familia BMP-1/TLD, con un agente seleccionado entre las SEQ ID NOs: 11, 14, 17, 20 y 23 que puede disminuir la escisión proteolítica del propéptido mediada con metaloproteinasa.

El agente puede actuar de cualquier modo para disminuir la escisión mediada con metaloproteinasa del propéptido de miostatina, incluyendo por ejemplo, disminuyendo la actividad proteolítica de la metaloproteinasa, compitiendo con el propéptido por la metaloproteinasa, facilitando el contacto de la metaloproteinasa y un complejo de miostatina latente que comprende el propéptido, o induciendo un cambio conformacional en el complejo de miostatina latente, de modo que sea un sustrato menos adecuado (o más adecuado) para la metaloproteinasa.

Un método para disminuir la actividad de la miostatina mediada con metaloproteinasa se puede realizar *in vitro* o *ex vivo*, empleando células o un tejido en cultivo, una célula o un extracto de tejido, un fluido biológico tal como una muestra de suero o de plasma, o reactivos sustancialmente purificados que incluyen metaloproteinasa sustancialmente purificada y/o complejo de miostatina latente (véase, por ejemplo, Thies y col., citado anteriormente, 2001). Cuando el método se realiza *in vitro*, el agente se puede poner en contacto con la muestra que comprende la metaloproteinasa y el complejo de miostatina latente, añadiendo el agente a la muestra, que generalmente está en un medio de cultivo o en otra solución tamponada. Por ejemplo, cuando el método se realiza empleando células en cultivo, el agente se puede añadir al medio de cultivo de modo que se ponga en contacto con la metaloproteinasa y/o el propéptido, pudiendo estar presente uno o ambos en las células en el cultivo o secretado en el medio. El agente se puede seleccionar de forma que sea soluble en el medio de la muestra, o se puede formular para que incremente la solubilidad, si se desea.

Un método para modular la activación de la miostatina también se puede realizar *in vivo*, incluyendo en un individuo vivo, que incluye en relación con las células o un tejido *in situ* en un individuo.

Por tanto, la presente invención proporciona un agente del segundo aspecto. En general, el agente se administra a un individuo, por lo que el agente se formula generalmente en una composición adecuada para la administración al individuo. De este modo, se proporcionan composiciones que contienen un agente que puede disminuir la activación de la miostatina mediada con metaloproteinasa, incluyendo tales composiciones el agente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones son útiles como medicamentos para tratar a un individuo que padece un trastorno muscular y/o metabólico, tal y como se ha descrito en esta memoria, y son útiles para administrar a animales tales como animales empleados en laboratorio o como productos alimentarios.

El individuo puede ser cualquier individuo que exprese miostatina, incluyendo vertebrados e invertebrados. Por ejemplo, el individuo puede ser un ser humano, un ratón, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un perro, un gato, un pollo, un pavo, un pez cebra, un salmón, un pez de aleta, otros organismos acuáticos y otras especies. Ejemplos de organismos acuáticos incluyen los que pertenecen a la clase *Piscina*, tales como trucha, trucha de escamas pequeñas, ayu, carpa, carpa cruzada, peces dorados, gobio, morralla, anguila, congrio, sardina, pez volador, róbalo, brema de mar, pez papagayo, pez mordedor, caballa, sarda, atún, bonito, cola amarilla, perca, platija, lenguado, rodaballo, pez globo, pez ballesta; los pertenecientes a la clase *Cephalopoda*, tales como calamar, jibia, pulpo; los pertenecientes a la clase *Pelecypoda*, tales como almejas (p. ej., de concha dura, Manila, Quahog, Surf, de concha blanda); coquinas, mejillones, bígaros; conchas (p. ej., de mar, bahía, cayo); caracol, babosas, cohombros de mar; concha de arca; ostiones (p. ej., *C. virginica*, del Golfo, Nueva Zelanda, del Pacífico); los pertenecientes a la clase *Gastropoda*, tales como concha de turbante, abulón (p. ej., verde, rosado, rojo); y los pertenecientes a la clase *Crustacea* tales como langosta, incluyendo pero sin estar limitado a los mismos, espinosa, de roca y americana; langostino; camarón, incluyendo pero sin estar limitado a los mismos, *M. rosenbergii*, *P. syllrolls*, *P. indicus*, *P. japonicus*, *P. monodon*, *P. vanemel*, *M. ensis*, *S. melanthero*, *N. norvegicus*, camarón de agua fría; cangrejo, incluyendo pero sin estar limitado a los mismos, Azul, grajo, piedra, rey, reina, nieve, castaño, sin desechos, Jonah, Mangrove, de concha blanda; esquila, krill, langostinos; cangrejo de río, incluyendo pero sin estar limitado a Azul, Marrón, de Tenaza Roja, de Pantano Rojo, de Concha Blanda, blanco; *Annelida*; *Chordata*, incluyendo pero sin estar limitado a los mismos, reptiles, tales como lagartos y tortugas; *Amphibia* incluyendo ranas; y *Echinodermata* incluyendo pero sin estar limitado a los erizos.

Una composición para administrar a un individuo vivo incluye generalmente el agente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas tales como agua o solución salina tamponada fisiológicamente u otros disolventes o ve-

hículos tales como glicoles, glicerol, aceites tales como aceite de oliva o ésteres orgánicos inyectables. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede contener compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar o incrementar la absorción del agente. Tales compuestos fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizantes o excipientes. Un experto en la técnica sabrá que la elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable, que incluye un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de las características físico-químicas del agente que se va a administrar, y de la vía de administración de la composición, que puede ser por ejemplo, por vía oral o parenteral, tal como intravenosa, y mediante inyección, intubación u otro método tal conocido en la técnica. La composición también puede contener uno o varios reactivos adicionales que incluyen, por ejemplo, nutrientes o vitaminas o, cuando la composición se administra con un fin terapéutico, un reactivo para diagnóstico o un agente terapéutico adecuado para el trastorno que se va a tratar.

El agente se puede incorporar dentro de un material encapsulante tal como en una emulsión de aceite-en-agua, microemulsión, micela, micela mixta, liposoma, microesfera u otra matriz polímera (véase, por ejemplo, Gregoriadis, *Liposome Technology* vol. 1 (CRC Press, Boca Raton, FL 1984); Fraley y col., *Trends Biochem. Sci.* 6:77 (1981)). Los liposomas, por ejemplo, que constan de fosfolípidos u otros lípidos, no son tóxicos, los vehículos fisiológicamente aceptables y metabolizables son relativamente fáciles de preparar y de administrar. Los liposomas “encubiertos” (véanse, por ejemplo, los documentos de patente de EE.UU. n° 5.882.679; 5.395, 619 y 5.225.212) son un ejemplo de tales materiales encapsulantes particularmente útiles para preparar una composición útil para poner en práctica un método de la invención, y otros liposomas “enmascarados” se pueden utilizar de forma similar, los cuales prolongan el tiempo durante el cual el agente terapéutico permanece en circulación. Los liposomas catiónicos, por ejemplo, también se pueden modificar con receptores o ligandos específicos (Morishita y col., *J. Clin. Invest.* 91:2580-2585 (1993)).

La vía de administración de una composición farmacéutica que contiene un agente que modula la activación de la miostatina mediada con metaloproteinasas, dependerá en parte de la estructura química de la molécula. Los polipéptidos y polinucleótidos, por ejemplo, no son particularmente útiles cuando se administran oralmente debido a que se pueden degradar en el tracto digestivo. Sin embargo, se conocen bien los métodos para modificar químicamente polipéptidos, por ejemplo, para volverlos menos susceptibles a la degradación con proteasas endógenas o más absorbibles a través del tracto digestivo (véase, por ejemplo, Blondelle y col., citado anteriormente, 1995; Ecker y Crook, citado anteriormente, 1995). Además, un agente peptídico se puede preparar empleando D-aminoácidos, o puede contener uno o varios dominios basados en peptidomiméticos, que son moléculas orgánicas que mimetizan las estructuras de los dominios peptídicos; o estar basado en un peptoide tal como un peptoide vinílogo.

Una composición tal y como se describe en esta memoria se puede administrar a un individuo por diversas vías que incluyen, por ejemplo, la vía oral o parenteral, tal como intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraorbital, intracapsular, intraperitoneal, intrarrectal, intracisternal, o mediante absorción pasiva o facilitada a través de la piel empleando, por ejemplo, un parche para la piel o la iontoforesis transdérmica, respectivamente. Además, la composición se puede administrar mediante inyección, intubación, oral o tópicamente, pudiendo ser esta última pasiva, por ejemplo, mediante aplicación directa de una pomada, o activa, por ejemplo, empleando un vaporizador o un inhalador nasal, en cuyo caso un componente de la composición es un propulsor adecuado.

La composición farmacéutica se puede formular como una formulación oral, tal como un comprimido, o una forma de solución o de suspensión; o puede comprender una mezcla por adición de un vehículo o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para aplicaciones enterales o parenterales, y puede estar compuesto, por ejemplo, por los vehículos farmacéuticamente aceptables normales, no tóxicos para comprimidos, perlas, cápsulas, supositorios, soluciones, emulsiones, suspensiones u otras adecuadas para el uso. Los vehículos, además de los descritos anteriormente, pueden incluir glucosa, lactosa, manosa, goma de acacia, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea, triglicéridos con longitud de cadena media, dextranos y otros vehículos adecuados para el uso en la elaboración de preparaciones, en forma sólida, semisólida o líquida. Además, se pueden emplear agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes o colorantes y perfumes, por ejemplo, un agente estabilizante seco, tal como la triulosa (véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. n° 5.314.695).

La cantidad total de un agente que se va a administrar al poner en práctica la invención, se puede administrar a un individuo en forma de una sola dosis, tanto como un bolo como por infusión durante un periodo de tiempo relativamente corto, o se puede administrar usando un protocolo de tratamiento fraccionado, en el cual se administran múltiples dosis durante un periodo de tiempo prolongado. Se reconocerá que la cantidad de composición farmacéutica, por ejemplo, para tratar la obesidad en un individuo, depende de muchos factores que incluyen la edad y la salud general del individuo, así como de la vía de administración y del número de tratamientos que se van a administrar. De cara a estos factores, el experto en la técnica ajustará la dosis particular según sea necesario. En general, la formulación de la composición y las vías y la frecuencia de la administración se determina, inicialmente, empleando pruebas clínicas en fase I y en fase II.

Se puede emplear un método de la invención para disminuir el nivel de activación de la miostatina (por debajo de un nivel base), por ejemplo, poniendo en contacto un complejo de miostatina latente y/o metaloproteinasas, con un agente que disminuye la actividad proteolítica mediada con la metaloproteinasas del propéptido de miostatina, tal y como se define en las reivindicaciones. El agente puede ser uno que disminuye la actividad proteolítica de una metaloproteinasas que escinde el propéptido de miostatina de un complejo de miostatina latente, reduciendo o inhibiendo de este modo la activación de la miostatina por debajo de un nivel de activación de miostatina que tiene lugar o podría tener lugar en

ausencia del agente. Cuando se administra un agente tal a un individuo, el agente puede producir como resultado una masa muscular incrementada o un contenido en grasas disminuido, o ambos en el individuo. Por ejemplo, el individuo puede ser una persona humana que padece un trastorno de desgaste muscular en donde un incremento de la masa muscular puede mejorar las señales y los síntomas del trastorno.

5 Por tanto, en esta memoria se describe un método para incrementar la masa muscular o reducir el contenido en grasas, o ambos, de un individuo, mediante la modulación de la escisión proteolítica de un propéptido de miostatina a través de una metaloproteinasas, tal como una metaloproteinasas de la familia BMP-1/TLD. Un método tal se puede llevar a cabo, por ejemplo, administrando al individuo un agente que reduce o inhibe la actividad proteolítica de una proteasa que escinde el propéptido de miostatina, evitando de este modo la activación de la miostatina latente e incrementando la masa muscular en el individuo. El individuo en el que se va a incrementar la masa muscular puede ser cualquier individuo en el que se exprese la miostatina, particularmente un organismo vertebrado que incluye animales domésticos (p. ej., especies felinas o caninas), animales de granja o animales que son criados como fuente de alimentos, que incluyen especies de mamíferos (p. ej., especie ovina, porcina o bovina), especies aviares (p. ej., pollos o pavos), y especies piscícolas (p. ej., salmón, trucha o bacalao). Por ejemplo, cuando un método tal se realiza sobre un organismo que es útil como fuente de alimento, el contenido en proteínas del alimento se puede incrementar, el nivel de colesterol se puede disminuir y la calidad del alimento se puede mejorar. De este modo, se puede realizar un método tal sobre cualquier organismo eucariótico que exprese miostatina y se base en la escisión del propéptido de miostatina mediada con metaloproteinasas, para activar la miostatina, incluyendo un organismo vertebrado, por ejemplo, un organismo mamífero, aviar o piscícola, o un organismo invertebrado, por ejemplo, un molusco, un equinodermo, un gasterópodo o un cefalópodo. El individuo puede ser un ser humano, por ejemplo, una persona que padece un trastorno metabólico tal como una enfermedad muscular (p. ej., una distonía o distrofia), un trastorno de desgaste (p. ej., caquexia), obesidad clínica o diabetes de tipo 2.

25 Como tal, en esta memoria se describe un método para aliviar un trastorno metabólico en un individuo, administrando un agente que modula la activación de miostatina mediada con una metaloproteinasas en el individuo. Tal y como se emplea en esta memoria, el término “aliviar” cuando se emplea en relación con un trastorno metabólico, significa que las señales o los síntomas asociados con el trastorno, se han reducido. El alivio del trastorno se puede identificar empleando cualquier ensayo empleado generalmente por el técnico clínico para vigilar el trastorno metabólico particular, por ejemplo, una prueba de tolerancia a la glucosa para vigilar la diabetes, o un ensayo de leptina en suero para el análisis de la grasa corporal (McPherron y Lee, citado anteriormente, 2002). El alivio de un trastorno metabólico tal como la obesidad o la caquexia se puede vigilar simplemente midiendo el peso corporal del individuo.

35 Ratones heterocigotos exentos del gen de la miostatina tienen una masa de músculo esquelético incrementada, aunque en menor medida que la observada en ratones homocigotos mutantes, lo que indica que la miostatina actúa en una forma dependiente de la dosis *in vivo*. Además, la hiperexpresión de miostatina en animales tiene el efecto opuesto en relación con el crecimiento muscular. Por ejemplo, ratones sin sistema inmune que son portadores de tumores que expresan miostatina, desarrollaron un síndrome de desgaste caracterizado por una pérdida excepcional de músculo y de peso en grasas, y aparentando caquexia, tal y como ocurre en pacientes con enfermedades crónicas tales como el cáncer y el SIDA. Además, los niveles en suero de material inmunorreactivo con miostatina se han correlacionado con el estado de los pacientes en relación con el desgaste muscular (Gonzalez-Kadavid y col., citado anteriormente, 1998). Por tanto, los pacientes con SIDA que también mostraban señales de caquexia que se medían por la pérdida de peso corporal total, tenían niveles de material inmunorreactivo con miostatina en el suero ligeramente incrementados, comparados con machos normales sin SIDA o con pacientes con SIDA que no tenían pérdida de peso. La miostatina no sólo afecta a la masa muscular, sino que también afecta al metabolismo global de un organismo. Por ejemplo, la miostatina se expresa en el tejido adiposo y ratones deficientes en miostatina tienen una reducción excepcional de la acumulación de grasa al envejecer los animales. El efecto anabólico global sobre el tejido muscular que se produce como respuesta a una actividad disminuida de la miostatina, puede alterar el metabolismo global del organismo y afectar al almacenamiento de energía en forma de grasa, tal y como se muestra con la introducción de una mutación en la miostatina en una cepa de ratones obesos (ratones letales amarillos agouti ( $A^y$ )), que inhibe cinco veces la acumulación de grasa. Un metabolismo anormal de la glucosa también se inhibió parcialmente en ratones agouti que contenían la mutación en la miostatina.

55 De este modo, se pueden emplear los agentes y los métodos de la presente invención que reducen o inhiben la activación de la miostatina mediada con metaloproteinasas, para tratar o evitar enfermedades metabólicas tales como la obesidad y la diabetes de tipo 2. La invención es útil por ejemplo, para aliviar diversos trastornos metabólicos, que incluyen por ejemplo, la caquexia asociada a enfermedades crónicas tales como el cáncer (véase, Norton y col., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 7:289-327, 1987), así como estados tales como la diabetes de tipo 2, y otros trastornos metabólicos. Tal y como se emplea en esta memoria, la expresión “trastorno metabólico” se refiere a un estado que se caracteriza, al menos en parte, por una cantidad, un desarrollo o una actividad metabólica anormales del músculo y/o del tejido adiposo. Tales trastornos metabólicos incluyen, por ejemplo, la obesidad, trastornos de desgaste muscular tales como la distrofia muscular, enfermedades neuromusculares, caquexia y anorexia; y trastornos tales como la diabetes de tipo 2 que generalmente está asociada con la obesidad, pero no necesariamente. El término “anormal”, cuando se usa haciendo referencia a la cantidad, al desarrollo o a la actividad metabólica del músculo y/o del tejido adiposo, se emplea en un sentido relativo en comparación con una cantidad, un desarrollo o una actividad metabólica que un experto en medicina u otro experto en la técnica reconocería como normal o ideal. Tales valores normales o ideales son conocidos por el médico y se basan en valores promedio observados o deseados generalmente en un individuo sano en una población correspondiente. Por ejemplo, el médico sabría que la obesidad está asociada con un peso corporal

## ES 2 344 734 T3

que es aproximadamente veinte por ciento superior al intervalo de peso “ideal” de una persona con una estatura y un tipo de cuerpo particulares. Sin embargo, el médico reconocerá que un culturista no es necesariamente obeso simplemente por tener un peso corporal que es un 20% o más superior al peso esperado para una persona de la misma estatura y con el mismo tipo de cuerpo, en una población correspondiente. De forma similar, el experto reconocerá que un paciente que está presentando lo que parece ser una actividad muscular reducida de forma anormal, puede ser identificado como que tiene un desarrollo muscular anormal, por ejemplo, sometiendo al paciente a diversas pruebas de resistencia y comparando los resultados con los esperados para un individuo sano promedio, en una población correspondiente.

Un método para aliviar un trastorno metabólico en un individuo se puede realizar, por ejemplo, administrando al individuo un agente que reduce o inhibe la actividad proteolítica de una proteasa que escinde el propéptido de miostatina, evitando de este modo la activación de la miostatina latente en la célula y aliviando el trastorno metabólico. Tal y como se ha indicado anteriormente, el trastorno metabólico puede ser cualquier trastorno asociado con una activación o actividad de la miostatina indeseablemente elevada o incrementada, que incluye, por ejemplo, un trastorno de desgaste muscular, tal y como se asocia con la distrofia muscular, la caquexia (p. ej., asociada con un cáncer o la enfermedad de inmunodeficiencia adquirida), o la sarcopenia; o un trastorno metabólico, tal como la obesidad clínica o la diabetes de tipo 2. A modo de ejemplo, la sarcopenia es un trastorno metabólico que se caracteriza por la pérdida de masa, de calidad y de resistencia del músculo esquelético, y puede conducir a debilidad en personas ancianas. Ejemplos de propiedades del músculo esquelético que contribuyen a su calidad global incluyen la capacidad de contracción, el tamaño y el tipo de fibras, y la absorción de glucosa y el metabolismo de la glucosa. La sarcopenia tiene importantes consecuencias debido a que la pérdida de masa muscular reduce la función y debido a que una pérdida de aproximadamente el 40% de masa muscular, generalmente es fatal.

Las realizaciones de la invención proporcionan unos medios para aliviar la sarcopenia reduciendo o inhibiendo la activación de la miostatina mediada con metaloproteinasas, permitiendo de este modo un crecimiento y un desarrollo muscular incrementados en el individuo.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar pero no a limitar la invención.

### Ejemplo 1

*Miembros de la familia de metaloproteinasas BMP-1/TLD escinden el propéptido de miostatina*

Este ejemplo muestra que los miembros de la familia metaloproteinasas de proteínas morfogenéticas óseas 1/toloides (BMP-1/TLD), escinden el propéptido de miostatina.

Se incubaron 500 ng de propéptido de miostatina purificado o del complejo de miostatina latente purificado, que comprendía el propéptido y el dímero C-terminal (Lee y McPherron, citado anteriormente, 2001), durante una noche a 37°C con 100 ng de BMP-1, mTLD, mTLL-1 o mTLL-2 (Scott y col., *Devel. Biol.* 213:283-300, 1999). Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfatosódico (SDS-PAGE) seguido de análisis mediante transferencia de tipo Western, empleando antisuero producido contra el propéptido de la miostatina (Lee y McPherron, citado anteriormente, 2001).

Un producto discreto de la escisión proteolítica del propéptido se detectó en cada una de las reacciones que contenían una de las cuatro proteasas, pero no en las reacciones con testigo que no contenían una proteasa. Además, cada una de las proteasas escindía el propéptido, ya fuera en forma purificada como en un complejo con el dímero C-terminal de miostatina. Estos resultados muestran que las metaloproteinasas BMP-1/TLD escinden el propéptido de miostatina.

### Ejemplo 2

*La escisión con metaloproteinasa del propéptido de miostatina activa la miostatina latente*

Este ejemplo muestra que la escisión del propéptido de miostatina con una metaloproteinasa BMP-1/TLD activa la miostatina latente.

Se incubó el propéptido de miostatina purificado y el complejo del dímero C-terminal con mTLL-1, a continuación se examinó empleando un ensayo con un gen informador que detecta específicamente la actividad miostatina. Células A204 de rhabdomyosarcoma se transfectaron con la estructura artificial del gen informador de luciferasa pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>, que comprende la secuencia codificadora de luciferasa ligada a la secuencia CAGA que responde a TGF- $\beta$ , procedente del promotor del gen PAI-1 inducible con TFG- $\beta$  (Thies y col., citado anteriormente, 2001). Las células transfectadas se pusieron en contacto con el complejo de propéptido/dímero C-terminal sin tratar o con el complejo que se había incubado previamente con mTLL-1. La incubación del complejo con mTLL-1 incrementaba notoriamente la cantidad de actividad luciferasa detectada en el ensayo con el gen informador, mientras que no se observó ningún cambio en las células tratadas con mTLL-1 solo o con el complejo de miostatina solo (Figura 1).

## ES 2 344 734 T3

Para determinar el grado de la activación de la miostatina con mTLL-1, se generó una curva patrón empleando el dímero C-terminal de miostatina purificada en el ensayo con el gen informador (Figura 2), después se comparó la cantidad de actividad luciferasa en las células tratadas con el complejo tratado con mTLL-1, con la curva patrón. Una comparación de la cantidad de actividad miostatina presente en la muestra tratada con mTLL-1 y el grado de procesamiento proteolítico del propéptido a través de mTLL-1 en esta muestra, reveló que al menos aproximadamente el 50% del complejo de la miostatina escindido proteolíticamente era activo en el ensayo con el informador. Estos resultados muestran que la escisión del propéptido de miostatina en un complejo del propéptido y el dímero C-terminal de la miostatina mediante la metaloproteínasa BMP-1/TLN, mTLL1, activa la miostatina.

### Ejemplo 3

#### *Sustratos peptídicos para los miembros de la familia toloide*

Una serie de tres péptidos, cada uno de 10, 20, 30, 40 ó 50 residuos de aminoácidos se sintetizó basándose en la secuencia del propéptido de la miostatina, e incluía el sitio de escisión de la metaloproteínasa BMP-1/TLN (los residuos de aminoácidos "RD", tal y como se muestran en negrita a continuación, en los péptidos de tipo silvestre; SEQ ID NOs: 9, 12, 15, 18, y 21). Los péptidos en los que el residuo de arginina en la posición P1 inmediatamente aguas arriba del sitio de escisión, se había cambiado por un residuo de glutamina (SEQ ID NOs: 10, 13, 16, 19 y 22; véase la negrita), y los péptidos en los que el ácido aspártico en la posición P1' inmediatamente aguas abajo del sitio de corte, se había cambiado por una alanina (SEQ ID NOs: 11, 14, 17, 20 y 23; véase la negrita), también se sintetizaron. Las secuencias de los péptidos se muestran a continuación:

#### **50-mero:**

KDVIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQR**DD**SSDGSLEDDDYHATTETIITMPT (SEQ ID NO:9);

KDVIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQ**Q**DDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPT (SEQ ID NO:10); y

KDVIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQR**AD**SSDGSLEDDDYHATTETIITMPT (SEQ ID NO:11).

#### **40-mero:**

QLLPKAPPLRELIDQYDVQR**DD**SSDGSLEDDDYHATTETI (SEQ ID NO:12);

QLLPKAPPLRELIDQYDVQ**Q**DDSSDGSLEDDDYHATTETI (SEQ ID NO:13); y

QLLPKAPPLRELIDQYDVQR**AD**SSDGSLEDDDYHATTETI (SEQ ID NO:14).

#### **30-mero:**

APPLRELIDQYDVQR**DD**SSDGSLEDDDYHA (SEQ ID NO:15);

APPLRELIDQYDVQ**Q**DDSSDGSLEDDDYHA (SEQ ID NO:16); y

APPLRELIDQYDVQR**AD**SSDGSLEDDDYHA (SEQ ID NO:17).

#### **20-mero:**

ELIDQYDVQR**DD**SSDGSLED (SEQ ID NO:18);

ELIDQYDVQ**Q**DDSSDGSLED (SEQ ID NO:19); y

ELIDQYDVQR**AD**SSDGSLED (SEQ ID NO:20).

#### **10-mero:**

YDVQR**DD**SSD (SEQ ID NO:21);

YDVQ**Q**DDSSD (SEQ ID NO:22); y

YDVQR**AD**SSD (SEQ ID NO:23).

## ES 2 344 734 T3

Los péptidos se suministraron como polvo liofilizado y las soluciones de reserva de 1,0 mM se prepararon en 60% de acetonitrilo - 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) y 40% de agua. La actividad de las enzimas sobre los sustratos peptídicos se determinó combinando 70  $\mu$ l de agua, 20  $\mu$ l de medio simulado acondicionado o de medio acondicionado que contenía la proteína de interés, y 10  $\mu$ l del péptido sintético. Las muestras se incubaron durante una noche a temperatura ambiente o a 37°C, después las reacciones se enfriaron rápidamente reduciendo el pH mediante la adición de 1,0  $\mu$ l de 0,1% de TFA. Cada parte alícuota se aplicó a un cartucho de columna de guardia C18 de 2 cm (Supelco) y los péptidos se eluyeron empleando un gradiente de acetonitrilo (0-40% durante 20 minutos) en 0,1% de TFA. Los picos correspondientes a los fragmentos de péptido escindidos, se identificaron y se confirmaron empleando espectrometría de masas. Los péptidos de 40-mero, 30-mero y 20-mero de tipo silvestre y los mutantes R→Q se escindieron con medios acondicionados que contenían TLL-2, mientras que los péptidos que contenían la mutación D→A en la posición P1' no se escindieron; el 50-mero era insoluble en las condiciones empleadas y los productos de la escisión del 10-mero eran difíciles de detectar debido a su pequeño tamaño (es decir, 5-meros).

### 15 Ejemplo 4

#### *Activación de la miostatina latente mediante la familia de metaloproteinasas BMP-1/toloide*

Este ejemplo muestra que los miembros de la familia BMP-1/TLL pueden escindir y activar la miostatina latente.

*Purificación y análisis de la miostatina.* La generación de líneas celulares CHO que hiperexpresan la miostatina ha sido descrita previamente<sup>5,6</sup> (referencias numeradas detalladas al final del Ejemplo 4). Se emplearon estrategias similares para generar líneas de CHO que expresaban formas mutantes de la miostatina humana de longitud completa y las proteínas de fusión propéptido/Fc (véase, el documento de publicación de patente de EE.UU. n° US 2003/0104406 A1). Las secuencias de miostatina de longitud completa humanas y mutantes se basaban en la SEQ ID NO:2, y las secuencias de propéptido mutante se basaban en los residuos de aminoácidos 24 a 266 de SEQ ID NO:2. Los complejos de propéptido de miostatina/dímero C-terminal se purificaron desde el medio acondicionado de las células que expresaban CHO, tal y como se ha descrito<sup>5</sup>. Las proteínas de fusión propéptido/Fc se purificaron empleando una columna de gel de proteína A-Sefarosa. Los anticuerpos dirigidos contra el dominio C-terminal de la miostatina producida bacteriamente y el propéptido eran tal y como se han descrito<sup>1,5</sup>.

*Ensayos con proteinasas y gen informador.* Las proteinasas BMP-1, mTLD, mTLL-1 y mTLL-2 se prepararon tal y como se ha descrito<sup>15</sup>. La actividad de la miostatina se midió empleando el ensayo informador de pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-luciferasa en células A204 de rhabdomyosarcoma, tal y como se ha descrito<sup>6</sup>. Se generó una curva patrón empleando el dímero C-terminal de miostatina purificado, para cada uno de los grupos de ensayos para cuantificar la actividad de la miostatina.

*Inyección en ratones.* Ratones hembra BALB/c (Charles River) que pesaban de 17 g hasta 19 g fueron inyectados intraperitonealmente los días 1, 4, 8, 15 y 22 con PBS solo o con diversas proteínas disueltas en PBS; las dosis de proteínas administradas eran las siguientes: proteínas de fusión propéptido/Fc - 1 mg/kg o 10 mg/kg; IgG2am (anticuerpo testigo) - 10 mg/kg; y JA16 (anticuerpo que neutraliza la miostatina) - 60 mg/kg. Los ratones fueron sacrificados el día 29 para analizar el músculo. Los músculos de ambos lados de cada animal se sometieron a disección y se pesaron; el peso promedio se empleó para cada músculo.

La generación de células de ovarios de hámster chino (CHO) que hiperexpresan la miostatina se ha descrito<sup>5,6</sup>. Como otros miembros de la familia TGF- $\beta$ , la miostatina producida por las células CHO es escindida en un sitio dibásico para generar un propéptido N-terminal y un dímero de fragmentos C-terminales enlazado con disulfuro. En el curso de la caracterización de la secreción de la miostatina a través de estas células, se observó la presencia de un producto de escisión discreto (tal y como se detecta mediante el análisis con transferencia de tipo Western, empleando anticuerpos específicos del propéptido). Este producto de la escisión se detectó en el medio acondicionado de las células CHO transfectadas con estructuras artificiales para la expresión que contenían la proteína precursora de miostatina de longitud completa (no mostrada) o el propéptido de miostatina solo en ausencia del dominio C-terminal (Figura 3A). Debido a que el propéptido de miostatina puede mantener el dímero C-terminal en un estado latente, tanto *in vitro*<sup>5,6</sup> como *in vivo*<sup>7,8</sup>, y debido a que se cree que la escisión proteolítica del propéptido de TFG- $\beta$  es el mecanismo para activar el TFG- $\beta$ <sup>10,14</sup> latente, se investigó una función de la escisión del propéptido de miostatina en la regulación de la latencia de la miostatina.

La secuenciación N-terminal reveló que el producto de la degradación del propéptido detectado en el medio acondicionado de células CHO, era el resultado de la escisión proteolítica entre la arginina 75 y el aspartato 76. Para determinar si alguno de estos residuos de aminoácido era esencial para la escisión proteolítica, se generaron líneas celulares CHO que expresaban versiones mutantes del propéptido, en donde el residuo de arginina o de aspartato se había cambiado a glutamina o a alanina, respectivamente. Para potenciar la estabilidad de estas proteínas para estudios *in vivo* (véase más adelante), los propéptidos mutantes se fusionaron con un dominio Fc. Aunque el cambio de la arginina por glutamina no tenía efecto sobre la escisión proteolítica, no se pudo detectar un producto de la degradación en el medio acondicionado preparado a partir de células CHO, que expresaban la proteína de fusión propéptido mutante de aspartato a alanina/Fc (Figura 3B; véase también el Ejemplo 3). El requerimiento de aspartato en el sitio de la escisión sugería que miembros de la familia de metaloproteinasas BMP-1/TLD eran responsables de la generación de este producto de degradación. Se ha identificado una variedad de sustratos para los miembros mamíferos de la familia

BMP-1/TLD, y casi en cada caso, se ha mostrado que la escisión proteolítica tiene lugar en un sitio inmediatamente N-terminal a un residuo de aspartato<sup>15,16</sup>. Además, los estudios de mutagénesis han documentado la importancia del residuo de aspartato para volver estos sitios susceptibles a la escisión proteolítica<sup>17</sup>. Como no hay informaciones evidentes de otras proteinasas con una especificidad o requerimientos similares hacia un residuo de aspartato justo en un sitio C-terminal al enlace escindible en sustratos proteicos, se investigó la capacidad de miembros de la familia BMP-1/TLD para escindir el propéptido de miostatina *in vitro*.

La miostatina se purificó a partir del medio acondicionado de células CHO hiperproductoras<sup>5</sup>. Después de un fraccionamiento sucesivo sobre un gel de hidroxapatita, Sefarosa, lectina de lenteja, agarosa DEAE y un gel de Sefarosa y heparina, se obtuvo una preparación purificada del complejo de miostatina latente que constaba del propéptido N-terminal unido no covalentemente al dímero C-terminal (Figura 3C). Tal y como se muestra en la Figura 3D, la incubación del complejo latente purificado con BMP-1 purificada, daba como resultado una escisión completa del propéptido para generar un producto aislado con una movilidad electroforética idéntica a la detectada en un medio acondicionado preparado a partir de células CHO, modificadas genéticamente para hiperproducir miostatina. La secuenciación N-terminal del propéptido tratado con BMP-1, confirmó que la escisión tenía lugar en un sitio inmediatamente N-terminal al aspartato 76.

La capacidad de otros miembros mamíferos de la familia BMP-1/TLD, que incluían mTLD, mTLL-1 y mTLL-2 para escindir el propéptido, también se sometió a ensayo. Para estos experimentos se emplearon concentraciones enzimáticas que producían una escisión sólo parcial, permitiendo de este modo una comparación de las actividades relativas de las cuatro enzimas. Tal y como se muestra en la Figura 3E, la incubación del complejo latente con cada una de las cuatro proteinasas daba como resultado la escisión del propéptido. Tres de las proteinasas, BMP-1, mTLL-1 y mTLL-2, eran aproximadamente igual de eficaces cortando el propéptido, mientras que mTLD era consistentemente menos activa que las otras tres, incluso cuando la misma preparación de mTLD era totalmente activa contra sustratos conocidos, tales como procolágeno. Las cuatro proteinasas también escindieron el propéptido que se había purificado lejos del dímero C-terminal.

Para determinar el efecto de la escisión proteolítica del propéptido sobre la latencia de la miostatina, se midió la actividad biológica de la miostatina en complejos latentes tratados con cada una de las cuatro proteinasas. Para este fin, se empleó un ensayo con gen informador en el cual se transfectaron células A204 de rhabdomyosarcoma con la estructura artificial pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-luciferasa y se incubó con miostatina<sup>6</sup>. Tal y como se ha descrito previamente, la adición del dímero C-terminal de miostatina purificada a estas células, daba como resultado un incremento en la actividad de la luciferasa por encima de niveles basales (Figura 4A). Por el contrario, el complejo de miostatina latente purificada era inactivo en este ensayo, pero se podía activar mediante la incubación a 80°C durante 5 minutos (Figura 4B). Tal y como se muestra en la Figura 4C, el complejo latente también se activó mediante pretratamiento con BMP-1. Basándose en la cuantificación de la actividad de la miostatina en relación con una curva patrón, la escisión del propéptido con BMP-1 era aproximadamente tan eficaz como el tratamiento térmico para la activación del complejo latente. El complejo latente también se activó mediante pretratamiento con las otras proteinasas, y el grado de activación se correlacionaba aproximadamente con el grado de escisión proteolítica con estas enzimas (Figura 4D).

El requerimiento de aspartato en el sitio de corte también se examinó. Una línea celular CHO que expresaba niveles elevados de una forma mutante de miostatina, en la que el aspartato 76 se había cambiado por alanina, se generó y el complejo latente se purificó a partir del medio acondicionado de estas células. Tal y como se muestra en la Figura 3C, la mutación no tenía efecto sobre la capacidad del propéptido para unirse al dímero C-terminal; el propéptido mutante y el dímero C-terminal permanecían estrechamente unidos a lo largo de la purificación. Además, el propéptido mutante mantenía el complejo en forma latente que se podía activar mediante calentamiento, tal y como se determinó con el ensayo informador con luciferasa (Figura 4B). Sin embargo, el propéptido mutante en el complejo latente era completamente resistente a la proteólisis con cada una de las cuatro proteinasas, BMP-1, mTLD, mTLL-1 y mTLL-2 (Figuras 3D y E), y era resistente a la activación con estas proteinasas (Figuras 4C y 4D).

Finalmente, se investigó el papel de la escisión proteolítica del propéptido *in vivo*, examinando el efecto de inyectar versiones de tipo silvestre y mutante del propéptido en ratones. Tal y como se ha determinado en experimentos anteriores, la semi-vida del propéptido de tipo silvestre después de inyecciones intraperitoneales en ratones, se podía incrementar desde aproximadamente 2 horas hasta 5 ó 7 días, fusionando el propéptido con un dominio Fc. Por esta razón, se generaron líneas de células CHO que expresaban el propéptido de tipo silvestre o mutante (aspartato 76 a alanina) fusionado con un dominio Fc y las proteínas de fusión se purificaron empleando una columna con gel de Sefarosa y proteína A. La mutación de aspartato a alanina no afectaba a la actividad del propéptido *in vitro*, ya que las proteínas purificadas de fusión de propéptido de tipo silvestre y mutante/Fc eran igualmente eficaces inhibiendo la actividad del dímero C-terminal de la miostatina purificado en el ensayo con el gen informador (Figura 5).

Para determinar las actividades de estas proteínas *in vivo*, se inyectaron semanalmente ratones adultos con las proteínas de fusión purificadas de propéptido de tipo silvestre y mutante/Fc y los ratones se sacrificaron después de cuatro semanas para el análisis de los músculos. A modo de comparación, un grupo de ratones también fue inyectado con el anticuerpo monoclonal neutralizante de miostatina JA16 que produce un incremento de aproximadamente 25-30% de la masa muscular, después de 12 semanas de tratamiento<sup>18</sup>. Tal y como se muestra en la Tabla 1 (a continuación), la inyección de la proteína de fusión de propéptido de tipo silvestre/Fc no tenía efecto sobre la masa muscular en dosis de 1 y 10 mg/kg/semana. Un efecto menor o ninguno se observó de forma similar después de la inyección de la proteína de fusión de propéptido mutante de aspartato a alanina/Fc, en una dosis de 1 mg/kg/semana. Sin embargo, la inyección

## ES 2 344 734 T3

de la proteína de fusión del propéptido mutante/Fc con 10 mg/kg/semana, condujo a un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,0001$ ) de 18-27% del peso del músculo esquelético examinado. Esta envergadura del incremento en los pesos musculares observada con una dosis mayor de la proteína de fusión de propéptido mutante/Fc, era aproximadamente el doble de la observada después de la inyección del anticuerpo monoclonal que neutraliza miostatina JA16, lo que daba como resultado incrementos del peso muscular del 10-16%.

Estos resultados muestran que miembros de la familia BMP-1/TLD de metaloproteinasas escinden el propéptido de miostatina unido al dímero C-terminal y activan el complejo latente. Además, una forma mutante del propéptido que era resistente a la escisión con proteinasas BMP-1/TLD, causaba incrementos en la masa muscular cuando se inyectaba en ratones adultos, probablemente formando complejos latentes incapaces de ser activados por este grupo de proteinasas. Este mecanismo general para regular la actividad del dímero C-terminal se ha descrito para ciertos miembros de la familia de TGF- $\beta$ . En el caso de TGF- $\beta$ , la escisión proteolítica de su propéptido asociado mediante plasmina<sup>10,11</sup> o con metaloproteinasas de la matriz<sup>12-14</sup>, se cree que es un mecanismo para activar la latencia *in vivo*. En el caso de las BMPs, los miembros de la familia BMP-1/TLD parecen tener un papel importante en la regulación de la actividad del dímero C-terminal, escindiendo e inactivando la cordina antagonista de BMP<sup>15,19-22</sup>.

Las cuatro proteinasas de mamífero en la familia de BMP-1/TLD pueden escindir el propéptido de miostatina *in vitro*, y una o varias pueden estar implicadas en la regulación de la actividad de miostatina *in vivo*. A este respecto, mTLL-2, a diferencia de las otras tres proteinasas, se expresa específicamente en el músculo esquelético durante el desarrollo embrionario<sup>15</sup>. La identificación de la proteínasa o proteinasas específicas implicadas en la regulación de la latencia de la miostatina, proporcionará dianas para identificar agentes útiles para modular la masa muscular y permitirá dirigir hacia la diana estas enzimas para el desarrollo de nuevos agentes potenciadores del músculo para aplicaciones terapéuticas humanas y agrícolas.

TABLA 1

	pectorales	tríceps	cuádriceps	gastrocnemios	tibial
PBS (n=10)	82,8±2,8	85,5±1,6	142,0±2,6	95,5±1,5	32,6±0,8
IgG2am (10 mg/kg, n=10)	87,7±1,9	87,8±1,6	148,4±2,3	98,7±2,1	33,8±0,9
tipo silvestre (1 mg/kg, n=10)	84,3±1,6	85,3±1,8	145,7±2,2	96,0±1,4	33,2±0,4
D76A (1 mg/kg, n=9)	89,4±3,5	90,0±2,0	150,7±2,9 <sup>a</sup>	97,7±2,2	34,1±0,6
tipo silvestre (10 mg/kg, n=10)	87,5±3,4	88,5±2,7	147,1±4,0	98,2±2,2	33,3±0,8
D76A (10 mg/kg, n=10)	105,1±1,2 <sup>b,c</sup>	102,1±1,2 <sup>b,d</sup>	175,6±1,2 <sup>b,e</sup>	112,6±1,1 <sup>b,d</sup>	40,3±1,2 <sup>b,d</sup>
JA16 (60 mg/kg, n=10)	96,0±1,2 <sup>f</sup>	94,8±1,1 <sup>f</sup>	160,3±1,1 <sup>b</sup>	104,9±1,1 <sup>f</sup>	37,5±1,1 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>p < 0,05 (frente a PBS)

<sup>b</sup>p < 0,0001 (frente a PBS)

<sup>c</sup>p < 0,05 (frente a JA16)

<sup>d</sup>p < 0,01 (frente a JA16)

<sup>e</sup>p < 0,001 (frente a JA16)

<sup>f</sup>p < 0,001 (frente a PBS)

## ES 2 344 734 T3

1. **McPherron, A. C., Lawler, A. M. & Lee, S. -J.** Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature* **387**, 83-90 (1997).
- 5 2. **Bogdanovich, S. y col.** Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* **420**, 418-421 (2002).
3. **Wagner, K. R., McPherron, A. C., Winik, N. & Lee, S. -J.** Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in *mdx* mice. *Ann Neurol* **52**, 832-836 (2002).
- 10 4. **McPherron, A. C. & Lee, S. -J.** Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest* **109**, 595-601 (2002).
- 5 5. **Lee, S. -J. & McPherron, A.** Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 9306-9311 (2001).
- 15 6. **Thies, R. y col.** GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors* **18**, 251-259 (2001).
- 20 7. **Zimmers, T. y col.** Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* **296**, 1486-1488 (2002).
8. **Hill, J. J. y col.** The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* **277**, 40735-40741 (2002).
- 25 9. **Hill, J. J., Qiu, Y., Hewick, R. M. & Wolfman, N. M.** Regulation of myostatin *in vivo* by GASP-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrin* **17**, 1144-1154 (2003).
10. **Lyons, R. M., Keski-Oja, J. & Moses, H. L.** Proteolytic activation of latent transforming growth factor- $\beta$  from fibroblast-conditioned medium. *J. Cell Biol.* **106**, 1659-1665 (1988).
- 30 11. **Sato, E. & Rifkin, D.** Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor- $\beta$ 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* **109**, 309-315 (1989).
- 35 12. **Yu, Q. & Stamenkovic, I.** Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* **14**, 163-176 (2000).
13. **D'Angelo, M., Billings, P., Pacific, M., Leboy, P. & Thorsten, K.** Authentic matrix vesicles contain active metalloproteinases (MMP). *J Biol Chem* **276**, 11347-11353 (2001).
- 40 14. **Maeda, S., Dean, D., Gay, I., Schwartz, Z. & Boyan, B.** Activation of latent transforming growth factor  $\beta$ 1 by stromelysin 1 in extracts of growth plate chondrocyte-derived matrix vesicles. *J Bone Min Res* **16**, 1281-1290 (2001).
15. **Scott, I. y col.** Mammalian BMP-1/Tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian Tolloid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeletogenesis. *Dev Biol* **213**, 283-300 (1999).
- 45 16. **Scott, I. C. y col.** Bone morphogenetic protein-1 processes probiglycan. *J Biol Chem* **275**, 30504-30511 (2000).
- 50 17. **Lee, S.-T., Kessler, E. & Greenspan, D. S.** Analysis of site-directed mutations in human pro- $\alpha$ 2(I) collagen which block cleavage by the C-proteinase. *J Biol Chem* **265**, 21992-21996 (1990).
18. **Whittemore, L.-A. y col.** Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *BBRC* **300**, 965-971 (2003).
- 55 19. **Blader, P., Rastegar, S., Fischer, N. & Strahle, U.** Cleavage of the BMP-4 antagonist chordin by zebrafish tolloid. *Science* **278**, 1937-1940 (1997).
20. **Piccolo, S. y col.** Cleavage of chordin by Xolloid metalloproteinase suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell* **91**, 407-416 (1997).
- 60 21. **Marques, G. y col.** Production of a DPP activity gradient in the early Drosophila embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins. *Cell* **91**, 417-426 (1997).
- 65 22. **Pappano, W., Steiglitz, B., Scott, I. C., Keene, D. R. & Greenspan, D. S.** Use of *Bmp1/Tll1* doubly homozygous null mice and proteomics to identify and validate *in vivo* substrates of BMP-1 tolloid-like metalloproteinases. *Mol Cell Biol* **23**, 4428-4438 (2003).

## ES 2 344 734 T3

Aunque la invención se ha descrito haciendo referencia a los ejemplos anteriores, se entenderá que modificaciones y variaciones se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones. Por tanto, la invención está limitada únicamente por las siguientes reivindicaciones.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para disminuir la activación de la miostatina, que comprende poner en contacto una muestra que comprende un complejo de miostatina latente que comprende un propéptido de miostatina y un fragmento C-terminal de miostatina, y una metaloproteinasa que puede escindir el propéptido de miostatina, con un agente que disminuye la escisión proteolítica del propéptido a través de la metaloproteinasa, disminuyendo de este modo la activación de la miostatina
- 10 en donde la metaloproteinasa es un miembro de la familia de proteínas morfogenéticas óseas 1/toloides (BMP-1/TLD) y el agente es un péptido seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NOs: 11, 14, 17, 20 y 23.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que el miembro de la familia BMP-1/TLD es BMP-1, TLD, la proteína 1 similar a toloide (TLL-1) o la proteína 2 similar a toloide (TLL-2).
3. El método según la reivindicación 2, en el que el miembro de la familia BMP-1/TLD es TLD de mamífero (mTLD), TLL-1 de mamífero (mTLL-1) o TLL-2 de mamífero (mTLL-2).
- 20 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra comprende una muestra celular, una muestra tisular o una muestra de fluido biológico.
- 25 5. Un agente que disminuye la escisión proteolítica con una metaloproteinasa de un propéptido de miostatina en un complejo de miostatina que comprende el propéptido de miostatina y un fragmento C-terminal de miostatina, para emplear en la disminución de la activación de miostatina en un individuo,
- 30 en donde la metaloproteinasa es un miembro de la familia de proteínas morfogenéticas óseas 1/toloides (BMP-1/TLD) y el agente es un péptido seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NOs: 11, 14, 17, 20 y 23.
- 35 6. El agente según la reivindicación 5, en donde el miembro de la familia BMP-1/TLD es BMP-1, TLD, la proteína 1 similar a toloide (TLL-1) o TLL-2.
7. El agente según la reivindicación 6, en donde el miembro de la familia BMP-1/TLD es TLD de mamífero (mTLD), TLL-1 de mamífero (mTLL-1) o TLL-2 de mamífero (mTLL-2).
- 40 8. El agente según la reivindicación 5, 6 ó 7, en donde, en el individuo, la masa muscular se incrementa y/o el contenido en grasa disminuye.
9. El agente según la reivindicación 8, en donde el individuo es un animal criado como fuente de alimentos.
- 45 10. El agente según la reivindicación 5, 6 ó 7, en donde, en el individuo, se alivia un trastorno metabólico.
11. El agente según la reivindicación 10, en donde el trastorno metabólico es obesidad, diabetes de tipo 2 o es un trastorno de desgaste muscular.
- 50 12. El agente según la reivindicación 11, en el que el trastorno de desgaste muscular es sarcopenia o está asociado con la distrofia muscular o con la caquexia.
13. El agente según la reivindicación 12, en donde la caquexia está asociada con el cáncer o con la inmunodeficiencia adquirida.
- 55 14. El agente según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde el individuo es un vertebrado..
15. El agente según la reivindicación 14 cuando está agregada a una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde el individuo vertebrado es un animal doméstico.
- 60 16. El agente según la reivindicación 9 o la reivindicación 14, en donde el individuo es una especie de mamífero, una especie aviar o una especie piscícola.
17. El agente según la reivindicación 16, en donde la especie de mamífero es una especie ovina, una especie porcina, una especie bovina o un ser humano.
- 65 18. El agente según la reivindicación 17, en donde la especie aviar es un pollo o un pavo.

## ES 2 344 734 T3

19. Un método *in vitro* para identificar un agente que modula la activación de la miostatina latente mediada con una metaloproteinasa, que comprende:

5 a) poner en contacto un propéptido de miostatina, una metaloproteinasa que puede escindir el propéptido de miostatina y un agente del ensayo, bajo condiciones suficientes para que tenga lugar la escisión del propéptido con la metaloproteinasa; y

10 b) detectar un cambio en la cantidad de escisión del propéptido en ausencia del agente del ensayo, comparando con la presencia del agente del ensayo, identificando de este modo el agente del ensayo como un agente que modula la activación mediada con metaloproteinasa de la miostatina latente,

en donde la metaloproteinasa es un miembro de la familia de proteínas morfogenéticas óseas 1/toloides (BMP-1/TLD).

15

20. El método según la reivindicación 19, en donde el propéptido de la miostatina comprende un complejo de miostatina latente que comprende el propéptido de miostatina y un fragmento C-terminal de la miostatina.

20 21. El método según la reivindicación 19, en donde el propéptido de la miostatina comprende un complejo de miostatina latente que comprende el propéptido de miostatina y un dímero C-terminal de la miostatina.

22. El método según la reivindicación 19, en donde detectar una diferencia en la cantidad de escisión del propéptido comprende detectar el propéptido o un producto de la escisión del propéptido.

25 23. El método según la reivindicación 22, en donde la cantidad de propéptido o de producto de la escisión del propéptido se detecta mediante electroforesis, cromatografía o espectrometría de masas.

30 24. El método según la reivindicación 22, que comprende detectar una cantidad incrementada de un producto de la escisión del propéptido en presencia del agente del ensayo comparada con una cantidad del producto de la escisión en ausencia del agente del ensayo, identificando de este modo el agente del ensayo como un agente que incrementa la activación mediada con metaloproteinasa de la miostatina latente.

35 25. El método según la reivindicación 22, que comprende detectar una cantidad disminuida del propéptido en presencia del agente del ensayo, comparada con una cantidad de propéptido en ausencia del agente del ensayo, identificando de este modo el agente del ensayo como un agente que incrementa la activación mediada con metaloproteinasa de la miostatina latente.

40 26. El método según la reivindicación 22, que comprende detectar una cantidad disminuida de un producto de la escisión del propéptido en presencia del agente del ensayo, comparada con una cantidad del producto de la escisión en ausencia del agente del ensayo, identificando de este modo el agente del ensayo como un agente que disminuye la activación mediada con metaloproteinasa de la miostatina latente.

45 27. El método según la reivindicación 22, que comprende detectar una cantidad mayor de un propéptido en presencia del agente del ensayo, comparada con una cantidad de propéptido en ausencia del agente del ensayo, identificando de este modo el agente del ensayo como un agente que disminuye la activación mediada con metaloproteinasa de la miostatina latente.

50 28. El método según la reivindicación 19, que comprende adicionalmente la determinación de una cantidad con la que el agente modula la activación mediada con metaloproteinasa de la miostatina latente.

29. El método según la reivindicación 22, en donde la detección de una diferencia en la cantidad de escisión del propéptido comprende detectar un cambio en la transducción de la señal mediada con miostatina en una célula que expresa un receptor de miostatina.

55 30. El método según la reivindicación 29, en donde el receptor de la miostatina es un receptor de activina.

31. El método según la reivindicación 30, en donde el receptor de activina es un receptor de activina de tipo II.

60 32. El método según la reivindicación 29, en donde el receptor de la miostatina es expresado por un transgén.

33. El método según la reivindicación 29, en donde la célula contiene un gen informador sensible a la transducción de la señal mediada con miostatina, y en donde dicha detección comprende detectar un cambio en la expresión del gen informador.

65 34. El método según la reivindicación 33, en donde el gen informador comprende un elemento regulador del factor de crecimiento de transformación beta (TGF- $\beta$ ).

## ES 2 344 734 T3

35. El método según la reivindicación 19, en donde el agente del ensayo es un péptido, un hidroxamato de péptido, un péptido fosfínico, un peptoide, un polinucleótido o una molécula orgánica pequeña.

5 36. El método según la reivindicación 19, que se realiza en un formato de alto rendimiento.

37. El método según la reivindicación 36, que comprende poner en contacto cada una de una variedad de muestras que comprenden un propéptido de miostatina y una metaloproteinasa, con un agente del ensayo.

10 38. El método según la reivindicación 36, en donde el agente del ensayo comprende una variedad de agentes del ensayo, y en donde al menos una muestra que comprende un propéptido de miostatina y una metaloproteinasa entre una variedad de muestras, se pone en contacto con al menos un agente del ensayo entre una variedad de agentes del ensayo.

15 39. El método según la reivindicación 38, en donde la variedad de agentes del ensayo comprende una quimioteca combinatoria de agentes del ensayo.

20 40. El método según la reivindicación 39, en donde la quimioteca combinatoria de agentes del ensayo comprende una quimioteca de agentes del ensayo aleatoria, de agentes del ensayo sesgados o de agentes del ensayo diversificados.

25

30

35

40

45

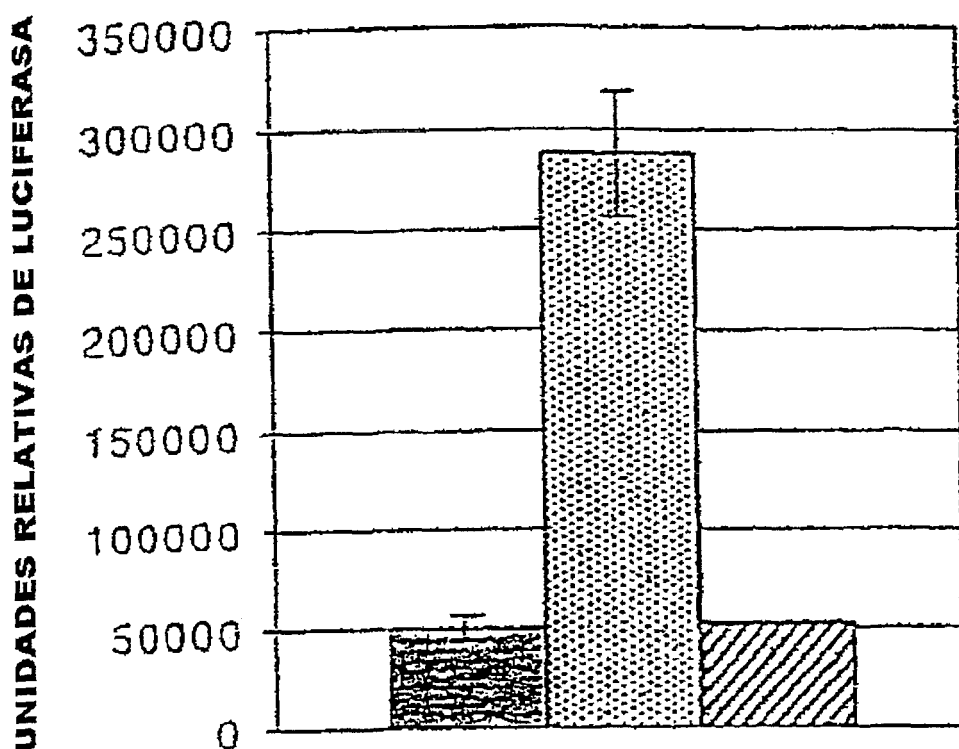
50

55

60

65

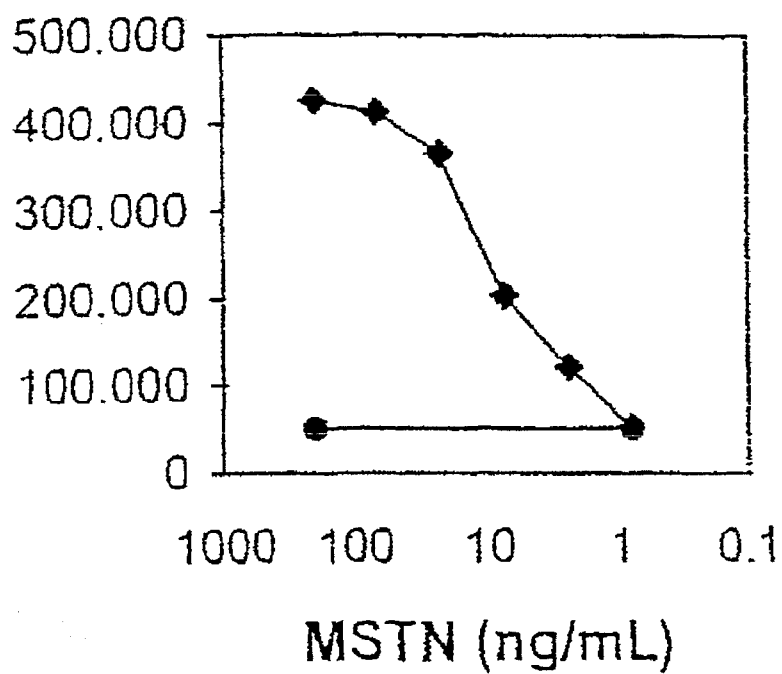
Ensayo informador de la actividad de MSTN



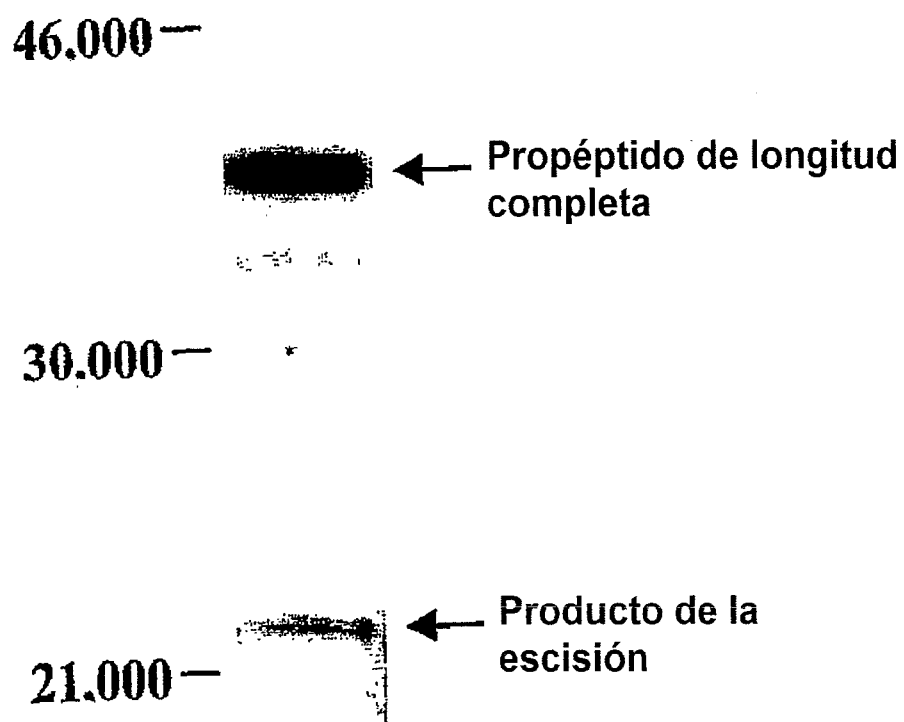
**FIGURA 1**

UNIDADES RELATIVAS DE LUCIFERASA

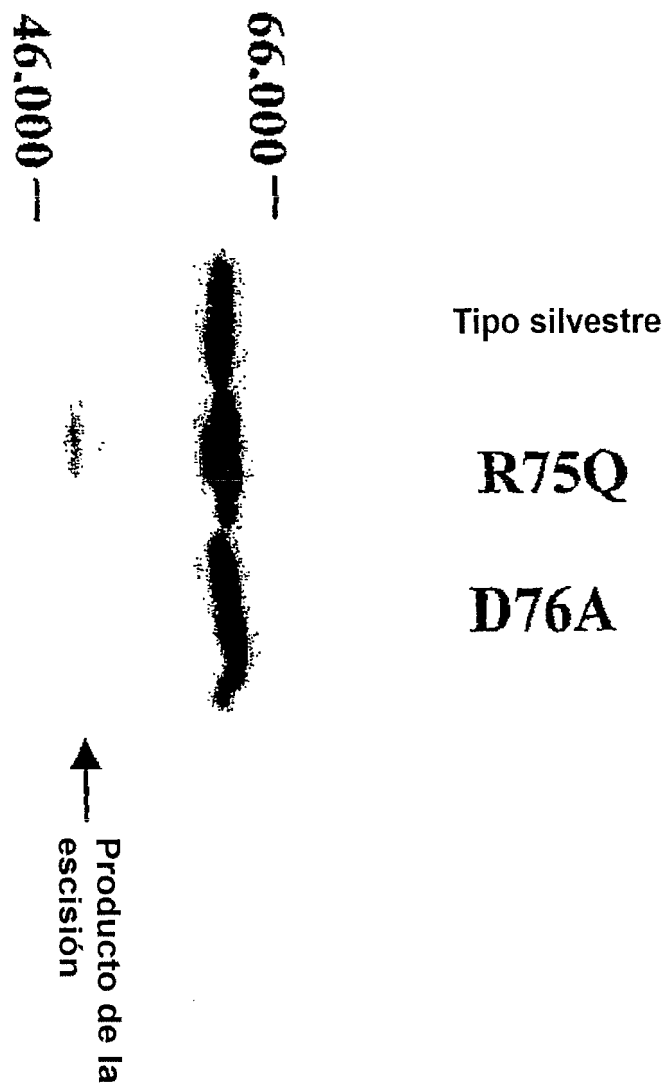
Curva patrón de miostatina MSTN(MSTN)



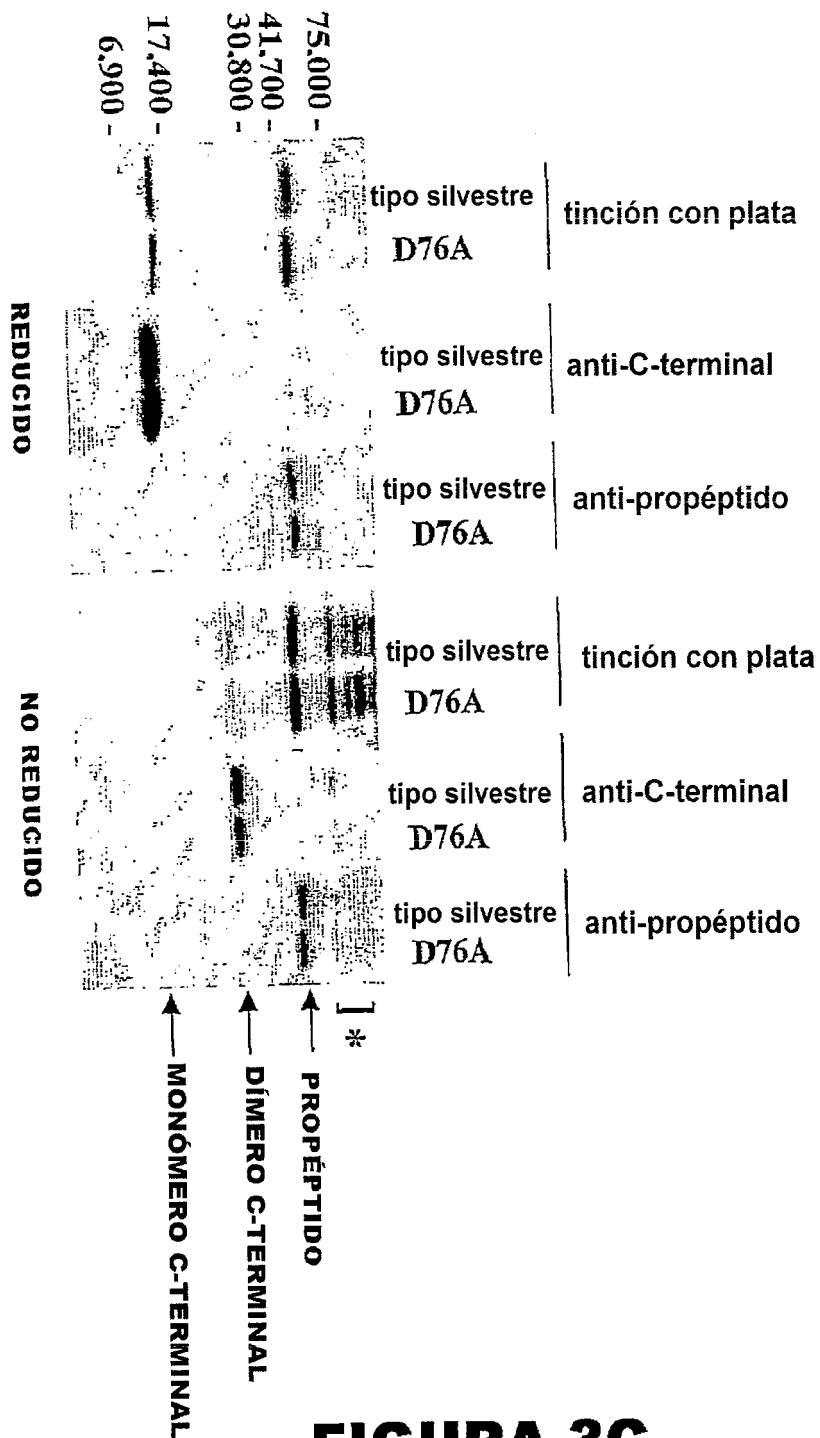
**FIGURA 2**



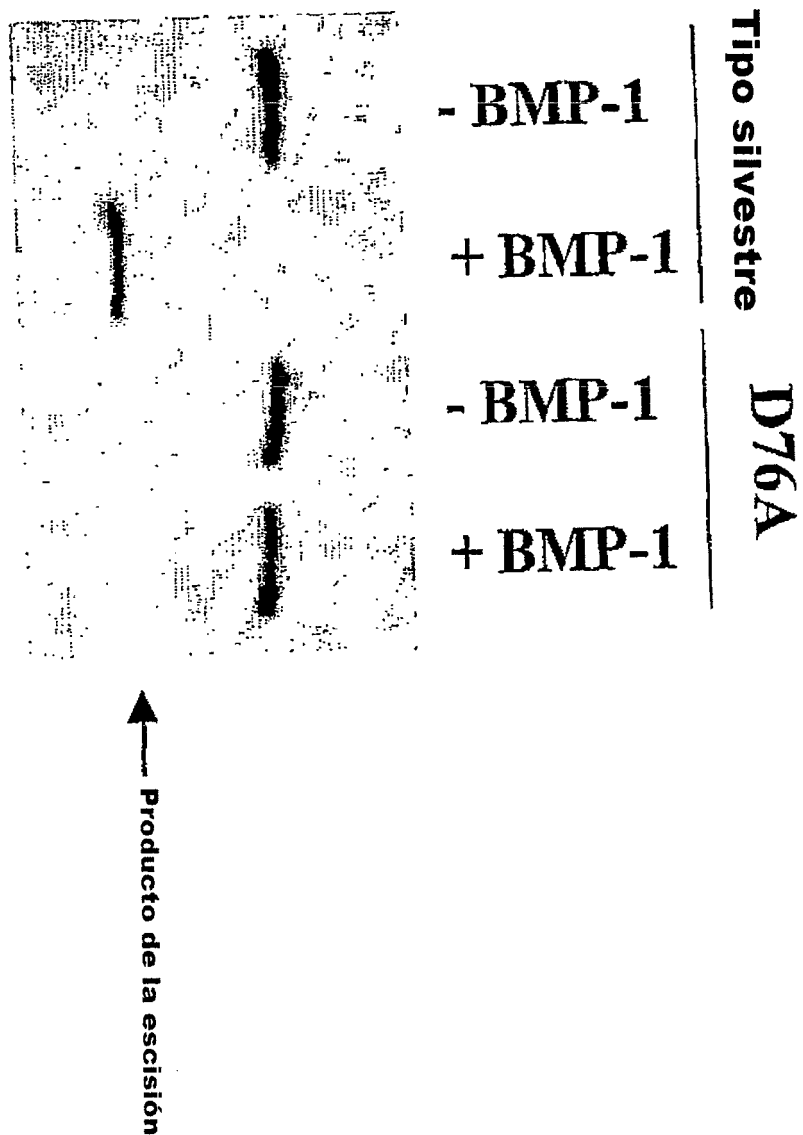
**FIGURA 3A**



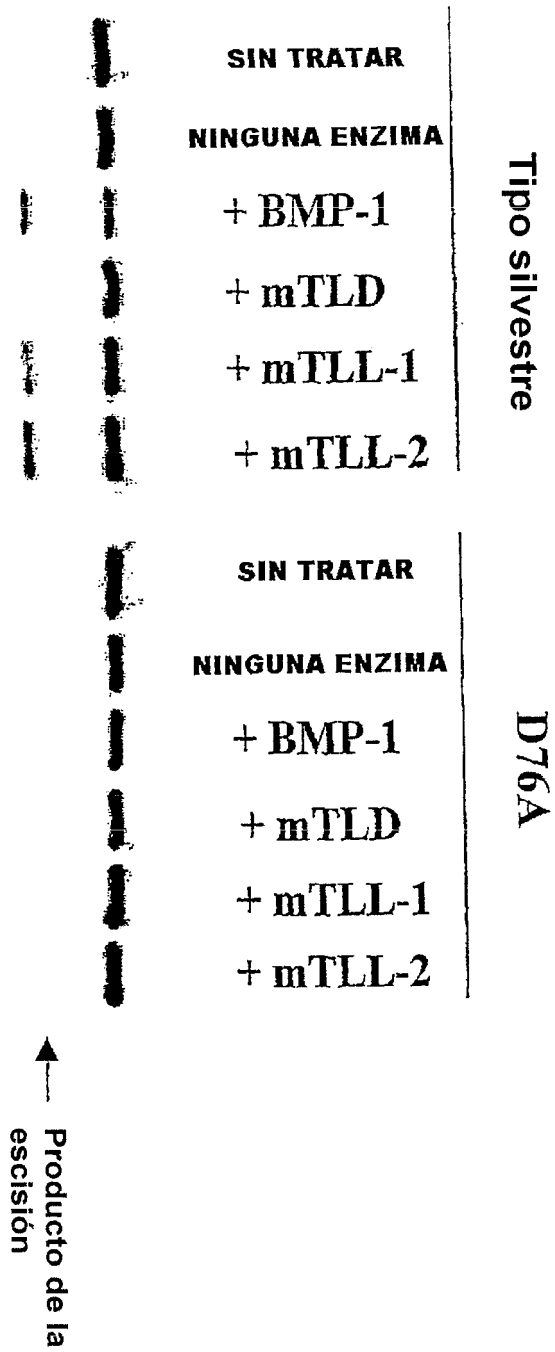
**FIGURA 3B**



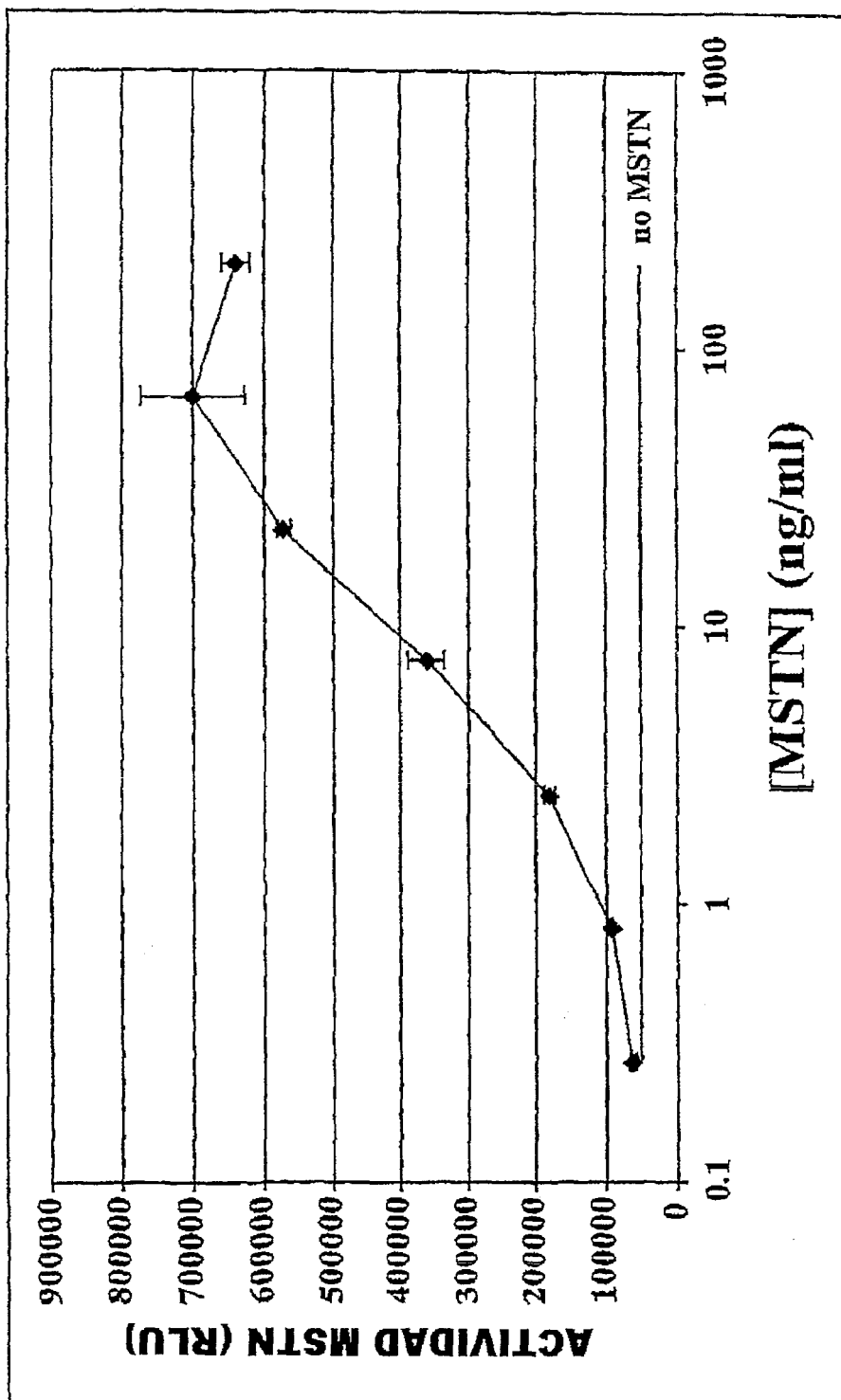
**FIGURA 3C**



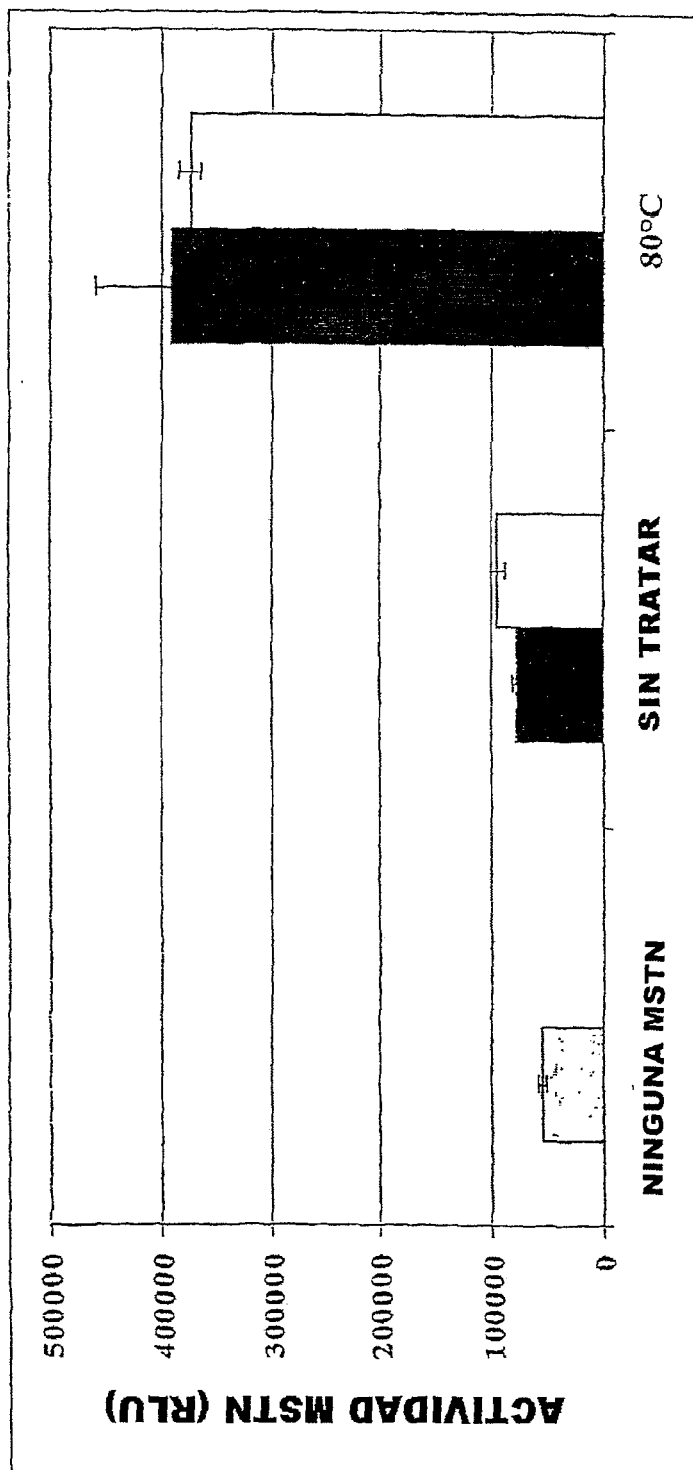
**FIGURA 3D**



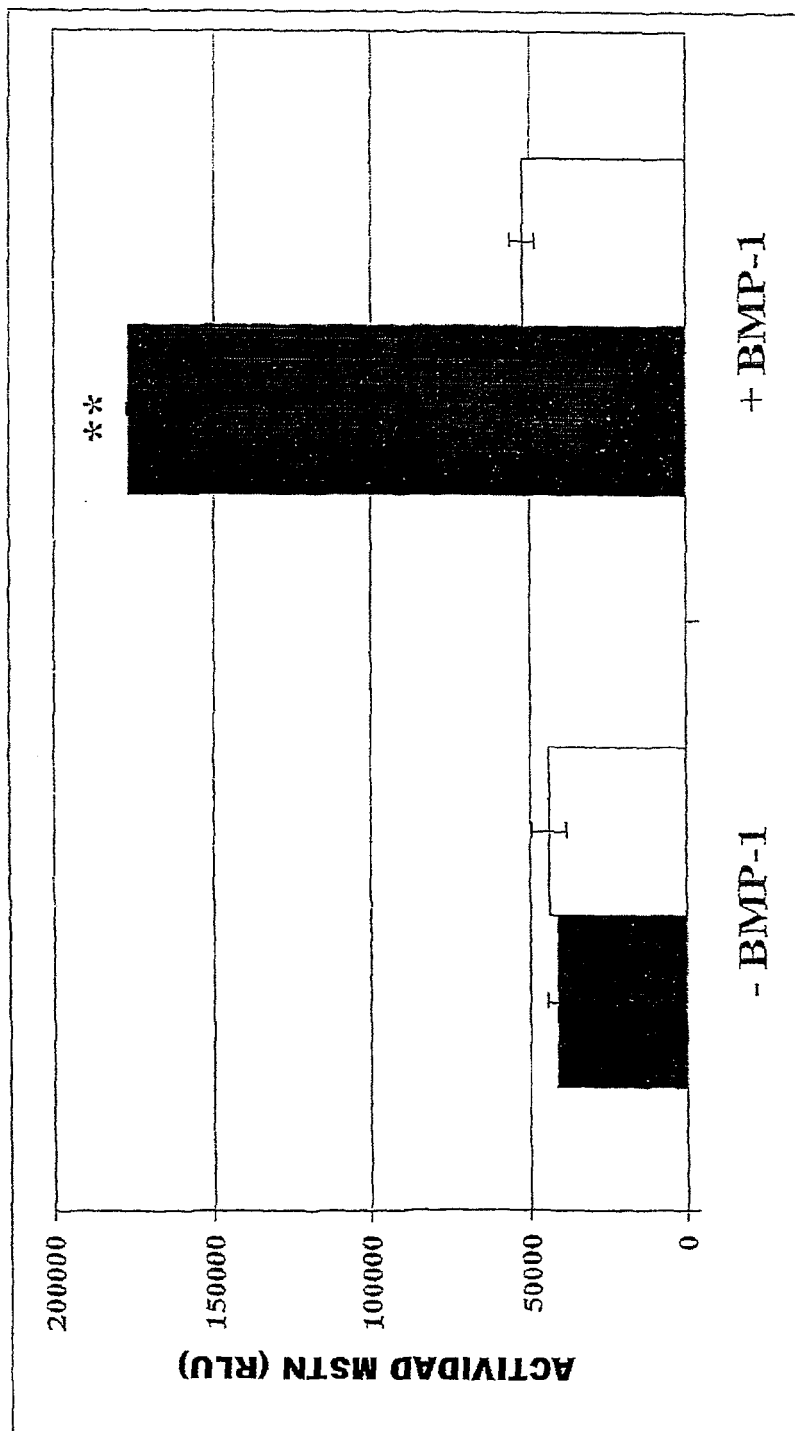
**FIGURA 3E**



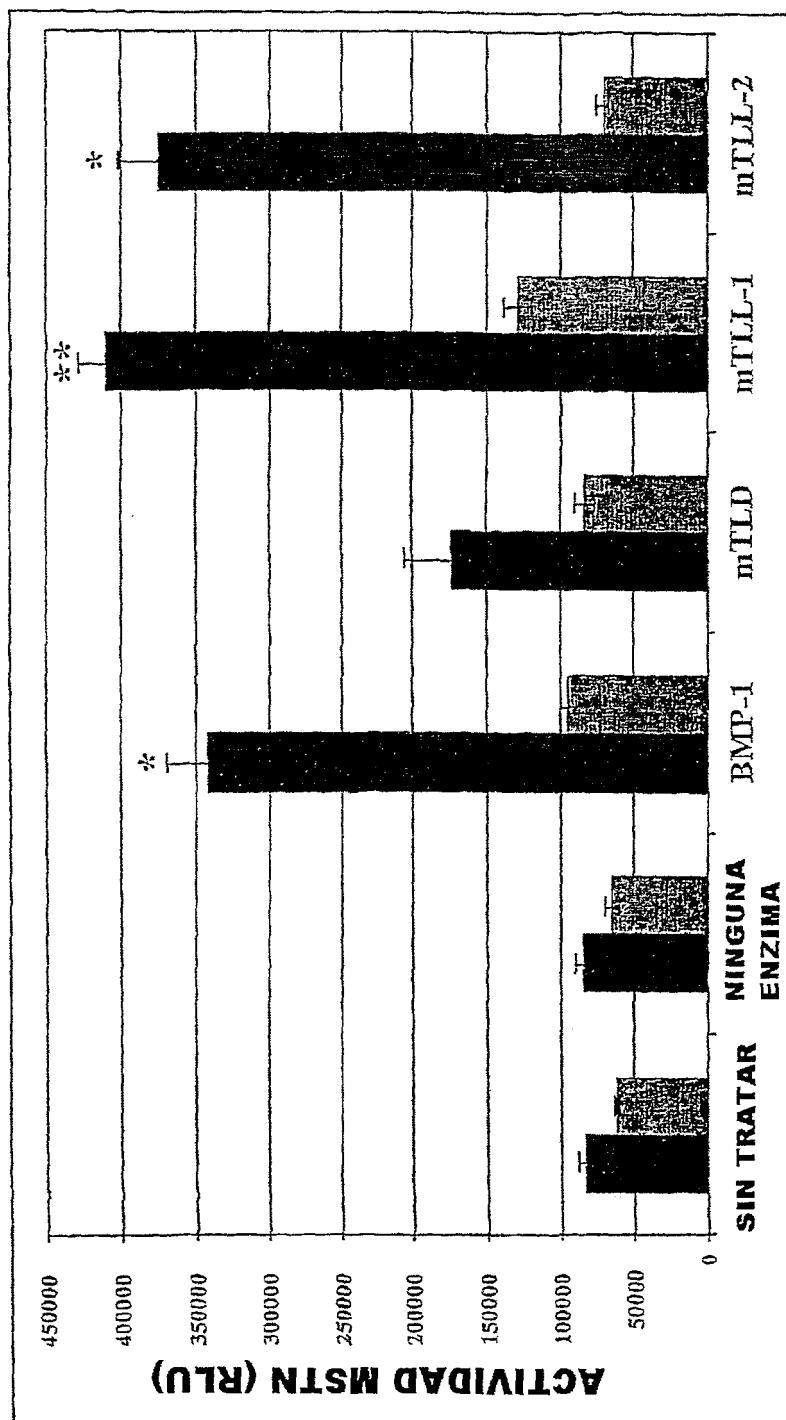
**FIGURA 4A**



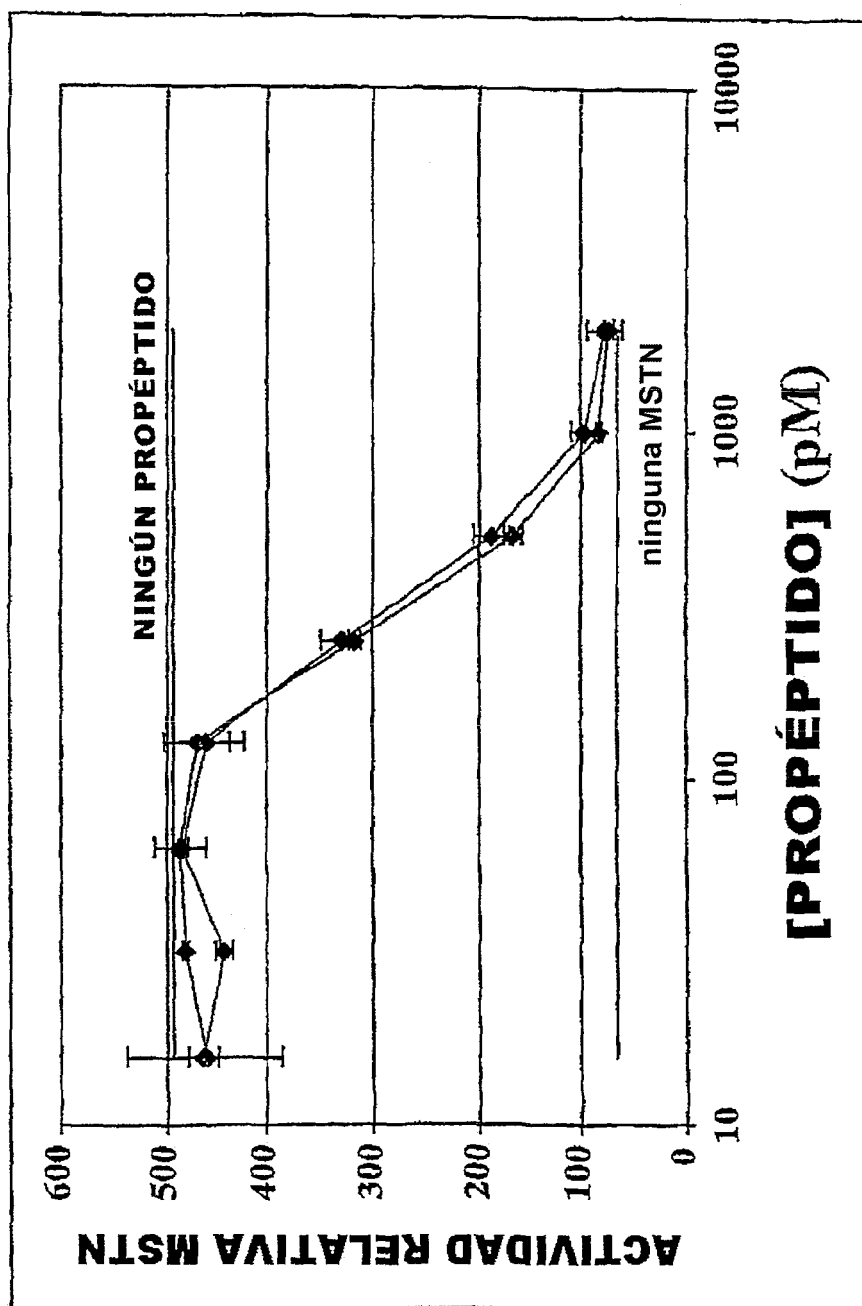
**FIGURA 4B**



**FIGURA 4C**



**FIGURA 4D**



**FIGURA 5**

# ES 2 344 734 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Johns Hopkins University  
 LEE, Se-Jin  
 5 McPHERRON, Alexandra  
 GREENSPAN, Daniel S.  
 PAPPANO, William N.  
 WOLFMAN, Neil  
 10 TOMKINSON, Kathy

<120> ACTIVACIÓN DE MIOSTATINA POR METALOPROTEASA, Y MÉTODOS PARA MODULAR LA AC-  
 TIVIDAD DE MIOSTATINA

15 <130> JHU1800-3WO

<150> US 60/486,863  
 <151> 10-07-2003

20 <150> US 60/439,164  
 <151> 09-01-2003

25 <150> US 60/411,133  
 <151> 16-09-2002

<160> 23

30 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
 <211> 2743  
 35 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 40 <221> CDS  
 <222> (59)..(1183)  
 <223>

45 <400> 1

```

aagaaaagta aaaggaagaa acaagaacaa gaaaaaagat tatattgatt ttaaaatc      58
atg caa aaa ctg caa ctc tgt gtt tat att tac ctg ttt atg ctg att      106
Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile
1           5           10           15
gtt gct ggt cca gtg gat cta aat gag aac agt gag caa aaa gaa aat      154
Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn
55           20           25           30
gtg gaa aaa gag ggg ctg tgt aat gca tgt act tgg aga caa aac act      202
Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr
35           40           45
aaa tct tca aga ata gaa gcc att aag ata caa atc ctc agt aaa ctt      250
Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu
50           55           60
cgt ctg gaa aca gct cct aac atc agc aaa gat gtt ata aga caa ctt      298
Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu
65           70           75           80
  
```

# ES 2 344 734 T3

5	tta ccc aaa gct cct cca ctc cgg gaa ctg att gat cag tat gat gtc Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val	85 90 95	346
5	cag agg gat gac agc agc gat ggc tct ttg gaa gat gac gat tat cac Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His	100 105 110	394
10	gct aca acg gaa aca atc att acc atg cct aca gag tct gat ttt cta Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu	115 120 125	442
15	atg caa gtg gat gga aaa ccc aaa tgt tgc ttc ttt aaa ttt agc tct Met Gln Val Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser	130 135 140	490
20	aaa ata caa tac aat aaa gta gta aag gcc caa cta tgg ata tat ttg Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu	145 150 155 160	538
25	aga ccc gtc gag act cct aca aca gtg ttt gtg caa atc ctg aga ctc Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu	165 170 175	586
30	atc aaa cct atg aaa gac ggt aca agg tat act gga atc cga tct ctg Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu	180 185 190	634
35	aaa ctt gac atg aac cca ggc act ggt att tgg cag agc att gat gtg Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val	195 200 205	682
40	aag aca gtg ttg caa aat tgg ctc aaa caa cct gaa tcc aac tta ggc Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly	210 215 220	730
45	att gaa ata aaa gct tta gat gag aat ggt cat gat ctt gct gta acc Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr	225 230 235 240	778
50	ttc cca gga cca gga gaa gat ggg ctg aat ccg ttt tta gag gtc aag Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys	245 250 255	826
55	gta aca gac aca cca aaa aga tcc aga agg gat ttt ggt ctt gac tgt Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys	260 265 270	874
60	gat gag cac tca aca gaa tca cga tgc tgt cgt tac cct cta act gtg Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val	275 280 285	922
65	gat ttt gaa gct ttt gga tgg gat tgg att atc gct cct aaa aga tat Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr	290 295 300	970
70	aag gcc aat tac tgc tct gga gag tgt gaa ttt gta ttt tta caa aaa Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys	305 310 315 320	1018
75	tat cct cat act cat ctg gta cac caa gca aac ccc aga ggt tca gca	1066	1066

# ES 2 344 734 T3

	Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala	
					325					330					335		
5	ggc	cct	tgc	tgt	act	ccc	aca	aag	atg	tct	cca	att	aat	atg	cta	tat	1114
	Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr	
			340					345					350				
10	ttt	aat	ggc	aaa	gaa	caa	ata	ata	tat	ggg	aaa	att	cca	gcg	atg	gta	1162
	Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Ala	Met	Val	
			355				360						365				
15	gta	gac	cgc	tgt	ggg	tgc	tca	tgagatttat	attaagcgtt	cataacttcc							1213
	Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser										
			370				375										
20	taaaacatgg	aaggttttcc	cctcaacaat	tttgaagctg	tgaaattaag	taccacaggc											1273
	tataggccta	gagtatgcta	cagtcactta	agcataagct	acagtatgta	aactaaaagg											1333
25	gggaatatat	gcaatggttg	gcatttaacc	atccaaaca	atcatacaag	aaagttttat											1393
	gatttccaga	gtttttgagc	tagaaggaga	tcaaattaca	tttatgttcc	tatatattac											1453
30	aacatcggcg	aggaaatgaa	agegattctc	cttgagttct	gatgaattaa	aggagtatgc											1513
	tttaaagtct	atctctttaa	agttttgttt	aatatttaca	gaaaaatcca	catacagtat											1573
35	tggtaaaatg	caggattggt	atataccatc	attcgaatca	tccttaaaca	cttgaattta											1633
40	tattgtatgg	tagtatactt	ggtaagataa	aattccaca	aaatagggat	ggtgcagcat											1693
	atgcaatttc	cattcctatt	ataattgaca	cagtacatta	acaatccatg	ccaacggtgc											1753
45	taatacgata	ggctgaatgt	ctgaggctac	caggtttatc	acataaaaaa	cattcagtaa											1813
	aatagtaagt	ttctcttttc	ttcaggtgca	tttctctaca	cctccaaatg	aggaaatggat											1873
50	ttctctttaa	gtaagaagaa	tcatttttct	agaggttggc	tttcaattct	gtagcatact											1933
	tgagaaaact	gcattatctt	aaaaggcagt	caaatgggtg	ttgtttttat	caaaatgtca											1993
55	aaataacata	ctgggagaag	tatgtaatth	tgtctttgga	aaattacaac	actgcctttg											2053
	caacactgca	gtttttatgg	taaaataata	gaaatgatcg	actctatcaa	tattgtataa											2113
60	aaagactgaa	acaatgcatt	tatataatat	gtatacaata	ttgttttgta	aataagtgtc											2173
	tcctttttta	tttactttgg	tatattttta	cactaaggac	atttcaaatt	aagtactaag											2233
65	gcacaaagac	atgtcatgca	tcacagaaaa	gcaactactt	atatttcaga	gcaaattagc											2293
	agattaaata	gtggctctta	aactccatat	gttaatgatt	agatggttat	attacaatca											2353
70	ttttatattt	ttttacatga	ttaacattca	cttatggatt	catgatggct	gtataaagtg											2413
	aatttgaaat	ttcaatgggt	tactgtcatt	gtgttttaaat	ctcaacgttc	cattatttta											2473
75	atacttgcaa	aaacattact	aagtatacca	aaataattga	ctctattatc	tgaaatgaag											2533
	aataaactga	tgctatctca	acaataactg	ttacttttat	tttataaatt	gataatgaat											2593
80	atatttctgc	atatttttac	ttctgttttg	taaattggga	ttttgttaat	caaattttatt											2653
	gtactatgac	taaatgaaat	tatttcttac	atctaatttg	tagaaacagt	ataagttata											2713
85	ttaaagtgtt	ttcacatttt	tttgaagac														2743

# ES 2 344 734 T3

<210> 2

<211> 375

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

10      Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile
      1          5          10          15
15      Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn
      20          25          30
20      Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr
      35          40          45
25      Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu
      50          55          60
30      Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu
      65          70          75          80
35      Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val
      85          90          95
40      Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His
      100          105          110
45      Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu
      115          120          125
50      Met Gln Val Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser
      130          135          140
55      Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu
      145          150          155          160
60      Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu
      165          170          175
65      Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu
      180          185          190

```

ES 2 344 734 T3

Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val  
 195 200 205  
 5  
 Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly  
 210 215 220  
 10  
 Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr  
 225 230 235 240  
 15  
 Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys  
 245 250 255  
 20  
 Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys  
 260 265 270  
 25  
 Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val  
 275 280 285  
 30  
 Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr  
 290 295 300  
 35  
 Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys  
 305 310 315 320  
 40  
 Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala  
 325 330 335  
 45  
 Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr  
 340 345 350  
 50  
 Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val  
 355 360 365  
 Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser  
 370 375

<210> 3

<211> 1128

<212> ADN

<213> Bovina

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1125)

<223>



# ES 2 344 734 T3

	245	250	255	
5	gta aca gac aca cca aaa aga tct agg aga gat ttt ggg ctt gat tgt Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys 260 265 270			816
10	gat gaa cac tcc aca gaa tct cga tgc tgt cgt tac cct cta act gtg Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val 275 280 285			864
15	gat ttt gaa gct ttt gga tgg gat tgg att att gca cct aaa aga tat Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr 290 295 300			912
20	aag gcc aat tac tgc tct gga gaa tgt gaa ttt gta ttt ttg caa aag Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys 305 310 315 320			960
25	tat cct cat acc cat ctt gtg cac caa gca aac ccc aga ggt tca gcc Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala 325 330 335			1008
30	ggc ccc tgc tgt act cct aca aag atg tct cca att aat atg cta tat Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr 340 345 350			1056
35	ttt aat ggc gaa gga caa ata ata tac ggg aag att cca gcc atg gta Phe Asn Gly Glu Gly Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val 355 360 365			1104
40	gta gat cgc tgt ggg tgt tca tga Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser 370 375			1128
45	<p>&lt;210&gt; 4</p> <p>&lt;211&gt; 375</p> <p>&lt;212&gt; PRT</p> <p>&lt;213&gt; Bovina</p> <p>&lt;400&gt; 4</p>			
50	Met Gln Lys Leu Gln Ile Ser Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile 1 5 10 15			
55	Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn 20 25 30			
60	Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Leu Trp Arg Glu Asn Thr 35 40 45			
65	Thr Ser Ser Arg Leu Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu 50 55 60			
70	Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Ala Ile Arg Gln Leu 65 70 75 80			



ES 2 344 734 T3

Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala  
 325 330 335

5 Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr  
 340 345 350

10 Phe Asn Gly Glu Gly Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val  
 355 360 365

15 Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser  
 370 375

<210> 5

20 <211> 1128

<212> ADN

<213> *Gallus gallus*

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1125)

<223>

30

<400> 5

35 atg caa aag ctg gca gtc tat gtt tat att tac ctg ttc atg cag atc 48  
 Met Gln Lys Leu Ala Val Tyr Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Gln Ile  
 1 5 10 15

40 gcg gtt gat ccg gtg gct ctg gat ggc agt agt cag ccc aca gag aac 96  
 Ala Val Asp Pro Val Ala Leu Asp Gly Ser Ser Gln Pro Thr Glu Asn  
 20 25 30

45 gct gaa aaa gac gga ctg tgc aat gct tgt acg tgg aga cag aat aca 144  
 Ala Glu Lys Asp Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr  
 35 40 45

50 aaa tcc tcc aga ata gaa gcc ata aaa att caa atc ctc agc aaa ctg 192  
 Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu  
 50 55 60

55 cgc ctg gaa caa gca cct aac att agc agg gac gtt att aag cag ctt 240  
 Arg Leu Glu Gln Ala Pro Asn Ile Ser Arg Asp Val Ile Lys Gln Leu  
 65 70 75 80

60 tta ccc aaa gct cct cca ctg cag gaa ctg att gat cag tat gat gtc 288  
 Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Gln Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val  
 85 90 95

65 cag agg gac gac agt agc gat ggc tct ttg gaa gac gat gac tat cat 336  
 Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His  
 100 105 110

70 gcc aca acc gag acg att atc aca atg cct acg gag tct gat ttt ctt 384  
 Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu  
 115 120 125

75 gta caa atg gag gga aaa cca aaa tgt tgc ttc ttt aag ttt agc tct 432  
 Val Gln Met Glu Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser

# ES 2 344 734 T3

	130	135	140	
5	aaa ata caa tat aac Lys Ile Gln Tyr Asn 145	aaa gta gta aag gca Lys Val Val Lys Ala 150	caa tta tgg ata tac Gln Leu Trp Ile Tyr 155	ttg 480 Leu 160
10	agg caa gtc caa aaa Arg Gln Val Gln Lys 165	cct aca acg gtg ttt Pro Thr Thr Val Phe 170	gtg cag atc ctg aga Val Gln Ile Leu Arg 175	ctc 528 Leu 175
15	att aag ccc atg aaa Ile Lys Pro Met Lys 180	gac ggt aca aga tat Asp Gly Thr Arg Tyr 185	act gga att cga tct Thr Gly Ile Arg Ser 190	ttg 576 Leu 190
20	aaa ctt gac atg aac Lys Leu Asp Met Asn 195	cca ggc act ggt atc Pro Gly Thr Gly Ile 200	tgg cag agt att gat Trp Gln Ser Ile Asp 205	gtg 624 Val 205
25	aag aca gtg ctg caa Lys Thr Val Leu Gln 210	aat tgg ctc aaa cag Asn Trp Leu Lys Gln 215	cct gaa tcc aat tta Pro Glu Ser Asn Leu 220	ggc 672 Gly 220
30	atc gaa ata aaa gct Ile Glu Ile Lys Ala 225	ttt gat gag act gga Phe Asp Glu Thr Gly 230	cga gat ctt gct gtc Arg Asp Leu Ala Val 235	aca 720 Thr 240
35	ttc cca gga cca gga Phe Pro Gly Pro Gly 245	gaa gat gga ttg aac Glu Asp Gly Leu Asn 250	cca ttt tta gag gtc Pro Phe Leu Glu Val 255	aga 768 Arg 255
40	gtt aca gac aca ccg Val Thr Asp Thr Pro 260	aaa cgg tcc cgc aga Lys Arg Ser Arg Arg 265	gat ttt ggc ctt gac Asp Phe Gly Leu Asp 270	tgt 816 Cys 270
45	gat gag cac tca acg Asp Glu His Ser Thr 275	gaa tcc cga tgt tgt Glu Ser Arg Cys Cys 280	cgc tac ccg ctg aca Arg Tyr Pro Leu Thr 285	gtg 864 Val 285
50	gat ttc gaa gct ttt Asp Phe Glu Ala Phe 290	gga tgg gac tgg att Gly Trp Asp Trp Ile 295	ata gca cct aaa aga Ile Ala Pro Lys Arg 300	tac 912 Tyr 300
55	aaa gcc aat tac tgc Lys Ala Asn Tyr Cys 305	tcc gga gaa tgc gaa Ser Gly Glu Cys Glu 310	ttt gtg ttt cta cag Phe Val Phe Leu Gln 315	aaa 960 Lys 320
60	tac ccg cac act cac Tyr Pro His Thr His 325	ctg gta cac caa gca Leu Val His Gln Ala 330	aat ccc aga ggc tca Asn Pro Arg Gly Ser 335	gca 1008 Ala 335
65	ggc cct tgc tgc aca Gly Pro Cys Cys Thr 340	ccc acc aag atg tcc Pro Thr Lys Met Ser 345	cct ata aac atg ctg Pro Ile Asn Met Leu 350	tat 1056 Tyr 350
70	ttc aat gga aaa gaa Phe Asn Gly Lys Glu 355	caa ata ata tat gga Gln Ile Ile Tyr Gly 360	aag ata cca gcc atg Lys Ile Pro Ala Met 365	gtt 1104 Val 365
75	gta gat cgt tgc ggg Val Asp Arg Cys Gly 370	tgc tca tga Ser Cys Ser 375		1128

<210> 6

<211> 375

<212> PRT

65 <213> *Gallus gallus*

ES 2 344 734 T3

<400> 6

5 Met Gln Lys Leu Ala Val Tyr Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Gln Ile  
1 5 10 15

Ala Val Asp Pro Val Ala Leu Asp Gly Ser Ser Gln Pro Thr Glu Asn  
20 25 30

10 Ala Glu Lys Asp Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr  
35 40 45

15 Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu  
50 55 60

20 Arg Leu Glu Gln Ala Pro Asn Ile Ser Arg Asp Val Ile Lys Gln Leu  
65 70 75 80

25 Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Gln Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val  
85 90 95

Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His  
100 105 110

30 Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu  
115 120 125

35 Val Gln Met Glu Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser  
130 135 140

Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu  
145 150 155 160

40 Arg Gln Val Gln Lys Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu  
165 170 175

45 Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu  
180 185 190

50 Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val  
195 200 205

55

60

65

ES 2 344 734 T3

Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly  
 210 215 220

5  
 Ile Glu Ile Lys Ala Phe Asp Glu Thr Gly Arg Asp Leu Ala Val Thr  
 225 230 235 240

10  
 Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Arg  
 245 250 255

15  
 Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys  
 260 265 270

20  
 Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val  
 275 280 285

25  
 Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr  
 290 295 300

30  
 Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys  
 305 310 315 320

35  
 Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala  
 325 330 335

40  
 Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr  
 340 345 350

45  
 Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val  
 355 360 365

50  
 Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser  
 370 375

45  
 <210> 7  
 <211> 1125  
 <212> ADN  
 <213> *Danio rerio*

50  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1122)

55  
 <223>

60  
 <400> 7  
 atg cat ttt aca cag gtt tta att tct cta agt gta tta att gca tgt 48  
 Met His Phe Thr Gln Val Leu Ile Ser Leu Ser Val Leu Ile Ala Cys  
 1 5 10 15  
 ggt cca gtg ggt tat gga gat ata acg gcg cac cag cag cct tcc aca 96  
 Gly Pro Val Gly Tyr Gly Asp Ile Thr Ala His Gln Gln Pro Ser Thr

# ES 2 344 734 T3

	20	25	30	
5	gcc acg gag gaa agc gag ctg tgt tcc aca tgt gag ttc aga caa cac Ala Thr Glu Glu Ser Glu Leu Cys Ser Thr Cys Glu Phe Arg Gln His 35 40 45			144
	agc aag ctg atg aga ctg cat gcc atc aag tcc caa att ctt agc aaa Ser Lys Leu Met Arg Leu His Ala Ile Lys Ser Gln Ile Leu Ser Lys 50 55 60			192
10	ctc cga ctc aag cag gct cca aac atc agc cgg gac gtg gtc aag cag Leu Arg Leu Lys Gln Ala Pro Asn Ile Ser Arg Asp Val Val Lys Gln 65 70 75 80			240
15	ctg tta ccc aaa gca ccg cct ttg caa caa ctt ctg gat cag tac gat Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Gln Gln Leu Leu Asp Gln Tyr Asp 85 90 95			288
20	gtt tta gga gat gac agt aag gat gga gct gtg gaa gag gac gat gaa Val Leu Gly Asp Asp Ser Lys Asp Gly Ala Val Glu Glu Asp Asp Glu 100 105 110			336
	cat gcc acc aca gag acc atc atg acc atg gcc aca gaa cct gac ccc His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Met Thr Met Ala Thr Glu Pro Asp Pro 115 120 125			384
25	att gtt caa gta gat cgg aaa ccg aag tgt tgc ttt ttc tcc ttc agt Ile Val Gln Val Asp Arg Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Ser Phe Ser 130 135 140			432
30	ccg aag atc caa gcg aac ccg atc gta aga gcg cag ctc tgg gtt cat Pro Lys Ile Gln Ala Asn Arg Ile Val Arg Ala Gln Leu Trp Val His 145 150 155 160			480
	ctg aga ccg gcg gag gag gcg acc acc gtc ttc tta cag ata tct cgg Leu Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Thr Val Phe Leu Gln Ile Ser Arg 165 170 175			528
35	ctg atg ccc gtt aag gac gga gga aga cac cga ata cga tcc ctg aaa Leu Met Pro Val Lys Asp Gly Gly Arg His Arg Ile Arg Ser Leu Lys 180 185 190			576
40	atc gac gtg aac gca gga gtc acg tct tgg cag agt ata gac gta aag Ile Asp Val Asn Ala Gly Val Thr Ser Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys 195 200 205			624
45	cag gtg ctc acg gtg tgg tta aaa caa ccg gag acc aac cga ggc atc Gln Val Leu Thr Val Trp Leu Lys Gln Pro Glu Thr Asn Arg Gly Ile 210 215 220			672
	gag att aac gca tat gac gcg aag gga aac gac ttg gcc gtc act tca Glu Ile Asn Ala Tyr Asp Ala Lys Gly Asn Asp Leu Ala Val Thr Ser 225 230 235 240			720
50	acc gag act ggg gag gat gga ctg ctc ccc ttt atg gag gtg aaa ata Thr Glu Thr Gly Glu Asp Gly Leu Leu Pro Phe Met Glu Val Lys Ile 245 250 255			768
55	tca gag ggc cca aaa cga atc cgg agg gac tcc gga ctg gac tgc gat Ser Glu Gly Pro Lys Arg Ile Arg Arg Asp Ser Gly Leu Asp Cys Asp 260 265 270			816
60				
65				



# ES 2 344 734 T3

	Val	Leu	Gly	Asp	Asp	Ser	Lys	Asp	Gly	Ala	Val	Glu	Glu	Asp	Asp	Glu
				100					105					110		
5	His	Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Met	Thr	Met	Ala	Thr	Glu	Pro	Asp	Pro
			115					120					125			
10	Ile	Val	Gln	Val	Asp	Arg	Lys	Pro	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Ser	Phe	Ser
		130					135					140				
15	Pro	Lys	Ile	Gln	Ala	Asn	Arg	Ile	Val	Arg	Ala	Gln	Leu	Trp	Val	His
	145					150					155					160
20	Leu	Arg	Pro	Ala	Glu	Glu	Ala	Thr	Thr	Val	Phe	Leu	Gln	Ile	Ser	Arg
					165					170					175	
25	Leu	Met	Pro	Val	Lys	Asp	Gly	Gly	Arg	His	Arg	Ile	Arg	Ser	Leu	Lys
				180					185					190		
30	Ile	Asp	Val	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Ser	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val	Lys
			195					200						205		
35	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Thr	Asn	Arg	Gly	Ile
		210					215					220				
40	Glu	Ile	Asn	Ala	Tyr	Asp	Ala	Lys	Gly	Asn	Asp	Leu	Ala	Val	Thr	Ser
	225					230					235					240
45	Thr	Glu	Thr	Gly	Glu	Asp	Gly	Leu	Leu	Pro	Phe	Met	Glu	Val	Lys	Ile
					245					250					255	
50	Ser	Glu	Gly	Pro	Lys	Arg	Ile	Arg	Arg	Asp	Ser	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp
				260					265					270		
55	Glu	Asn	Ser	Ser	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val	Asp
								280					285			
60	Phe	Glu	Asp	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr	Lys
		290					295					300				
65	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Asp	Tyr	Met	Tyr	Leu	Gln	Lys	Tyr
	305					310					315					320
70	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	Asn	Lys	Ala	Ser	Pro	Arg	Gly	Thr	Ala	Gly
					325						330				335	
75	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr	Phe

# ES 2 344 734 T3

	340	345	350
5	Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ser Met Val Val 355	360	365
10	Asp Arg Cys Gly Cys Ser 370		
15	<210> 9 <211> 50 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 9		
20	Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu 1	5	10 15
25	Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser 20	25	30
30	Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met 35	40	45
35	Pro Thr 50		
40	<210> 10 <211> 50 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> Porción peptídica mutante de miostatina humana <400> 10		
45	Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu 1	5	10 15
50	Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Gln Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser 20	25	30
55	Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met 35	40	45
60	Pro Thr 50		
65	<210> 11 <211> 50 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220>		

# ES 2 344 734 T3

<223> Porción peptídica mutante de miostatina humana

<400> 11

```

5      Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu
      1              5              10              15

10     Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Ala Asp Ser Ser Asp Gly Ser
      20              25              30

15     Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met
      35              40              45

      Pro Thr
      50
  
```

<210> 12

<211> 40

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

```

30     Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr
      1              5              10              15

      Asp Val Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp
      20              25              30

35     Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile
      35              40
  
```

40 <210> 13

<211> 40

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Porción peptídica mutante de miostatina humana

50 <400> 13

```

      Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr
      1              5              10              15

55     Asp Val Gln Gln Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp
      20              25              30

      Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile
      35              40
  
```

<210> 14

<211> 40

65 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

## ES 2 344 734 T3

<220>

<223> Porción peptídica mutante de miostatina humana

5 <400> 14

Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr  
1 5 10 15

10

Asp Val Gln Arg Ala Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp  
20 25 30

15

Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile  
35 40

<210> 15

20 <211> 30

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 15

Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp  
1 5 10 15

30

Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala  
20 25 30

35

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

40

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Porción peptídica mutante de miostatina humana

<400> 16

Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Gln Asp  
1 5 10 15

50

Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala  
20 25 30

55

<210> 17

<211> 30

60 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Porción peptídica mutante de miostatina humana

# ES 2 344 734 T3

<400> 17

Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Ala  
1                    5                    10                    15

5

Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala  
                  20                    25                    30

<210> 18

10

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 18

Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly  
1                    5                    10                    15

20

Ser Leu Glu Asp  
                  20

25

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Porción peptídica mutante de miostatina humana

35

<400> 19

Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Gln Asp Asp Ser Ser Asp Gly  
1                    5                    10                    15

40

Ser Leu Glu Asp  
                  20

<210> 20

45

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Porción peptídica mutante de miostatina humana

<400> 20

55

Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Ala Asp Ser Ser Asp Gly

1                    5                    10                    15

60

Ser Leu Glu Asp  
                  20

65

<210> 21

<211> 10

# ES 2 344 734 T3

<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 21  
Tyr Asp Val Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp  
1 5 10

10 <210> 22  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Porción peptídica mutante de miostatina humana

20 <400> 22  
Tyr Asp Val Gln Gln Asp Asp Ser Ser Asp  
1 5 10

25 <210> 23  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Porción peptídica mutante de miostatina humana

35 <400> 23  
Tyr Asp Val Gln Arg Ala Asp Ser Ser Asp  
1 5 10

40

45

50

55

60

65