



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 126**

51 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01961756 .2**

96 Fecha de presentación : **26.07.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1317485**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2003**

54 Título: **Antagonistas de la miostatina y sus usos.**

30 Prioridad: **27.07.2000 US 626896**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.08.2011

73 Titular/es:
**The Johns Hopkins University School of Medicine
100 N. Charles Street, 5th Street
Baltimore, Maryland 21201, US**

72 Inventor/es: **Lee, Se-Jin y
McPherron, Alexandra, C.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Antagonistas de la miostatina y sus usos

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere en general a los receptores de factor de diferenciación del crecimiento (GDF), y más específicamente a receptores de GDF-8 (miostatina), a composiciones que afectan a la transducción de la señal de miostatina en una célula, y a procedimientos de uso de tales composiciones para modular la transducción de la señal de miostatina en una célula.

Información antecedente

- 10 La cantidad de tiempo, esfuerzo y gasto de dinero en los Estados Unidos cada año por el intento de los individuos de perder peso es asombroso. Para muchos de estos individuos, el objetivo no es solamente tener un aspecto mejor, sino más importantemente evitar los problemas médicos inevitables asociados a estar con sobrepeso.

- 15 Más de la mitad de la población de adultos en los Estados Unidos se considera que tiene sobrepeso. Además, veinte a treinta por ciento de los hombres adultos y treinta a cuarenta por ciento de las mujeres adultas en los Estados Unidos se consideran obesas, produciéndose las mayores tasas entre los pobres y minorías. La obesidad, que se define por ser al menos aproximadamente veinte por ciento por encima del nivel medio de adiposidad, se ha incrementado de manera notable con frecuencia durante las pasadas pocas décadas y llega a ser un problema principal entre la población pediátrica. El veinte por ciento de todos los niños se consideran ahora con sobrepeso, un número que representa el doble de los pasados cinco años.

- 20 La obesidad y los problemas médicos directamente atribuibles a ella son una causa principal de morbilidad y mortalidad en el mundo. Obesidad es un factor de riesgo principal para el desarrollo de diversas afecciones patológicas, que incluyen aterosclerosis, hipertensión, infarto de miocardio, diabetes de tipo II, enfermedad de la vesícula biliar, y ciertos cánceres, y contribuye a la muerte prematura. El infarto de miocardio es la causa principal de mortalidad en los Estados Unidos, y la diabetes de tipo II afecta a más de 16 millones de personas en los Estados Unidos y es una de las causas principales de muerte por enfermedad.

- 25 Más de un ochenta por ciento de diabetes de tipo II se produce en las personas obesas. Aunque la diabetes de tipo II afecta a todas las razas, es particularmente corriente entre los americanos nativos, afroamericanos e hispanos. De manera significativa, la diabetes de tipo II, que usualmente se produce casi exclusivamente en adultos por encima de los cuarenta años, ahora se produce en niños, con casos reseñados que casi son el triple de los últimos cinco años. La diabetes de tipo II, también llamada diabetes no insulino dependiente, se caracteriza por secreción de insulina en respuesta a la glucosa y por resistencia del cuerpo a la acción de insulina, incluso aunque los niveles de insulina en la circulación en general son normales o elevados. La diabetes de tipo II afecta a la función de una diversidad de tejidos diferentes y órganos y puede conducir a enfermedad vascular, insuficiencia renal, retinopatía y neuropatía.

- 35 Al contrario que los problemas médicos asociados a obesidad, la pérdida de peso severa que se produce comúnmente en pacientes con ciertas enfermedades crónicas también presenta un desafío a la intervención médica. La base molecular para esta pérdida de peso, denominada caquexia, no está bien entendida. Sin embargo es evidente, que la caquexia complica el tratamiento de tales enfermedades y está asociada a una escasa prognosis para los pacientes. Los efectos de caquexia son evidentes en el síndrome de debilitamiento que se produce en pacientes de cáncer y SIDA.

- 40 Aunque se han hecho grandes esfuerzos en el intento de elucidar los procesos biológicos implicados en la regulación del peso de cuerpo, los resultados han proporcionado más ruido que valor real. Por ejemplo, el descubrimiento de la leptina se ha aclamado como un gran adelanto en el entendimiento de la base molecular para la acumulación de grasa en seres humanos, y, con ello, la promesa de una cura para la obesidad. Estudios en animales indicaron que la leptina está implicada en la transmisión de señales internas que regulan el apetito, y sugieren que la leptina podría ser útil para el tratamiento de seres humanos que padecen obesidad. El progreso en el uso de leptina para tratar obesidad ha sido lento, sin embargo, y, hasta la fecha, la leptina no ha conseguido expectativas iniciales.

- 50 El tratamiento de la obesidad mórbida actualmente está limitado a cirugía para eliminar partes de intestino, reduciendo por lo tanto las cantidades de alimentos (y calorías) absorbidas. Para el obeso moderado, el único "tratamiento" es comer una dieta sana y ejercicio regular, un procedimiento que ha mostrado un éxito modesto en el mejor de los casos. De este modo, existe una necesidad de identificar los factores biológicos implicados en la regulación del peso corporal, incluyendo desarrollo de músculo y acumulación de grasa, de manera que los procedimientos para tratar trastornos tales como la obesidad y caquexia se puedan desarrollar. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona ventajas adicionales.

En la técnica anterior,

- El documento US-A-5827733 describe el uso de ácidos nucleicos, por ejemplo, ácidos nucleicos no codificantes que inhiben la expresión de GDF-8 para tratar enfermedades mediadas por GDF-8.

5 • El documento WO 99/40181 describe un procedimiento para inhibir el crecimiento anormal de músculo, hueso o tejido adiposo mediante la administración de inhibidores de GDF-8.

- El documento WO 99/06559 describe polipéptido del receptor de GDF-8, así como polinucleótido del receptor de GDF-8 y anticuerpos del receptor anti-GDF-8.

10 • Zhu et al, FEBS Letters 474 (2000); 71-75 describe ratones transgénicos que expresan miostatina mutada en su sitio de escisión bajo el control de un promotor específico de músculo que crea una miostatina negativa dominante. Los ratones muestran un incremento significativo en la masa muscular.

- El documento WO 99/45949 describe que la follistatina puede modular la actividad de GDF-8.

- Sutrave et al, Gene 241 (2000); 107-116 describe que el gen c-ski de pollo expresa al menos tres mensajes de ajuste alternativo. Dos de éstos parecen inducir el desarrollo de un fenotipo muscular en ratones transgénicos.

Sumario de la invención

15 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* de reducción o inhibición de un efecto de miostatina sobre una célula, que comprende poner en contacto la célula con un prodominio de miostatina que afecta a la transducción de la señal de miostatina en la célula mediante alteración de una interacción específica de miostatina con un receptor de miostatina expresado por la célula, en el que el prodominio de miostatina

(a) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:

20 restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 10;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 12;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 18;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 14; y
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 16, o

25 (b) está constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:

restos de aminoácidos 20 a 263 como se expone en la SEC ID N°: 4;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 2;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 8;
restos de aminoácidos 20 a 263 como se expone en la SEC ID N°: 6; y
30 restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 20.

El receptor de miostatina puede ser un receptor de activina, que puede ser un receptor de activina de tipo IIB. La célula puede estar comprendida en tejido muscular y puede ser una célula de un organismo eucariótico. El organismo eucariótico puede ser un organismo vertebrado, por ejemplo seleccionado entre el grupo que consta de un bovino, ovino, porcino, canino, felino, murino, e ictícola. De manera alternativa, el organismo eucariótico puede ser un organismo invertebrado, tal como un molusco.

35 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un agente que comprende un prodominio de miostatina constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:

restos de aminoácidos 20 a 263 como se expone en la SEC ID N°: 4;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 2;
40 restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 10;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 12;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 8;
restos de aminoácidos 20 a 263 como se expone en la SEC ID N°: 6;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 18;
45 restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 14;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 16; y
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 20

para incrementar el crecimiento de tejido muscular en un sujeto;

inhibiendo o reduciendo el agente la transducción de la señal de miostatina en una célula muscular, y

50 siendo el agente para mejorar la gravedad de afección patológica caracterizada, al menos en parte, por una

cantidad, desarrollo o actividad metabólica anormal de músculo o tejido adiposo en un sujeto y seleccionada entre el grupo constituido por caquexia, anorexia, distrofia muscular y una enfermedad neuromuscular.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona el uso de un agente que comprende un prodominio de miostatina constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:

- 5 restos de aminoácidos 20 a 263 como se expone en la SEC ID N°: 4;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 2;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 10;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 12;
 - 10 restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 8;
restos de aminoácidos 20 a 263 como se expone en la SEC ID N°: 6;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 18;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 14;
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 16; y
restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 20
 - 15 en la fabricación de un medicamento para incrementar el crecimiento de tejido muscular en un sujeto, en el que el agente inhibe o reduce la transducción de la señal de miostatina en una célula muscular, y en el que el agente es para mejorar la gravedad de una afección patológica caracterizada, al menos en parte, por una cantidad, desarrollo o actividad metabólica anormal de músculo o tejido adiposo en un sujeto y seleccionada entre el grupo constituido por caquexia, anorexia, distrofia muscular y una enfermedad neuromuscular.
 - 20 En el presente documento se describe un receptor de GDF purificado sustancialmente que puede ser, por ejemplo un receptor de miostatina, un receptor de GDF-11, u otro receptor de GDF. Un receptor de miostatina, por ejemplo, interactúa específicamente al menos con la miostatina, y también puede interactuar específicamente con uno o unos pocos péptidos de GDF maduros adicionales también. También se describen polinucleótidos que codifican un receptor de GDF, anticuerpos que específicamente interactúan con un receptor de GDF, y similares.
 - 25 Un efecto de un GDF se puede modular afectando a la transducción de la señal efectuada por el GDF. A modo de ejemplo, un efecto de miostatina sobre una célula se puede modular poniendo en contacto la célula con un agente que efectúa la transducción de la señal de miostatina en la célula. El agente puede alterar una interacción específica de miostatina con un receptor de miostatina expresado por la célula, modulando por lo tanto la transducción de la señal de miostatina en la célula. El receptor de miostatina puede ser un receptor de activina, o
 - 30 puede ser cualquier otro receptor que se pueda poner en contacto por su parte de péptido de miostatina o funcional maduro de manera que la transducción de la señal de miostatina se activa. De manera alternativa, el agente se puede unir a un receptor de miostatina, potenciando por lo tanto la unión de miostatina al receptor o que compete con miostatina por el receptor. Como tal, el agente puede incrementar la transducción de la señal de miostatina, o puede reducir o inhibir la transducción de la señal de miostatina. En una alternativa adicional, el agente puede
 - 35 actuar intracelularmente para alterar la transducción de la señal de miostatina en la célula.
- Un agente útil para modular la transducción de la señal de GDF en una célula puede ser un péptido, un mimético de péptido, un polinucleótido, una molécula orgánica pequeña, o cualquier otro agente, y puede actuar como un agonista de la transducción de la señal de GDF o como un antagonista de la transducción de la señal de GDF. El agente peptídico puede alterar una interacción específica de miostatina con un receptor de miostatina. Tal agente
- 40 peptídico puede ser, por ejemplo, un péptido que se une o de otra manera secuestra miostatina, afectando por lo tanto a la capacidad de la miostatina de interactuar específicamente con su receptor. Tales agentes se ejemplifican por un receptor de miostatina mutante, por ejemplo, un dominio extracelular soluble de un receptor de miostatina, que puede específicamente interactuar con la miostatina; por un prodominio de miostatina, que puede específicamente interactuar con miostatina; y por un polipéptido de v mutante que es resistente a escisión
 - 45 proteolítica en un prodominio y miostatina madura y puede interactuar específicamente con miostatina, y son útiles como antagonistas de la transducción de la señal de miostatina, que reducen o inhiben la transducción de la señal de miostatina en una célula.
- El agente peptídico puede interactuar específicamente con un receptor de miostatina expresado por una célula, compitiendo por lo tanto con miostatina por el receptor. Tal agente peptídico se ejemplifica por un anticuerpo anti -
- 50 receptor de miostatina o por un anticuerpo antiidiotípico de un anticuerpo anti-miostatina. Tal agente peptídico proporciona la ventaja adicional que se puede seleccionar no solamente por su capacidad de interactuar específicamente con un receptor de miostatina, compitiendo por lo tanto con miostatina para el receptor, pero se puede además seleccionar para que tenga una capacidad de no activar o no activar la transducción de la señal de miostatina. De este modo, un agente peptídico que interactúa específicamente con un receptor de miostatina
 - 55 expresado por una célula, y activa la transducción de la señal dependiente de miostatina se puede usar como un agonista de miostatina para incrementar la transducción de la señal de miostatina en la célula, mientras un agente peptídico que interactúa específicamente con un receptor de miostatina expresado por una célula, pero no activa la

transducción de la señal de miostatina se puede usar como un antagonista de miostatina para reducir o inhibir la transducción de la señal de miostatina en la célula.

Un agente útil en un procedimiento de modulación de un efecto de un GDF también puede ser un polinucleótido. En general, pero no necesariamente, el polinucleótido se introduce en la célula, donde efectúa su función o bien directamente, o después de la transcripción o traducción o ambas. Por ejemplo, el agente polinucleotídico puede codificar un péptido, que se expresa en la célula y modula la actividad de miostatina. Tal péptido expresado puede ser, por ejemplo, un receptor de miostatina mutante tal como un dominio de receptor de miostatina extracelular soluble; un dominio de receptor de miostatina extracelular asociado de manera operativa con un dominio de anclaje a membrana; o un receptor de miostatina mutante que carece de actividad proteína quinasa.

Un péptido expresado de un agente polinucleotídico también puede ser un péptido que afecta al nivel o actividad de un componente de polipéptido intracelular de una ruta de transducción de la señal de GDF. Los polipéptidos intracelulares pueden ser, por ejemplo, un polipéptido Smad tal como un Smad negativo dominante, que, como se describe en el presente documento, puede afectar a la transducción de la señal de miostatina en una célula. De este modo, un agente polinucleotídico puede codificar polipéptido Smad 2, Smad 3 o Smad 4 negativo dominante, que tras la expresión en la célula, reduce o inhibe la transducción de la señal de miostatina en la célula; o puede codificar un polipéptido Smad 6 o Smad 7, que, tras la expresión, disminuye la transducción de la señal de miostatina en la célula. Un agente polinucleotídico también puede codificar un polipéptido c-ski intracelular, la expresión de la cual puede reducir o inhibir la transducción de la señal de miostatina.

Un agente polinucleotídico útil en un procedimiento de modulación de un efecto de un GDF también puede ser, o puede codificar, una molécula no codificante, una ribozima o un agente de formación de tríplex. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser (o puede codificar) una secuencia de nucleótidos no codificante secuencia tal como una secuencia de nucleótidos c-ski no codificante, que pueden incrementar la transducción de la señal de miostatina en una célula; o una secuencia de nucleótidos Smad no codificante, que puede incrementar la transducción de la señal de miostatina o puede reducir o inhibir la transducción de la señal de miostatina, dependiendo de la secuencia de nucleótidos Smad no codificante particular.

También se describe en el presente documento un procedimiento de mejora de la gravedad de una afección patológica, que se caracteriza, al menos en parte, por una cantidad, desarrollo o actividad metabólica anormal de músculo o tejido adiposo en un sujeto. Tal procedimiento abarca la modulación de la transducción de la señal de GDF en una célula asociada a la afección patológica, por ejemplo, modulación de la transducción de la señal de miostatina en una célula muscular o una célula de tejido adiposo en el sujeto. Diversas afecciones patológicas son capaces de mejorar usando tal procedimiento, que incluye por ejemplo, trastornos debilitantes tales como caquexia, anorexia, distrofias musculares; enfermedades neuromusculares; y trastornos metabólicos tales como obesidad y diabetes de tipo II.

Se describe en el presente documento un procedimiento de modulación del crecimiento de tejido muscular o tejido adiposo en un organismo eucariótico mediante la administración al organismo de un agente que afecta a la transducción de la señal mediada por un receptor de GDF. El procedimiento se puede realizar mediante la administración de un agente que afecta a la transducción de la señal de miostatina y / o transducción de la señal de GDF-11. El agente puede ser, por ejemplo, un agente que altera a la interacción específica de miostatina con un receptor de miostatina, un agente que reduce o inhibe la interacción específica de miostatina con un receptor de miostatina, o cualquier otro agente como se describe en el presente documento. El organismo eucariótico puede ser un vertebrado, por ejemplo, mamífero, ave u organismo ictilo, o puede ser un invertebrado, por ejemplo, un molusco tal como un camarón, una vieira, un calamar, un pulpo, un caracol, o una babosa.

También se describe en el presente documento un procedimiento de identificación de un agente que interactúe específicamente con un receptor de factor de diferenciación de crecimiento (GDF). Tal ensayo de selección se puede determinar, por ejemplo, poniendo en contacto un receptor de GDF con un agente de ensayo, y determinando que el agente de ensayo interactúa específicamente con el receptor de GDF, identificando por lo tanto un agente que interactúa específicamente con un receptor de GDF. El receptor de GDF puede ser cualquier receptor de GDF, particularmente un receptor de miostatina, y el agente puede ser un receptor de agonista de GDF que incrementa la transducción de la señal de GDF o un receptor de antagonista de GDF, que reduce o inhibe la transducción de la señal de GDF. Tal procedimiento es útil para la selección de una genoteca de los agentes de ensayo, particularmente genoteca de combinación de los agentes de ensayo.

Una representación virtual de un receptor de GDF o una parte de péptido funcional de un receptor de GDF, por ejemplo, una representación virtual de un receptor de GDF 8 o receptor de GDF-11 se describe en el presente documento. La representación virtual puede incluir un agente que interactúa específicamente con un receptor de GDF.

Como tal, un agente que interactúa específicamente con un receptor del factor de diferenciación de crecimiento de

(GDF) o una parte de péptido funcional de un receptor de GDF se puede identificar mediante el uso de un sistema de ordenador. Por ejemplo, el procedimiento se puede realizar mediante ensayo de un agente de ensayo virtual por la capacidad de interactuar específicamente con un receptor de GDF virtual o su parte de péptido funcional; y detectar una interacción específica del agente de ensayo virtual con el receptor de GDF virtual o su parte de péptido funcional, identificando por lo tanto un agente que interactúa específicamente con un receptor de GDF o su parte de péptido funcional.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos de promiostatina murina (SEC ID N°: 4); promiostatina de rata (SEC ID N°: 6); promiostatina humana (SEC ID N°: 2); promiostatina de babuino (SEC ID N°: 10); promiostatina de bovino (SEC ID N°: 12); promiostatina porcina (SEC ID N°:14); promiostatina de ovino (SEC ID N°: 16); promiostatina de pollo (SEC ID N°: 8), promiostatina de pavo (SEC ID N°: 18); y promiostatina de pez cebra (SEC ID N°: 20). Los aminoácidos están numerados con relación a la promiostatina humana (SEC ID N°: 2). Las líneas de rayas indican huecos introducidos para maximizar la homología. Los restos idénticos entre las secuencias están sombreados.

La figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos de promiostatina murina (SEC ID N°: 4) y promiostatina de pez cebra (SEC ID N°: 20), y partes de las secuencias de aminoácidos del alelo 1 de promiostatina de salmón (SEC ID N°: 27; "salmón 1") y del alelo 2 de promiostatina de salmón (SEC ID N°: 29; "salmón 2"). La posición de aminoácidos relativa a promiostatina humana se indica a la izquierda de cada fila (compárese con la figura 1; primer aminoácido de salmón) corresponde a promiostatina humana 218; primer aminoácido de salmón 2 corresponde a promiostatina humana 239). Las líneas de rayas indican huecos introducidos para maximizar la homología. Las posiciones relativas de aminoácidos, incluyendo huecos, se indica a lo largo de la parte superior de cada fila. Los restos idénticos entre las secuencias están sombreados.

Descripción detallada de la invención

Se describe en el presente documento una parte de péptido sustancialmente purificado de un polipéptido promiostatina. La promiostatina, que se ha denominado previamente como factor-8 de diferenciación de crecimiento (GDF-8), comprende un prodominio amino terminal y un péptido miostatina madura C-terminal (véase la patente de Estados Unidos N° 5.827.733). La actividad de la miostatina se efectúa mediante péptido de miostatina madura después de su escisión de promiostatina. De este modo, la promiostatina es un polipéptido precursor que se escinde proteolíticamente para producir miostatina activa. Como se describe en el presente documento, el prodominio de miostatina puede inhibir la actividad de la miostatina, actividad de GDF-11, o ambas.

También se describe en el presente documento una parte de péptido sustancialmente purificada de un polipéptido pro-GDF-11. Pro-GDF-11, que previamente se ha denominado en general como GDF-11, comprende un prodominio amino terminal y un péptido GDF-11 maduro C-terminal (véase la solicitud de Patente Internacional N° WO 98/35019). La actividad de GDF-11 se efectúa por el péptido GDF-11 maduro después de su escisión de pro-GDF-11. De este modo, pro-GDF-11, como promiostatina, es un polipéptido precursor que está escindido proteolíticamente para producir GDF-11 activo. Como se describe en el presente documento, el prodominio GDF-11 puede inhibir la actividad de GDF-11, la actividad de miostatina, o ambas.

La promiostatina y el pro-GDF-11 son miembros de la superfamilia del factor ϑ de transformación (TGF- ϑ) que consta de polipéptidos multifuncionales que controlan la proliferación, diferenciación, y otras funciones en diversos tipos de células. La superfamilia de TGF- ϑ , que abarca un grupo de proteínas relacionadas estructuralmente que afectan a un amplio intervalo de procesos de diferenciación durante el desarrollo embrionario, incluye, por ejemplo, sustancia del inhibidor Muleriano (MIS), que se requiere para el desarrollo normal del sexo masculino (Behringer et al., Nature 345: 1.67, 1990), producto génico de Drosophila decapentaplegic (DPP), que se requiere para la formación del eje dorsal-ventral y morfogénesis de los discos imaginales (Padgett et al., Nature 325: 81 - 84, 1987), el producto génico Vg-1 de Xenopus, que se encuentra en el polo vegetativo de los óvulos (Weeks et al., Cell 51: 861 - 867, 1987), las activinas (Mason et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 135:957-964, 1986), que pueden inducir la formación de mesodermo y estructuras anteriores en embriones de Xenopus (Thomsen et al., Cell 63:485, 1990), y las proteínas morfogénicas de hueso (BMP, osteogenina, OP-1), que puede inducir la formación de novo de cartílago y hueso (Sampath et al., J. Biol. Chem. 265:13198, 1990). Los miembros de la familia de TGF- ϑ pueden influenciar una diversidad de procesos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, hematopoyesis, y diferenciación de células epiteliales (Massague, Cell 49: 437, 1987; Massague, Ann. Rev. Biochem. 67: 753 - 791, 1998).

Muchos de los miembros de la familia de TGF- ϑ tienen efectos reguladores (positivos o negativos) sobre otros factores de crecimiento de péptido. En particular ciertos miembros de la superfamilia de TGF- ϑ tienen patrones de expresión o posee actividades que se relacionan con la función del sistema nervioso. Por ejemplo, las inhibinas y activinas se expresan en el cerebro (Meunier et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85: 247, 1988; Sawchenko et al.,

Nature 334: 615, 1988), y la activina puede funcionar como una molécula de supervivencia de la célula nerviosa (Schubert et al., Nature 344: 868, 1990). Otro miembro de la familia, el factor -1 de diferenciación de crecimiento (GDF-1), es específico del sistema nervioso en su patrón de expresión (Lee, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88: 4250, 1991), y otros miembros de la familia tal como Vgr-1 (Lyons et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86: 4554, 1989; Jones et al., Development 111: 531, 1991), OP-1 (Ozkaynak et al., J. Biol. Chem. 267: 25220, 1992), y BMP-4 (Jones et al., Development 111: 531, 1991), también se expresan en el sistema nervioso. Debido a que el músculo esquelético produce un factor o factores que promueven la supervivencia de neuronas motoras (Brown, Trends Neurosci. 7: 10, 1984), la expresión de miostatina (GDF-8) y GDF-11 en músculo sugiere que la miostatina y GDF-11 pueden ser factores tróficos para las neuronas. Como tal, la modulación de la miostatina, GDF-11, o ambos pueden ser útiles para tratar enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis lateral amiotrófica o distrofia muscular, o para mantener las células o tejidos en cultivo antes de trasplante.

Las proteínas de la familia de TGF- β se sintetizan como grandes proteínas precursoras, que posteriormente se someten a escisión proteolítica en un racimo de restos básicos aproximadamente 110 a 140 aminoácidos desde el extremo C, que da como resultado la formación de un péptido prodominio y un péptido C-terminal maduro. Los péptidos C-terminal maduros de los miembros de esta familia de proteínas están relacionados estructuralmente, y los miembros de la familia diferentes se pueden clasificar en subgrupos distintos basándose en el grado de su homología. Aunque las homologías dentro de los subgrupos particulares varían entre 70% y 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, las homologías entre los subgrupos son significativamente menores, variando en general entre 20% y 50%. En cada caso, las especies activas parecen ser un dímero unido a disulfuro de fragmentos de péptido C-terminal.

La promiostatina y los polipéptidos pro-GDF-11 se han identificado en especies de mamífero, aves e ictícolas, y la miostatina es activa en diversas especies diferentes, que incluyen vertebrados e invertebrados. Durante el desarrollo embrionario y en animales adultos, la miostatina, por ejemplo, se expresa específicamente por las células en el linaje miogénico (McPherron et al., Nature 387: 83 - 90, 1997). Durante la embriogénesis temprana, la miostatina se expresa por las células en el compartimiento de miotoma de desarrollo algunas veces. En las últimas fases embrionarias y en animales adultos, la miostatina se expresa ampliamente en el tejido muscular esquelético, aunque los niveles de expresión pueden variar considerablemente de músculo a músculo. La expresión de miostatina, también se detecta en tejido adiposo, aunque a menores niveles que en el músculo. De manera similar, GDF-11 se expresa en el músculo esquelético y tejido adiposo, así como en tipo, bazo y útero, de adultos y también se expresa en el cerebro en diversas fases de desarrollo.

Los polipéptidos de promiostatina de diversas especies comparten la identidad de secuencia sustancial, y las secuencias de aminoácidos de la secuencia C-terminal de miostatina madura de ser humano, murina, rata y pollo son 100% idénticas (véase la Figura 1). Los polipéptidos de promiostatina se ejemplifican en el presente documento (véase Figura 1) por promiostatina humana (SEC ID N°: 2); promiostatina murina (SEC ID N°: 4); promiostatina de rata (SEC ID N°: 6); promiostatina de babuino (SEC ID N°: 10); promiostatina bovina (SEC ID N°: 12); promiostatina porcina (SEC ID N°: 14); promiostatina ovina (SEC ID N°: 16); promiostatina de pollo (SEC ID N°: 8), promiostatina de pavo, (SEC ID N°: 18); y promiostatina de pez cebra (SEC ID N°: 20). Los polipéptidos de promiostatina también se ejemplifican en el presente documento por un polipéptido que comprende las partes de alelo 1 de salmón (SEC ID N°: 27; "salmón 1") y de alelo 2 de salmón (SEC ID N°: 29; "salmón 2"; véase Figura 2). Las moléculas de ácido nucleico que codifican estos polipéptidos de promiostatina también se describen en el presente documento como las SEC ID N°s: 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 7, 17, 19, 26 y 28, respectivamente (véase, también, McPherron y Lee, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94: 12457, 1997). Un polipéptido pro-GDF-11 se ejemplifica en el presente documento por pro-GDF-11 humano (SEC ID N°: 25), que está codificado por la SEC ID N°: 24.

En vista de la conservación extensiva entre los polipéptidos de promiostatina, particularmente entre las especies tan diversas como seres humanos y peces, sería una materia rutinaria obtener polinucleótidos que codifiquen miostatina de cualquier especie, incluyendo los restos de las secuencias de salmón 1 y salmón 2, y para identificar la expresión de promiostatina o miostatina en cualquier especie. En particular, la secuencia de miostatina madura comparte una homología significativa con los otros miembros de la superfamilia de TGF- β , y la miostatina contiene la mayoría de los restos que están altamente conservados entre los otros miembros de la familia y en otras especies. Además, miostatina, como las TGF- β y las inhibinas β , contienen un par extra de restos de cisteína además de los siete restos de cisteína presentes en todos los otros miembros de la familia virtualmente. Miostatina es la más homóloga a Vgr-1 (45% de identidad de secuencia). Como otros miembros de la superfamilia de TGF- β , miostatina se sintetiza como un polipéptido de promiostatina precursor mayor que se escinde proteolíticamente en un péptido de miostatina activo.

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de promiostatina de diversos organismos se pueden identificar usando procedimientos bien conocidos y algoritmos basados en la identidad (u homología) con las secuencias descritas. La homología o identidad se mide a menudo usando software de análisis de secuencias tal como el paquete Software de Análisis de Secuencias del Grupo de Ordenadores de Genética (Centro de Biotecnología de la

Universidad de Wisconsin, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Tal software empareja secuencias similares mediante la asignación de grados de homología a diversas supresiones, sustituciones y otras modificaciones. Los términos "homología" e "identidad," cuando se usa en el presente documento en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptido, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas que tienen un porcentaje de restos de aminoácidos o de nucleótidos especificado que son los mismos cuando se comparan y se alinean para máxima correspondencia sobre una ventana de comparación o región diseñada como se mide usando cualquier número de algoritmos de comparación de secuencia o mediante alineación manual e inspección visual.

Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, las coordenadas de subsecuencias se designan, si es necesario, y los parámetros de programa de algoritmo de secuencia se designan. Se pueden usar parámetros del programa por defecto, o se pueden designar parámetros alternativos. Después el algoritmo de comparación de secuencia calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de ensayo con relación a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

El término "ventana de comparación" se usa ampliamente en el presente documento para incluir referencia a un segmento de cualquiera del número de posiciones contiguas, por ejemplo, aproximadamente 20 a 600 posiciones, por ejemplo, posición de aminoácido o nucleótido, usualmente aproximadamente 50 a aproximadamente 200 posiciones, más usualmente aproximadamente 100 a aproximadamente 150 posiciones, en las que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después que las dos secuencias se han alineado de manera óptima. Los procedimientos de alineación de secuencia para comparación se conocen bien en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970), por la investigación para el procedimiento de similitud de Person y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85: 2444, 1988); por implementaciones de ordenador de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Genética de Wisconsin Genetics Package, Grupo de Ordenadores de Genética, 575 Science Dr., Madison, WI); o por inspección de alineación manual y visual. Otros algoritmos para determinar la homología o identidad incluyen, por ejemplo, además de un programa BLAST (Herramienta de Investigación de Alineación Local del Centro Nacional para la Información Biológica), ALIGN, AMAS (Análisis de Múltiples Alineaciones de Secuencias), AMPS (Alineación de Secuencias Múltiples), ASSET (herramienta de Evaluación Estadística de Segmentos Alineados), BANDS, BESTSCOR, BIOSCAN (Nudo de análisis Comparativo de Secuencias Biológicas), BLIMPS (Investigador Mejorado de Bloques), FASTA, Intervals & Points, BMB, CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, Smith-Waterman algoritmo, DARWIN, Las Vegas algoritmo, FNAT (Forced Nucleótido Alignment Tool), Framealign, Framesearch, DYNAMIC, FILTER, FSAP (Paquete de análisis de Secuencias de Fristensky), GAP (Programa de Alineación Global), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC (Comparación de Secuencias Sensibles), LALIGN (Alineación de Secuencia Local), LCP (Programa de Contenido Local), MACAW (Construcción de Alineación Múltiple y Banco de Trabajo de Análisis), MAP (Programa de alineación Múltiple), MBLKP, MBLKN, PIMA (Alineación de Multi secuencias Inducida por Patrón), SAGA (Alineación de Secuencias por Algoritmo Genético) y WHAT-IF. Tales programas de alineación también se pueden usar para seleccionar bases de datos de genomas para identificar secuencias de polinucleótidos que tienen sustancialmente secuencias idénticas.

Una serie de bases de datos de genomas están disponibles para comparación, que incluye, por ejemplo, una parte sustancial del genoma humano está disponible como parte del Proyecto de Secuenciación del Genoma Humano (J. Roach, http://weber.u.washington.edu/~roach/human_genome_progress_2.html). Además, al menos veintidós genomas se han secuenciado en su totalidad, incluyendo, por ejemplo, *M. genitalium*, *M. jannaschii*, *H. influenzae*, *E. coli*, levadura (*S. cerevisiae*), y *D. melanogaster*. También se ha realizado un progreso significativo en la secuenciación de genomas de organismo modelo tales como ratón, *C. elegans*, y *Arabidopsis sp.* Varias bases de datos que contienen información genómica anotada con alguna información funcional se mantienen por diferentes organizaciones, y están accesible por Internet, por ejemplo, <http://www.tigr.org/tdb>; <http://www.genetics.wisc.edu>; <http://genome-www.stanford.edu/~ball>; <http://hiv-web.lanl.gov>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.ebi.ac.uk>; <http://Pasteur.fr/other/biology>; y <http://www.genome.wi.mit.edu>.

Un ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST y BLAST 2.0, que se describen por Altschul et al. (Nucleic Acids Res. 25:3389 - 3402, 1997; J. Mol. Biol. 215: 403 - 410, 1990). Software para realizar análisis de BLAST está disponible públicamente mediante el Centro Nacional de Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Este algoritmo implica una primera identificación de pares de secuencia de alta puntuación (HSP) mediante la identificación de palabras de corta longitud *W* en la secuencia de consulta, que o bien coincide o satisface al alguna puntuación *T* umbral de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. *T* se refiere al umbral de la puntuación de la palabra vecina (Altschul et al., supra, 1977, 1990). Estos aciertos de la palabra vecina inicial actúan como semillas para iniciar

investigaciones para encontrar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia para en la medida que sea posible se pueda incrementar. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. Extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineación acumulada disminuye en la cantidad X de su valor máximo logrado; la puntuación acumulada llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de puntuación; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros W, T, y X de algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como defectos una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defectos una longitud de palabra de 3, y expectativas (E) de 10, y la matriz de puntuación de BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89: 10915, 1989) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N=4, y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90: 5873, 1993). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante el que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se produjera por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad suma más pequeña una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01, y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 0,001.

Las homologías de secuencia de proteínas y ácido nucleicos se pueden evaluar usando la Herramienta de Investigación de Alineación Local Básica (Basic Local Aliment Search Tool"BLAST"). En particular, cinco programas específicos BLAST se usan para realizar la siguiente tarea:

(1) BLASTP y BLAST3 comparan una secuencia de aminoácidos de consulta frente a una base de datos de secuencias de proteínas;

(2) BLASTN compara una secuencia de nucleótidos de consulta frente a una base de datos de secuencias de nucleótidos;

(3) BLASTX compara los productos de traducción conceptuales de seis marcos de una secuencia de nucleótidos de consulta (ambas hebras) frente a una base de datos de secuencias de proteínas;

(4) TBLASTN compara una secuencia de proteínas de consulta frente a una base de datos de secuencias de nucleótidos traducida en los seis marcos de lectura (ambas hebras); y

(5) TBLASTX compara las traducciones de los seis marcos de una secuencia de nucleótidos de consulta frente a las traducciones de seis marcos de una base de datos de secuencias de nucleótidos.

Los programas BLAST identifican secuencias homólogas mediante la identificación de segmentos similares, que se denominan en el presente documento como "pares de segmentos de alta puntuación," entre una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de consulta y una secuencia de ensayo que se obtiene preferiblemente de una base de datos de una secuencia de proteínas o ácido nucleicos. Los pares de segmento de alta puntuación se identifican preferiblemente (es decir, alineados) por medio de una matriz de puntuación, muchos de los cuales se conocen en la técnica. Preferiblemente, la matriz de puntuación usada es la matriz BLOSUM62 (Gonnet et al., Science 256:1443 - 1445,1992; Henikoff y Henikoff, Proteins 17: 49 - 61, 1993). Menos preferiblemente, las matrices PAM o PAM250 también se pueden usar (Schwartz y Dayhoff, eds., "Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Secuence and Structure" (Washington, National Biomedical Research Foundation 1978)). Los programas BLAST son accesibles a través de la Biblioteca Nacional de Estados Unidos de Medicina, por ejemplo, en www.ncbi.nlm.nih.gov.

Los parámetros usados con los anteriores algoritmos se pueden adaptar dependiendo de la longitud de la secuencia y grado de homología estudiado. Los parámetros pueden ser los parámetros por defecto utilizados por los algoritmos en la ausencia de instrucciones del usuario.

Un polinucleótido que codifica una promiostatina se puede derivar de cualquier organismo, incluyendo, por ejemplo, ratón, rata, vaca, cerdo, ser humano, pollo, pavo, pez cebra, salmón, pez con aleta, otros organismos acuáticos y otras especies. Ejemplos de organismos acuáticos incluyen los que pertenecen a la clase *Piscina*, tal como trucha, trucha alpina, ayu, carpa, carpín, pez dorado, bermejuela, morralla, anguila, congrio, sardina, pez volador, lubina, besugo, lubina loro, pargo, chicharro, caballa, atún, bonito, rodaballo de cola amarilla, pez roca,

platija, lenguado, platija europea, pez globo, pez mosca; los que pertenecen a la clase *Cephalopoda*, tal como calamar, sepia, pulpo; los que pertenecen a la clase *Pelecypoda*, tal como almejas (por ejemplo, de concha dura, Manila, Quahog, almeja blanca, de concha blanda); berberechos, mejillones, bigaros; vieiras (por ejemplo, de mar, de bahía, callos); caracola, caracoles, pepinos de mar; estrella de mar (por ejemplo, *C. virginica*, Golfo, Nueva Zelanda, Pacific); los que pertenecen a la clase *Gastropoda* tales como caracol porcelana, oreja de mar (por ejemplo, verde, rosa, roja); y los que pertenecen a la clase *Crustacea* tales como langosta, que incluyen pero no se limitan a espinoso, de roca, y Americano; langostino tigre; camarón, que incluye pero no se limita a *M. rosenbergii*, *P. styllrolls*, *P. indicus*, *P. jeponious*, *P. monodon*, *P. vannemel*, *M. ensis*, *S. melantho*, *N. norvegious*, camarón de agua fría; cangrejo, que incluye, pero no se limita a, Azul, de torre, de piedra, rey, reina, de nieve, marrón, buey del Pacífico, Jonah, Mangrove, de concha blanda; gamba, krill, langostinos; cangrejo de río/cangrejo de río de patas rojas, que incluye pero no se limita a, Azul, Marrón, Pinza Roja, de pantano rojo, de caparazón blando, blanco; *Annelida*; *Chordata*, que incluyen pero no se limitan a, reptiles tales como caimanes y tortugas; *Amphibia*, que incluyen ranas; y *Echinodermata*, incluyendo pero sin limitación, erizos de mar.

Se describen en el presente documento partes de péptido sustancialmente purificado de un polipéptido de promiostatina partes de péptido sustancialmente purificado de un polipéptido pro-GDF-11 I. Como se usa en el presente documento, referencia a un "pro-GDF," por ejemplo, promiostatina o pro-GDF-11, significa el polipéptido de longitud completa, que incluye el prodominio amino terminal y el péptido GDF biológicamente activo carboxi terminal. Además, el prodominio incluye un péptido señal (secuencia guía), que comprende aproximadamente los primeros 15 a 30 aminoácidos en el extremo amino del prodominio. El péptido señal se puede escindir del polipéptido pro-GDF de longitud completa, que además se puede escindir en un sitio de escisión proteolítica de Arg Xaa-Xaa-Arg (SEC ID N°: 21).

Se hace referencia en el presente documento a restos de aminoácidos con respecto a los polipéptidos pro-GDF de longitud completa mostrados en las Figuras 1 y 2 (véase, también, Listado de Secuencias). También se debe reconocer que se hace referencia en el presente documento a péptidos particulares que comienzan o terminan en "aproximadamente" un resto de aminoácido particular. El término "aproximadamente" se usa en este contexto porque se reconoce que una proteasa particular puede escindir un polipéptido pro-GDF en o inmediatamente adyacente a un sitio de reconocimiento de escisión proteolítica, o uno o unos pocos aminoácidos del sitio de reconocimiento. Como tal, referencia, por ejemplo, a un prodominio de miostatina que tiene una secuencia de aproximadamente restos de aminoácidos 1 a 263 de la SEC ID N°: 4 incluiría una parte de péptido amino terminal de promiostatina que incluye el péptido de señal y tiene una terminación extremo de carboxi en el resto de aminoácido 257 al resto de aminoácido 269, preferiblemente en el resto de aminoácido 260 al resto de aminoácido 266.

De manera similar, el péptido de señal se puede escindir en cualquier posición entre aproximadamente resto de aminoácido 15 a 30 de un polipéptido pro-GDF, por ejemplo, en el resto 15, 20, 25 ó 30, sin afectar a la función, por ejemplo, de un predominio restante. De este modo, por conveniencia, se hace referencia en general en el presente documento a una parte de péptido de un polipéptido pro-GDFa partir del que el péptido de señal se ha escindido, cuando comienza en aproximadamente el resto de aminoácido 20. Sin embargo, se reconocerá que la escisión del péptido de señal puede estar en cualquier posición de aminoácido dentro de aproximadamente los primeros 15 a 30 aminoácidos amino terminal de un polipéptido pro-GDF. Como tal, referencias, por ejemplo, a un prodominio de miostatina que tiene una secuencia de aproximadamente los restos de aminoácidos 20 a 263 de la SEC ID N°: 4 incluiría una parte de péptido de promiostatina que carece de aproximadamente los primeros 15 a 30 aminoácidos de promiostatina, que comprende el péptido de señal, y que tiene una terminación de extremo carboxi en el resto de aminoácido 257 a resto de aminoácido 269, preferiblemente en el resto de aminoácido 260 al resto de aminoácido 266.

En general, se hace referencia en el presente documento a un polipéptido pro-GDF o un prodominio GDF por comenzar en aproximadamente el aminoácido 1. En vista de la descripción anterior, sin embargo, se reconocerá que tal polipéptido pro-GDFs o prodominios GDF que carece del péptido de señal también se comprenden en la presente descripción. Además a este respecto, se debe reconocer que la presencia o ausencia de un péptido de señal en un péptido puede influenciar, por ejemplo, los compartimientos de una célula a través de los cuales un péptido, por ejemplo, un prodominio de miostatina se atravesará y al que el péptido por último se localizará, incluyendo si el péptido se secretará de la célula. De este modo, se describe además una parte de péptido de señal sustancialmente purificado de un polipéptido pro-GDF. Como se describe en el presente documento, tal péptido de señal se puede usar para dirigir un agente, particularmente un agente de péptido, a los mismos compartimientos celulares como el GDF de origen natural cuyo péptido de señal se deriva.

El término "péptido" o "parte de péptido" se usa ampliamente en el presente documento para significar dos o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico. El término "fragmento" o "fragmento proteolítico" también se usa en el presente documento para referirse a un producto que se puede producir por una reacción proteolítica sobre un polipéptido, es decir, un péptido producido tras escisión de y enlace peptídico en el polipéptido. Aunque el término

"fragmento proteolítico " se usa en general en el presente documento para referirse a un péptido que se puede producir por una reacción proteolítica, se debe reconocer que el fragmento no necesita necesariamente producirse por una reacción proteolítica, sino también se puede producir usando procedimientos de síntesis química o procedimientos de tecnología de ADN recombinante, como se describe en mayor detalle más adelante, para producir un péptido sintético que es equivalente a un fragmento proteolítica. En vista de la homología descrita o promiostatina con otros miembros de la superfamilia de TGF- β , se reconocerá que un péptido descrito en el presente documento caracterizado, en parte, no está presente en los miembros descritos previamente de esta superfamilia. Si una parte de péptido de un polipéptido de promiostatina o de pro-GDF-11 está presente en un miembro descrito previamente de la superfamilia TGF- β se puede determinar fácilmente usando los algoritmos de ordenador descritos anteriormente.

En general, un péptido descrito en el presente documento contiene al menos aproximadamente seis aminoácidos, usualmente contiene aproximadamente diez aminoácidos, y puede contener quince o más aminoácidos, particularmente veinte o más aminoácidos. Se debe reconocer que el término "péptido" no se usa en el presente documento para sugerir un tamaño particular o número de aminoácidos que comprende la molécula, y que un péptido descrito en el presente documento puede contener hasta varios restos de aminoácidos o más. Por ejemplo, un péptido de miostatina C-terminal maduro de longitud completa contiene más de 100 aminoácidos y un péptido prodominio de longitud completa puede contener más de 260 aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente purificado" or "sustancialmente puro" o "aislado" significa que la molécula que se refiere a, por ejemplo, un péptido o un polinucleótido, está en una forma que está relativamente libre de proteínas, ácido nucleicos, lípidos, carbohidratos u otros materiales con la que está naturalmente asociado. En general, un péptido, polinucleótido, u otra molécula sustancialmente puro constituye al menos un veinte por ciento de una muestra, en general constituye al menos aproximadamente cincuenta por ciento de una muestra, usualmente constituye al menos aproximadamente ochenta por ciento de una muestra, y particularmente constituye aproximadamente noventa por ciento o noventa y cinco por ciento o más de una muestra. Una determinación de que un péptido o un polinucleótido es sustancialmente puro se puede realizar usando procedimientos bien conocidos, por ejemplo, mediante realización de electroforesis e identificación de la molécula particular como una banda relativamente discreta. Un polinucleótido sustancialmente puro, por ejemplo, se puede obtener mediante clonación del polinucleótido, o mediante síntesis química o enzimática. Un péptido sustancialmente puro se puede obtener, por ejemplo, mediante un procedimiento de síntesis química, o usando procedimientos de purificación de proteína, seguido de proteólisis y, si se desea, purificación adicional mediante procedimientos cromatográficos o electroforéticos.

Un péptido descrito en el presente documento se puede identificar mediante comparación con una secuencia de promiostatina o pro-GDF-11 y determinación de la secuencia de aminoácidos del péptido está contenida dentro de la secuencia de polipéptido de promiostatina o de pro-GDF-11, respectivamente. Sin embargo, se debe reconocer que un péptido descrito en el presente documento no necesita ser idéntico a una secuencia de aminoácidos correspondiente de promiostatina o pro-GDF-11. De este modo, un péptido descrito en el presente documento puede corresponder a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido promiostatina, por ejemplo, pero puede variar entre una secuencia de origen natural, por ejemplo, conteniendo uno más D-aminoácidos en lugar de un L-aminoácido correspondiente; o conteniendo uno o más análogos de aminoácido, por ejemplo, un aminoácido que se ha derivatizado o de otra manera modificado en su cadena lateral reactiva. De manera similar, uno o más enlaces peptídicos en el péptido se puede modificar. Además, un grupo reactivo en el extremo amino o el extremo carboxi o ambos se pueden modificar. Tales péptidos se pueden modificar, por ejemplo, para que tengan estabilidad mejorada a una proteasa, un agente oxidante u otra material reactivo que el péptido pueda encontrarse en un ambiente biológico, y, por lo tanto, puede ser particularmente útil en la realización de un procedimiento descrito en el presente documento. De hecho, los péptidos se pueden modificar para que tengan estabilidad disminuida en un ambiente biológico de manera que se reduce el período de tiempo que el péptido es activo en el ambiente.

La secuencia de un péptido descrito en el presente documento también se puede modificar en comparación con la secuencia correspondiente en un polipéptido de promiostatina o pro-GDF-11 incorporando una sustitución de aminoácido conservadora por uno o pocos aminoácidos en el péptido. Las sustituciones de aminoácido conservadoras incluyen el reemplazo de un resto de aminoácido con otro resto de aminoácido que tiene relativamente las mismas características químicas, por ejemplo, la sustitución de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un resto polar por otro, por ejemplo, sustitución de lisina por arginina; o de ácido aspártico por glutámico; o de asparagina por glutamina; o similares. Ejemplos de posiciones de un polipéptido de promiostatina que se puede modificar son evidentes a partir del examen de la Figura 1, que muestra diversas diferencias de aminoácidos en el prodominio de miostatina y péptido de miostatina madura que sustancialmente no afecta a la actividad de la promiostatina o miostatina.

También se describe en el presente documento un fragmento proteolítico sustancialmente purificado de un

polipéptido de factor de diferenciación de crecimiento (GDF) (un polipéptido pro-GDF) o su parte de péptido funcional. Los fragmentos proteolíticos de un polipéptido pro-GDF se ejemplifican en el presente documento mediante fragmentos proteolíticos de un polipéptido de promiostatina y fragmentos proteolíticos de un polipéptido pro-GDF-11. Como se describe en el presente documento, una parte de péptido of a polipéptido pro-GDF que es
 5 equivalente a un fragmento proteolítico de un pro-GDF se puede producir por un procedimiento químico o un procedimiento de ADN recombinante. En vista de la presente descripción, fragmentos proteolíticos de otros polipéptidos de GDF se pueden preparar y usar fácilmente.

En general, péptidos que corresponden a fragmentos proteolíticos de un polipéptido pro-GDF se ejemplifican por un
 10 fragmento de GDF maduro carboxi terminal (C-terminal), que puede interactuar específicamente con un receptor de GDF y afectar a la transducción de la señal de GDF, y un fragmento de prodominio amino terminal, que puede incluir un péptido de señal y, como se describe en el presente documento, puede interactuar específicamente con un polipéptido pro-GDF o péptido de GDF maduro y afecta a su capacidad de efectuar la transducción de la señal de GDF. Por ejemplo, fragmentos proteolíticos de un polipéptido de promiostatina incluyen un péptido de miostatina
 15 madura C-terminal, que puede interactuar específicamente con un receptor de miostatina and induce transducción de la señal de miostatina; y un fragmento de prodominio amino terminal que puede interactuar específicamente con miostatina, reduciendo o inhibiendo por lo tanto la capacidad de la miostatina de inducir la transducción de la señal de miostatina.

Un fragmento proteolítico de un polipéptido pro-GDF, o su parte de péptido funcional, se caracteriza, en parte, por
 20 tener o afectar a la actividad asociada a una estimulación o inhibición de la transducción de la señal de GDF. Por ejemplo, un polipéptido de promiostatina o su parte de péptido funcional puede tener actividad de unión de receptor de miostatina, actividad estimuladora o inhibidora de la transducción de la señal de miostatina, actividad de unión de miostatina, actividad de unión de promiostatina, o su combinación. De este modo, el término "parte de péptido funcional," cuando se usa en el presente documento en referencia a un polipéptido pro-GDF, significa una parte de
 25 péptido del polipéptido pro-GDF que puede interactuar específicamente con su receptor y estimular o inhibir la transducción de la señal de GDF; que puede interactuar específicamente con un GDF o un pro-GDF maduro; o que muestra actividad de localización celular, es decir, la actividad de un péptido de señal. Se debe reconocer que una parte de péptido funcional de péptido de miostatina madura de longitud completa, por ejemplo, no necesita tener actividad de la miostatina madura, que incluye la capacidad de estimular la transducción de la señal de miostatina, ya que las partes de péptido funcional del péptido maduro pueden tener, por ejemplo, una capacidad de interactuar
 30 específicamente con un receptor de miostatina sin tener también la capacidad de activar la ruta de la transducción de la señal. Procedimientos para identificar tal parte de péptido funcional de un polipéptido pro-GDF, que puede ser útil como un antagonista de miostatina, se describen en el presente documento o de otra manera se conocen en la técnica. De este modo, una parte de péptido funcional de un polipéptido de promiostatina puede interactuar específicamente con un receptor de miostatina, y puede actuar como un agonista para estimular la transducción de
 35 la señal de miostatina o como un antagonista para reducir o inhibir transducción de la señal de miostatina.

Una parte de péptido funcional de un polipéptido de promiostatina puede interactuar específicamente con un
 polipéptido de promiostatina o con un péptido de miostatina madura, bloqueando por lo tanto la transducción de la
 40 señal de miostatina. Tal parte de péptido funcional de promiostatina puede actuar, por ejemplo, mediante la prevención de escisión del polipéptido de promiostatina a miostatina madura; formando un complejo de péptido de miostatina madura; o mediante algún otro mecanismo. Donde un complejo de péptido-miostatina se forma, el complejo puede bloquear la transducción de la señal de miostatina, por ejemplo, reduciendo o inhibiendo la capacidad de la miostatina de interactuar específicamente con su preceptor, o mediante unión al receptor en la forma que carece de la capacidad de inducir la transducción de la señal de miostatina.

Fragmentos proteolíticos de un polipéptido pro-GDF se se puede producir mediante escisión del polipéptido en un
 45 sitio de escisión que tiene una secuencia de consenso de aminoácidos Arg-Xaa-Xaa-Arg (SEC ID N°: 21). Tales sitios de reconocimiento proteolíticos se ejemplifican por la secuencia Arg-Ser-Arg-Arg (SEC ID N°: 22) mostrada como restos de aminoácido 263 a 266 en la SEC ID N°:1 (promiostatina) o restos de aminoácidos 295 a 298 de la SEC ID N°: 25 (pro-GDF-11 humano; véase, también, las posiciones relativas 267 a 270 de Figura 2), y por la secuencia Arg-Ile-Arg-Arg (SEC ID N°: 23) mostrada como restos de aminoácidos 263 a 266 en la SEC ID N°: 20.

Además del sitio de escisión proteolítica para el péptido de señal, promiostatina, polipéptidos, por ejemplo,
 50 contienen dos sitios de procesamiento proteolítica adicionales (Lys-Arg y Arg-Arg). La escisión de un polipéptido de promiostatina en o cerca del sitio de procesamiento proteolítico último, que está contenido dentro del sitio de reconocimiento de escisión proteolítica de consenso Arg-Xaa-Xaa-Arg (SEC ID N°: 21) (véase, por ejemplo, restos de aminoácidos 263 a 266 de la SEC ID N°: 2), genera un fragmento de miostatina humano C-terminal
 55 biológicamente activo. Los longitud completa péptidos de miostatina madura de longitud completa ejemplificados contienen aproximadamente 103 a aproximadamente 109 aminoácidos y tienen un peso molecular predicho de aproximadamente 12.400 daltons (Da). Además, miostatina puede formar dímeros, que tienen un peso molecular esperado de aproximadamente 23 a 30 kiloDaltons (kDa). Los dímeros pueden ser homodímeros de miostatina o

pueden ser heterodímeros, por ejemplo, con GDF-11 u otro GDF o miembro de la familia de TGF-9.

Un fragmento proteolítico se puede ejemplificar por un prodominio de GDF, por ejemplo, un prodominio de miostatina, que incluye aproximadamente restos de aminoácidos 20 a 262 de un polipéptido de miostatina, o su parte de péptido funcional, o un prodominio de GDF-11, que incluye aproximadamente restos de aminoácidos 20 a 295 de un polipéptido pro-GDF-11, o su parte de péptido funcional, cada una de las cuales puede además contener el péptido de señal que comprende aproximadamente aminoácidos 1 a 20 del polipéptido pro-GDF respectivo. Prodominio de miostatinas se ejemplifican además mediante aproximadamente restos de aminoácidos 20 a 263 como se expone en la SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 6; así como aproximadamente restos de aminoácidos aproximadamente 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 20, que se puede producir por escisión proteolítica de un polipéptido de miostatina correspondiente, se puede sintetizar químicamente, o se puede expresar a partir de un polinucleótido recombinante que codifica el fragmento proteolítico. Una parte de péptido funcional de un prodominio de miostatina se ejemplifica por una parte de péptido de un prodominio de miostatina que puede interactuar específicamente con miostatina o con promiostatina. Un prodominio de GDF-11 se ejemplifica por aproximadamente restos de aminoácidos 20 a 295 de la SEC ID N°: 25, que además puede incluir el péptido de señal que comprende aproximadamente restos de aminoácidos 1 a 20 de la SEC ID N°: 25, y una parte de péptido funcional de un prodominio de GDF-11 se ejemplifica por una parte de péptido de un prodominio de GDF-11 que puede específicamente interactuar con polipéptido maduro de GDF-11 o uno de pro-GDF- 11. Preferiblemente, la parte de péptido funcional de un prodominio de GDF inhibe la capacidad del GDF correspondiente o un GDF relacionado para estimular la transducción de la señal, por ejemplo, reduciendo o inhibiendo la capacidad del GDF de interactuar específicamente con su receptor, o mediante unión al receptor como un complejo inactivo.

Un fragmento funcional de un polipéptido pro-GDF, particularmente un fragmento funcional de un prodominio de GDF, se puede unir de manera operativa a péptido de señal de GDF, preferiblemente un péptido de señal de miostatina o un péptido de señal de GDF-11 que comprende aproximadamente los primeros 15 a 30 aminoácidos amino terminal de promiostatina o de pro-GDF-11, respectivamente.

Como se describe en el presente documento, un prodominio de miostatina o prodominio de GDP-11 puede interactuar con miostatina madura, GDF- 11. o ambos, reduciendo o inhibiendo por lo tanto la capacidad de GDF maduro de interactuar específicamente con su receptor (véanse los Ejemplos 7 y 8). De este modo, una parte de péptido funcional de un prodominio de miostatina, por ejemplo, se puede obtener examinando partes de péptido de un prodominio de miostatina usando procedimientos como se proporciona en el presente documento, e identificando las partes de péptido funcional del prodominio que puede interactuar específicamente con miostatina o con promiostatina y puede reducir o inhibir la capacidad de miostatina de interactuar específicamente con un receptor de miostatina o de estimular transducción de la señal de miostatina.

Una parte de péptido funcional de un prodominio de miostatina que puede específicamente interactuar con miostatina, o una parte de péptido funcional de otro prodominio de GDF, también se puede identificar usando cualquiera de los diversos ensayos que se sabe que son útiles para identificar las interacciones específicas proteína-proteína. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, procedimientos de electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, el sistema de dos híbridos de Fields y Song (Nature 340: 245 - 246, 1989; véase, también, Patente de Estados Unidos N° 5.283.173; Fearon et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89: 7958 - 7962, 1992; Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 55 9578 - 9582, 1991; Young, Biol. Reprod. 58: 302 - 311 (1998), el ensayo de dos híbridos inverso (Leanna y Hannink, Nucl. Acids Res. 24: 3341 - 3347, 1996, el sistema transactivador reprimido (Patente de Estados Unidos N° 5.885.779), el sistema de despliegue de fago (Lowman, Arm. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 401 - 424, 1997), ensayos de reducción de GST/HIS, operadores mutantes (documento WO 98/01879), el sistema de alistamiento de proteínas (Patente de Estados Unidos N° 5.776.689), y similares (véase, por ejemplo, Mathis, Glin. Chem. 41: 139 - 147, 1995 Lam, Anticancer Drug Res. 12:145 - 167, 1997; Phizicky et al., Microbiol. Rev. 59: 94 - 123, 1995).

Una parte de péptido funcional of a prodominio de GDF también se puede identificar, usando procedimientos de modelado molecular. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de un péptido de miostatina madura se puede meter en un sistema de ordenador que tiene un software de modelado adecuado, y se puede producir una representación tridimensional de la miostatina ("miostatina virtual"). Una secuencia de aminoácidos también se puede meter en el sistema de ordenador, de manera que el software de modelado pueda estimular partes de la secuencia de promiostatina, por ejemplo, partes del prodominio, y puede identificar las partes de péptido del prodominio que puede interactuar específicamente con la miostatina virtual. Se puede predefinir una línea base para una interacción específica mediante modelado de la miostatina y un prodominio de miostatina de longitud completa, e identificar los restos de aminoácidos en la miostatina virtual que "se ponen en contacto" por el prodominio, ya que tal interacción se sabe que inhibe la actividad de de la miostatina.

Se debe reconocer que tales procedimientos, que incluyen ensayos de dos híbridos y procedimientos de modelado

molecular, también se pueden usar para identificar otras moléculas que interactúan específicamente. De este modo, procedimientos de manera que el ensayo de dos híbridos se puede usar para identificar un receptor de GDF tal como un receptor de miostatina que usa, por ejemplo, un péptido de miostatina o su parte de péptido que interactúa específicamente un receptor de Act RIIA o de Act RIIB como un componente de unión del ensayo, e identificando un receptor de GDF, que interactúa específicamente con el péptido de miostatina. De manera similar, procedimientos de modelización molecular se pueden usar para identificar un agente que interactúa específicamente con un péptido de GDF maduro tal como miostatina madura, o con un receptor de GDF y por lo tanto, puede ser útil como un agonista o un antagonista de transducción de la señal mediada por el GDF o el receptor de GDF. Tal agente puede ser, por ejemplo, una parte de péptido funcional de un prodominio de miostatina o prodominio de GDF-11, o un agente químico que imita la acción del prodominio de GDF.

Los sistemas de modelización útiles para los propósitos descritos en el presente documento se pueden basar en información estructural obtenida, por ejemplo, mediante análisis cristalográfico o análisis de resonancia magnética nuclear, o en la información de secuencia primaria (véase, por ejemplo, Dunbrack et al., "Meeting review: the Second meeting on the Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction (CASP2) (Asilomar, California, December 13-16, 1996). Fold Des. 2(2): R27-42, (1997); Fischer and Eisenberg, Protein Sci. 5: 947 - 55, 1996; (véase, también, Patente de Estados Unidos Nº 5.436.850); Havel, Prog. Biophys. Mol. Biol. 56: 43 - 78. 1991; Lichtarge et al., J. Mol. Biol. 274: 325 - 37, 1997; Matsumoto et al., J. Biol. Chem. 270: 19524 - 31; 1998; Sali et al., J. Biol. Chem. 268: 9023 - 34, 1993; Sali, Molec. Med. Today 1: 270 - 7, 1995a; Sali, Curr. Opin. Biotechnol. 6: 437 - 51, 1995b; Sali et al., Proteins 23: 318 - 26, 1995c; Sali, Nature Struct Biol. 5: 1029-1032, 1998; Patente de Estados Unidos Nº 5.933.819; Patente de Estados Unidos Nº 5.265.030.

Las coordenadas de estructura cristalina de un polipéptido de promiostatina o un receptor de GDF se puede usar para diseñar compuestos que se unen a la proteína y alteran sus propiedades físicas o fisiológicas de una diversidad de formas. Las coordenadas de la estructura de la proteína también se pueden usar para bases de datos de de moléculas pequeñas de selección por ordenador de agentes que se unen al polipéptido para desarrollar agentes de modulación o de unión, que pueden actuar como agonistas o antagonistas de la transducción de la señal de GDF. Tales agentes se pueden identificar mediante datos cinéticos de ajuste usando ecuaciones estándar (véase, por ejemplo, Segel, "Enzyme Kinetics" (J. Wiley & Sons 1975)).

Procedimientos de uso de los datos de estructura cristalina para diseñar inhibidores o agentes de unión se conocen en la técnica. Por ejemplo, las coordenadas del receptor de GDF se pueden sobreponer sobre las otras coordenadas disponibles de receptores similares, incluyendo receptores que tienen un inhibidor de unión, para proporcionar una aproximación de la forma en la que el inhibidor interactúa con el receptor. Los sistemas de ordenador empleados en la práctica de diseño de fármaco racional también se puede usar para identificar los compuestos que reproducen las características de interacciones similares a las encontradas, por ejemplo, entre una miostatina madura y un prodominio de miostatina cristalizado conjuntamente. El conocimiento detallado de la naturaleza de las interacciones específicas permite la modificación de los compuestos para alterar o modificar la solubilidad, farmacocinética, y similares, sin efectuar actividad de unión.

Se conocen bien los programas de ordenador para llevar a cabo las actividades necesarias para diseñar agentes que usan información de estructura cristalina. Ejemplos de tales programas incluyen, Catalyst Databases™ - un programa de recuperación de información que accede a las bases de datos químicas tales como BioByte Master File, Derwent WDI y ACD; Catalyst/HYPO™ - genera modelos de compuestos y propone la hipótesis de explicar variaciones de actividad con la estructura de los candidatos de fármaco; Ludi™ - ajusta moléculas en el sitio activo de una proteína mediante identificación y emparejamiento de grupos polares e hidrófobos complementarios; y Leapfrog™ - "desarrolla" nuevos ligandos usando un algoritmo genético con parámetros bajo el control del usuario.

Se pueden usar diversas máquinas de propósito general con tales programas, o puede ser más conveniente construir aparatos más especializados para realizar las operaciones. En general, la realización se implementa en uno o más de los programas de ordenador que se ejecutan sobre sistemas programables comprendiendo cada uno al menos un procesador, al menos un sistema de almacenamiento de datos (incluyendo memoria volátil y no volátil y / o elementos de almacenamiento), al menos un dispositivo de entrada, y al menos un dispositivo de salida. El programa se ejecuta en el procesador para realizar las funciones descritas en el presente documento.

Cada tal programa se puede implementar en cualquier lenguaje de ordenador deseado, incluyendo, por ejemplo, máquina, ensamblaje, procedimiento de alto nivel, o lenguajes de programación orientados al objeto, para comunicarse con un sistema de ordenador. En cualquier caso, el lenguaje puede ser un lenguaje recopilado o interpretado. El programa de ordenador típicamente se almacenará en un medio o dispositivo de almacenamiento, por ejemplo, un ROM, CD-ROM, medio magnético u óptico, o similares, que se puede leer por un ordenador programable de propósito general o especial, para configurar y hacer funcionar un ordenador cuando el medio o dispositivo de almacenamiento se lee por el ordenador para realizar los procedimientos descritos en el presente documento. El sistema también se puede considerar para implementarse como un medio de almacenamiento que

se puede leer por ordenador, configurado con un programa de ordenador, cuando el medio de almacenamiento así configurado provoca que un ordenador funcione de una manera específica y predeterminada para realizar las funciones descritas en el presente documento.

Sistemas, por ejemplo, sistemas basados en Internet, particularmente sistemas de ordenador pueden almacenar y manipular la información coordinada obtenida mediante análisis cristalográfico o de RMN, o información de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos, como se describe en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "sistema de ordenador" se refiere a los componentes de hardware, componentes de software, y componentes de almacenamiento de datos usados para analizar las coordenadas o secuencias como se expone en el presente documento. El sistema de ordenador típicamente incluye un procesador para procesamiento, acceso y manipulación de los datos de secuencia. El procesador puede ser cualquier tipo bien conocido de unidad de procesamiento central, por ejemplo, un procesador Pentium II o Pentium III de Intel Corporación, o un procesador similar de Sun, Motorola, Compaq, Advanced MicroDevices o International Business Machines.

Típicamente el sistema de ordenador es un sistema de propósito general que comprende el procesador y uno o más componentes de almacenamiento de datos internos para almacenar los datos, y uno o más dispositivos de recuperación de datos para recuperar el almacenamiento de datos en los componentes de almacenamiento de datos. Los expertos en la técnica pueden fácilmente apreciar que son adecuados cualquiera de los sistemas de ordenador disponibles actualmente.

El sistema de ordenador puede incluir un procesador conectado a un conductor eléctrico, que se conecta a una memoria principal, preferiblemente implementado como RAM, y uno o más dispositivos de almacenamiento de datos internos tales como un dispositivo de disco duro u otro medio que se pueda leer por ordenador que tiene los datos registrados en ellos. El sistema de ordenador puede además incluir uno o más dispositivos de recuperación de datos para leer los datos almacenados en los dispositivos de almacenamiento de datos internos.

El dispositivo de recuperación de datos puede representar, por ejemplo, un dispositivo de disquete, un dispositivo de disco compacto, un dispositivo de cinta magnética, o un modem capaz de conectar con un sistema de almacenamiento de datos remoto (por ejemplo, mediante Internet). El dispositivo de almacenamiento de datos internos puede ser un medio que se puede leer de ordenador separable tal como un disquete, un disco compacto, una cinta magnética, etc. que contiene registro de lógica de control y / o de datos en ellos. El sistema de ordenador puede incluir de manera ventajosa o ser programado por software apropiado para leer los datos de lógica de control y / o los datos del componente de almacenamiento de datos una vez que se han insertado en el dispositivo de recuperación de datos.

El sistema de ordenador en general incluye una pantalla, que se usa para exponer la salida a un usuario de ordenador. También se debe indicar que el sistema de ordenador puede estar ligado a otros sistemas de ordenador en una red o red de área amplia para proporcionar el acceso centralizado al sistema de ordenador.

Cuando se desea identificar una entidad química que interactúa específicamente con miostatina o con un receptor de GDF, se puede usar cualquiera de los varios procedimientos para seleccionar entidades químicas o fragmentos por su capacidad de interactuar específicamente con la molécula. Este proceso puede comenzar mediante inspección visual, por ejemplo, de miostatina y un prodominio de miostatina en la pantalla de ordenador. Las partes de péptido seleccionadas del prodominio, o entidades químicas que pueden actuar como imitaciones, se pueden posicionar en una diversidad de orientaciones, o anclados, dentro de un sitio de unión individual de la miostatina. La reducción se puede llevar a cabo usando el software tal como Quanta y Sibyl, seguido de minimización de energía y dinámica molecular con campos de fuerza de mecanismos moleculares convencionales, tales como CHARMM y AMBER.

Los programas de ordenador especializados pueden ser particularmente útiles para seleccionar partes de péptido de un prodominio, o entidades químicas útiles químicas, por ejemplo, como un receptor de agonista o antagonista de GDF. Tales programas incluyen, por ejemplo, GRID (Goodford, J. Med. Chem., 28: 849 - 857, 1985; disponible de Oxford Universidad de Oxford, Reino Unido); MCSS (Miranker y Karplus, Proteins: Structure. Function and Genetics 11: 29 - 34, 1991, disponible de Molecular Simulations, Burlington MA); AUTODOCK (Goodsell y Olsen, Proteins: Structure. Function, y Genetics 8: 195 - 202 - 1990, disponibles de Scripps Research Institute, La Jolla CA); DOCK (Kuntz, et al., J. Mol. Biol. 161: 269 - 288, 1982, disponible de la Universidad de California, San Francisco CA).

Los péptidos o agentes adecuados que se han seleccionado se pueden ensamblar en un único compuesto o agente de unión. El ensamblaje se puede realizar, por inspección visual de la relación de los fragmentos entre sí sobre la imagen tridimensional mostrada en una pantalla de ordenador, seguido de la construcción de un modelo manual que usan software tal como Quanta o Sibyl. Los programas útiles ayudan a los expertos en la técnica en conexión con las entidades químicas o fragmentos individuales individuales, por ejemplo, CAVEAT (Bartlett et al,

Especial Pub., Royal Chem. Soc. 78: 182 - 196, 1989, disponibles de la Universidad de California, Berkeley CA); Sistemas de Base de datos 3D tales como MACCS-3D (MDL Information Systems, San Leandro CA; para revisión, véase Martin, J. Med. Chem. 35: 2145 - 2154, 1992); HOOK (disponible de Molecular Simulations, Burlington, Mass.).

Además del procedimiento de construcción o identificación de tales agentes que interactúan específicamente de una manera por etapas, un fragmento o entidad química simultáneamente como se ha descrito anteriormente, los agentes se pueden diseñar como un todo o *de novo* usando o bien un sitio vacío activo u, opcionalmente, que incluye algunas partes de un agente conocido que interactúa específicamente, por ejemplo, un prodominio de miostatina de longitud completa, que interactúa específicamente con miostatina. Tales procedimientos incluyen, por ejemplo, LUDI (Bohm, J. Comp. Aid. Molec. Design 6: 61 - 78, 1992, disponible de Biosym Technologies, San Diego CA); LEGEND (Nishibata y Itai, Tetrahedron 47:8985, 1991, disponible de Molecular Simulations, Burlington MA); LeapFrog (disponible de Tripos Associates, St. Louis MO), y los descritos por Cohen et al. (J. Med. Chem. 33: 883 - 894, 1990) y por Navia y Murcko, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 202 - 210, 1992).

El software de ordenador específico está disponible en la técnica para evaluar la energía de deformación del compuesto e interacción electrostática. Los ejemplos de programas diseñados para tales uso incluyen Gaussian 92, revisión C (Frisch, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1992); AMBER, versión 4.0 (Kollman, Universidad de California en San Francisco, 1994); QUANTA/CHARMM (Molecular Simulations, Inc., Burlington MA, 1994y, e Insight II/Discover (Biosym Technologies Inc., San Diego CA. 1994). Estos programas se pueden implementar usando, por ejemplo, una estación de trabajo de Silicon Graphics, IRIS 4D/35 o IBM RISC/6000 modelo 550 de estación de trabajo. Otros sistemas de hardware y paquetes de software son bien conocidos por los expertos en la técnica de los que la velocidad y capacidad se modifican continuamente.

Un procedimiento de modelado molecular para identificar un agente que interactúa específicamente con una molécula de interés, por ejemplo, con un péptido de GDF maduro tal como miostatina madura, o con un receptor de GDF realizado como se describe en el presente documento. En una primera etapa, se realiza una representación virtual de una molécula diana, por ejemplo, miostatina,.

De este modo, se describe en el presente documento una representación virtual de una molécula diana, en el que la molécula diana se selecciona entre un polipéptido de pro-GDF, por ejemplo, promiostatina; una parte de péptido de un polipéptido de pro-GDF; un receptor de GDF, y un dominio relevante de un receptor de GDF, por ejemplo, un dominio de unión de GDF. La representación virtual de la molécula diana se puede mostrar o se puede mantener en una memoria de sistema de ordenador. El proceso comienza en un estado de partida, que comprende la molécula diana virtual, después se mueve a un estado en el que una base de datos una o más de las moléculas de ensayo virtuales almacenadas en una memoria en el sistema de ordenador. Como se ha descrito anteriormente, la memoria puede ser cualquier tipo de memoria, incluyendo un dispositivo de almacenamiento RAM o interno.

El proceso después se mueve hasta un estado en el que la capacidad de una primera molécula de ensayo virtual para interactuar específicamente con la molécula virtual diana se determina, en el que la base de datos que contiene la molécula de ensayo virtual, que puede ser una o una población de moléculas de ensayo, está abierta para un análisis de la interacción de la molécula diana virtual y molécula de ensayo virtual, y se realiza el análisis una determinación de una interacción específica se puede realizar basándose en los cálculos realizados por el software mantenido en el sistema de ordenador, o por comparación con una interacción específica determinada, que se puede almacenar en una memoria en el sistema de ordenador y se accede según sea apropiado.

Después el procedimiento se mueve a través de un estado de movimiento, donde se detecta una interacción específica, la molécula de ensayo virtual se muestra, o se almacena en una segunda base de datos en el ordenador. Si es apropiado, el procedimiento el repite para la molécula diana virtual y una segunda molécula de ensayo virtual, una tercera molécula de ensayo virtual, y así sucesivamente, según se desee.

Si se realiza una determinación de que la molécula de ensayo virtual que interactúa específicamente con la molécula diana virtual, la molécula de ensayo virtual identificada se mueve desde la base de datos y se puede mostrar al usuario. Este estado notifica al usuario que la molécula con el nombre o estructura mostrada interactúa específicamente con la molécula diana dentro de las restricciones comprendidas. Una vez que el nombre de la molécula de ensayo se ha mostrado para el usuario, el procedimiento se mueve a un estado de decisión, en el que se realiza una determinación si no existen más moléculas de ensayo virtuales existen en la base de datos o se ejemplifican. Si no existen más moléculas en la base de datos, entonces el procedimiento termina en el estado final. Sin embargo, si existen más moléculas de ensayo en la base de datos, entonces el procedimiento se mueve hasta un estado, en el que se mueve un indicador hasta la siguiente molécula de ensayo en la base de datos de manera que se pueda examinar para determinar la actividad de unión específica. De esta manera, la nueva molécula se examina para determinar la capacidad de interactuar específicamente con la molécula diana virtual.

Tales procedimientos como se han descrito anteriormente se pueden usar para identificar una parte de péptido de

un prodominio de miostatina que puede interactuar específicamente con miostatina y reducir o inhibir la capacidad de miostatina de interactuar con su receptor o de otra manera afectar a la capacidad de la miostatina de efectuar la transducción de la señal. De manera similar, los procedimientos se pueden usar para identificar pequeñas moléculas orgánicas que imitan la acción de un prodominio de GDF, reduciendo o inhibiendo por lo tanto miostatina o transducción de la señal de GDF-11. Los procedimientos también se pueden usar para identificar agentes que interactúan específicamente con un receptor de GDF, por ejemplo, un Act RIIA, Act RIIB u otro receptor de GDF, siendo tales agentes como agonistas o antagonistas del receptor de GDF, que pueden modular la transducción de la señal de GDF en una célula. Además, los procedimientos proporcionan un medio de identificar previamente los polipéptidos de pro-GDF o receptores de GDF, por ejemplos identificando las características estructurales conservadas de los polipéptidos particulares.

De manera similar a otros miembros de la superfamilia TGF-9, los péptidos de GDF activos se expresan como polipéptidos precursores, que se escinden hasta una forma madura, biológicamente activa. De acuerdo con lo anterior, el fragmento proteolítico of a polipéptido pro-GDF may be a péptido de GDF maduro, o una parte de péptido funcional de un péptido de GDF maduro, donde, como se ha descrito anteriormente, la parte de péptido funcional can puede tener la actividad de agonista o antagonistas de GDF. El fragmento proteolítico puede ser un péptido de miostatina madura C-terminal, que incluye aproximadamente restos de aminoácidos 268 a 374 de un polipéptido de promiostatina (véase Figura 1; véase, también, Figura 2), o un péptido de GDF-11 maduro C-terminal, que incluye aproximadamente restos de aminoácidos 299 a 407 de un polipéptido pro-GDF-11. Los péptidos de miostatina madura de longitud completa se ejemplifican por los restos de aminoácidos aproximadamente 268 a 375 como se expone en la SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 6; por los restos de aminoácidos aproximadamente 267 a 374 como se expone en la SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 18, SEC ID N°:14, SEC ID N°: 16, y SEC ID N°: 20, y por los restos de aminoácidos aproximadamente 49 a 157 de la SEC ID N°: 27 y los restos de aminoácidos aproximadamente 28 a 136 de la SEC ID N°: 29. Un péptido GDF-11 maduro de longitud completa se ejemplifica por los restos de aminoácidos aproximadamente 299 a 407 de la SEC ID N°: 25. Las partes de péptido funcionales de los péptidos de GDF maduros se ejemplifican por partes de péptido de miostatina madura o GDF-1 maduro que tienen una actividad agonista o antagonista con respecto a la actividad de un péptido de GDF maduro. Preferiblemente, la actividad del péptido de GDF maduro es una capacidad de interactuar específicamente con su receptor.

Como se describe en el presente documento, un péptido de miostatina madura (denominado en el presente documento en general como "miostatina,") puede inducir la transducción de la señal de actividad miostatina mediante interacción específicamente con un receptor de miostatina expresado sobre la superficie de una célula (véanse los Ejemplos 7). De este modo, una parte de péptido funcional de miostatina se puede obtener mediante el examen de partes de péptido de un péptido de miostatina madura usando un procedimiento como se describe en el presente documento (Ejemplo 7) o de otra manera se conoce en la técnica, e identificación de las partes de péptido funcional de miostatina que específicamente interactúan con un receptor de miostatina, por ejemplo, un receptor de activina tipo IIA (Act RHA).o receptor Act RIIB expresado en una célula.

Un prodominio de miostatina puede reducir o inhibir la transducción de la actividad de la señal de miostatina. El prodominio de miostatina puede interactuar específicamente con miostatina, reduciendo o inhibiendo por lo tanto la capacidad del péptido de miostatina de interactuar específicamente con su receptor Como se describe en el presente documento, un precursor de promiostatina también carece de la capacidad de interactuar específicamente con un receptor de miostatina, y, por lo tanto, las mutaciones en promiostatina que reducen o inhiben la capacidad de la promiostatina de escindirse en miostatina madura proporcionan un medio para reducir o inhibir transducción de la señal de miostatina. De acuerdo con lo anterior, un polipéptido pro-GDF mutante puede contener una o más mutaciones de aminoácido que alteran la escisión proteolítica del pro-GDF mutante a un péptido de GDF maduro activo.

Un polipéptido pro-GDF mutante puede tener una mutación que afecta a la escisión en un sitio de escisión proteolítica tal como el sitio de reconocimiento de escisión proteolítica de consenso Arg-Xaa-Xaa-Arg (SEC ID N°: 21), que está presente en el polipéptido pro-GDFs. De este modo, la mutación puede ser una mutación de un resto Arg de la SEC ID N°: 21, de manera que una promiostatina mutante, por ejemplo, no se puede escindir en un prodominio de miostatina y un péptido de miostatina madura. Sin embargo la mutación también puede estar en un sitio diferente del sitio de escisión proteolítica, y puede alterar la capacidad de la proteasa de unirse al polipéptido pro-GDF de manera que se efectúe la proteólisis en el sitio de escisión. Un polipéptido pro-GDF mutante, por ejemplo, una promiostatina mutante o pro-GDF-11 mutante puede tener una actividad negativa dominante con respecto a miostatina o GDF-11 y, por lo tanto, puede ser útil para reducir o inhibir la transducción de la señal de miostatina o GDF-11 en una célula.

Un polinucleótido sustancialmente purificado puede codificar una parte de péptido de un polipéptido de promiostatina o una promiostatina mutante, o una parte de péptido de un polipéptido pro-GDF-11 o pro-GDF-11 mutantes, como se ha descrito anteriormente. Como se ha descrito en mayor detalle más abajo, se describe en el

presente documento son polinucleótidos útiles como agentes para modular el efecto de miostatina en una célula, y un polinucleótido que codifica un receptor de GDF, o su parte de péptido funcional. Ejemplos de tales polinucleótidos se proporcionan en la siguiente descripción.

El término "polinucleótido" se usa ampliamente en el presente documento para significar una secuencia de dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que están ligados entre sí por un enlace fosfodiéster. Como tal, el término "polinucleótido" incluye ARN y ADN, que puede ser un gen o su parte, un ADNc, una secuencia de ácido polidesoxirribonucleico sintética, o similares, y puede ser mono o bicatenario, así como un ADN/ARN híbrido. Además, el término "polinucleótido" como se usa en el presente documento incluye moléculas de ácido nucleico de origen natural, que se pueden aislar de una célula, así como moléculas sintéticas, que se pueden preparar, por ejemplo, por procedimientos de síntesis química o por procedimientos enzimáticos tal como por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Un polinucleótido puede contener análogos de nucleósido o nucleótido, o un enlace de estructura central diferente de un enlace fosfodiéster (véase antes).

En general, los nucleótidos que comprenden un polinucleótido son desoxirribonucleótidos de origen natural, tales como adenina, citosina, guanina o timina ligados a 2'-deoxirribosa, o ribonucleótidos tales como adenina, citosina, guanina o uracilo ligados a ribosa. Sin embargo, un polinucleótido también puede contener análogos de nucleótido, incluyendo nucleótidos sintéticos de origen no natural o nucleótidos de origen natural modificados. Tales análogos de nucleótidos se conocen bien en la técnica y comercialmente disponible, como son los polinucleótidos que contienen tales análogos de nucleótido (Lin et al., Nucl. Acids Res. 22: 5220 - 5234 (1994); Jellinek et al., Biochemistry 34: 11363 - 11372 (1995); Pagratis et al., Nature Biotechnol. 15: 68 - 73 (1997)).

El enlace covalente que une los nucleótidos de un polinucleótido en general es un enlace fosfodiéster. Sin embargo, el enlace covalente también puede ser cualesquiera de numerosos enlaces diferentes, incluyendo un enlace tiodiéster, a un enlace fosforotioato, un enlace de tipo peptídico o cualquier otro enlace conocido por los expertos en la técnica como útil para unir nucleótidos para producir polinucleótidos sintéticos (véase, por ejemplo, Tam et al., Nucl. Acids Res. 22: 977 - 986 (1994); Ecker y Crooke, BioTechnology 13: 351360 (1995)). La incorporación de análogos de nucleótidos de origen no natural o enlaces que unen nucleótidos o análogos pueden ser particularmente útiles cuando el polinucleótido se expone a un ambiente que puede contener una actividad nucleolítica, incluyendo, por ejemplo, un medio de cultivo de tejido o tras la administración a un sujeto vivo, ya que los polinucleótidos modificados pueden ser menos susceptibles a degradación.

Un polinucleótido que comprende nucleótidos de origen natural y enlaces fosfodiéster se pueden sintetizar químicamente o se puede producir usando procedimientos de ADN recombinante, usando un polinucleótido apropiado como molde. En comparación, un polinucleótido que comprende análogos de nucleótido o enlaces covalentes distintos de enlaces fosfodiéster en general se sintetizarán químicamente, aunque una enzima tal como T7 polimerasa puede incorporar ciertos tipos de análogos de nucleótido en un polinucleótido y, por lo tanto, se puede usar para producir tal polinucleótido de manera recombinante a partir de un molde apropiado (Jellinek et al., supra, 1995).

Cuando un polinucleótido codifica un péptido, por ejemplo, una parte de péptido de promiostatina o un agente de péptido, la secuencia codificante en general está contenida en un vector y está ligada de manera operativa a elementos reguladores apropiados, incluyendo, si se desea, un promotor o potenciador específico de tejido. El péptido codificado puede estar operativamente limitado, por ejemplo, una marca de péptido tal como una marca His-6 o similares, que pueden facilitar la identificación de la expresión del agente en la célula diana. Un péptido de etiqueta de polihistidina tal como His-6 se puede detectar usando un catión divalente tal como ion de níquel, ion de cobalto; o similares. Las marcas de péptido adicionales incluyen, por ejemplo, un epítipo FLAG, que se puede detectar usando un anticuerpo anti-FLAG (véase, por ejemplo, Hopp et al., BioTechnology 6: 1204 (1988) Patente de Estados Unidos Nº 5.011.912); un epítipo e-myc, que se puede detectar usando un anticuerpo específico para el epítipo; biotina, que se puede detectar usando estreptavidina o avidina; y glutatión S-transferasa, que se puede detectar usando glutatión. Tales marcas pueden proporcionar la ventaja de que puedan facilitar el aislamiento del péptido o agente de péptido ligado de manera operativa, por ejemplo, cuando se desea obtener un péptido sustancialmente purificado que corresponde a un fragmento proteolítico de un polipéptido de miostatina.

Como se usa en el presente documento, el término "ligado operativamente" o "asociado operativamente" significa que dos o más moléculas se posicionan entre sí con de manera que actúan como una unidad individual y efectúan una función atribuible a una o ambas moléculas o su combinación. Por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido de la invención se puede ligar de manera operativa a un elemento regulador, en cuyo caso el elemento regulador confiere su efecto regulador sobre el polinucleótido de manera similar a la forma en la que el elemento regulador efectuaría una secuencia de polinucleótidos con la que normalmente está asociada a una célula. Un polinucleótido que codifica una secuencia también puede estar ligado de manera operativa a una segunda secuencia de codificación (o más) de manera que un polipéptido quimérico se pueda expresar a partir de las secuencias de codificación ligadas de manera operativa. El polipéptido quimérico puede ser un polipéptido de

fusión, en el que dos (o más) péptidos codificados se traducen en un único polipéptido, es decir, están unidos de manera covalente a través de un enlace peptídico; o se pueden traducir como dos péptidos discretos que, tras la traducción, pueden estar unidos de manera operativa entre sí para formar un complejo estable.

Un polipéptido quimérico en general muestra alguna o todas las características de cada uno de sus componentes peptídicos. Como tal, un polipéptido quimérico puede ser particularmente útil en la realización de la invención, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en una realización, un procedimiento de la invención puede modular la transducción de la señal de miostatina en una célula. De este modo, cuando un componente peptídico de un polipéptido quimérico codifica un dominio de localización de compartimiento celular y un segundo componente peptídico codifica un polipéptido Smad dominante negativo, el polipéptido quimérico funcional dominante se puede translocar al compartimiento celular designado por el dominio de localización de compartimiento celular y puede tener la actividad negativa dominante del polipéptido Smad, por lo tanto modulando la transducción de la señal de miostatina en la célula.

Los dominios de compartimentalización celular se conocen bien e incluyen, por ejemplo, un dominio de localización de membrana de plasma, una señal de localización nuclear, una señal de localización de la membrana mitocondrial, una señal de localización de retículo endoplasmático, o similares (véase, por ejemplo, Hancock et al., EMBO J. 10:4033 - 4039, 1991; Buss et al., Mol. Célula. Biol. 8:3960-3963, 1988; Patente de Estados Unidos N° 5.776.689). Tal dominio puede ser útil para dirigir un agente a un compartimiento particular en la célula, o para dirigir el agente para secreción desde una célula. Por ejemplo, el dominio quinasa de un receptor de miostatina tal como Act RIIB en general está asociado a la superficie interna de la membrana plasmática. De este modo, un polipéptido quimérico que comprende un receptor dominante negativo de dominio de miostatina quinasa, por ejemplo, un receptor dominante negativo Act RIIB, que carece de actividad quinasa, puede además comprender un dominio de localización de membrana plasmática, vocalizando por lo tanto localizando el dominio Act RIIB quinasa dominante negativo a la membrana celular interna.

Como se describe en el presente documento, un péptido de señal pro-GDF tiene actividad de localización celular. Como se usa en el presente documento, el término "actividad de localización celular." Se refiere a la capacidad de un péptido de señal para dirigir la translocación de un péptido ligado de manera operativa a él a uno o más compartimientos intracelulares específicos o para dirigir la secreción de la molécula de la célula. Como tal, un péptido de señal pro-GDF puede ser particularmente útil para dirigir la translocación de un péptido u otro agente ligado de manera operativa al péptido de señal en los mismos compartimientos intracelulares como un GDF expresado naturalmente que tiene sustancialmente el mismo péptido de señal. Además, el péptido de señal, por ejemplo, un péptido de señal de promiostatina que comprende aproximadamente los primeros 15 a 30 aminoácidos de promiostatina, puede dirigir la secreción de una manera operativa ligada a agente de la célula mediante la misma ruta que el pro-GDF de origen natural que tiene el péptido de señal. De este modo, los agentes particularmente útiles para realizar un procedimiento se describe en el presente documento incluyen un prodominio de GDF o su parte de péptido funcional que está ligado de manera operativa a un péptido de señal de GDF, preferiblemente una promiostatina o un péptido de señal de pro-GDF-11.

Un polinucleótido descrito en el presente documento se puede poner en contacto directamente con una célula diana. Por ejemplo, oligonucleótidos útiles como moléculas no codificantes, ribozimas, o agentes de formación de tríplex se pueden poner directamente en contacto con una célula diana, después de lo cual entran en la célula y efectúan su función. Un agente polinucleotídico también puede interactuar específicamente con un polipéptido, por ejemplo, un receptor de miostatina (o miostatina), alterando por lo tanto la capacidad de la miostatina de interactuar específicamente con el receptor. Tales polinucleótidos, así como los procedimientos de preparación e identificación de tales polinucleótidos, se describen en el presente documento o de otra manera son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, O'Connell et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93 : 5883 - 5887, 1996; Tuerk y Gold, Science 249: 505 - 510, 1990; Gold et al., Ann. Rev. Biochem. 64: 763 - 797, 1995).

Un polinucleótido descrito en el presente documento, que puede codificar una parte de péptido de un polipéptido pro-GDF tal como promiostatina, o puede codificar un polipéptido de miostatina mutante, o puede codificar un receptor de GDF o su parte de péptido funcional, o puede ser un agente polinucleotídico útil en la realización de un procedimiento descrito en el presente documento puede estar contenido en un vector, que puede facilitar la manipulación del polinucleótido, que incluye la introducción del polinucleótido en una célula diana. El vector puede ser un vector de clonación, que 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, donde el polinucleótido codifica un péptido, para expresar el péptido codificado en una célula particular. Un vector de expresión puede contener los elementos de expresión necesarios para lograr, por ejemplo, la transcripción sostenida del polinucleótido de codificación, o los elementos reguladores pueden estar ligados de manera operativa al polinucleótido antes que se comience a clonar en los elementos pueden estar ligados de manera operativa al polinucleótido antes que se comience a clonar en el vector.

Un vector de expresión (o el polinucleótido) en general contiene o codifica una secuencia promotora, que puede proporcionar tejido específico constitutivo o, si se desea, inducible o expresión específica de la fase de desarrollo del polinucleótido codificante, una secuencia de reconocimiento de poli-A, y un sitio de reconocimiento de ribosoma o sitio de entrada de ribosoma interno, u otros elementos reguladores tal como un potenciador, que puede ser específico del tejido. El vector también puede contener elementos requeridos para la replicación en un sistema huésped procariótico o eucariótico o ambos, como se desee. Tales vectores, que incluyen vectores de plásmido y vectores virales tales como bacteriófago, baculovirus, retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus vaccinia, virus del bosque semliki y vectores de virus asociado a adeno, se conocen bien y se pueden comprar de una fuente comercial (Promega, Madison WI; Stratagene, La Jolla CA; GIBCO/BRL, Gaithersburg MD) o se pueden construir por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Meth. Enzymol., Vol.185; Goeddel, ed. (Academic Press, Inc., 1990); Jolly, Canc. Gene Ther. 1: 51 - 64, 1994; Flotte, J. Bioenerg. Biomemb. 25: 37 - 42, 1993; Kirshenbaum et al., J. Clin. Invest. 92: 381 - 387, 1993).

Un promotor inducible por tetraciclina (tet) puede ser particularmente útil para dirigir la expresión de un polinucleótido, por ejemplo, un polinucleótido que codifica una forma dominante negativa de miostatina, en el que el sitio de procesamiento proteolítico ha sido mutado, o que codifica un prodominio de miostatina, que puede formar un complejo con un péptido de miostatina madura, o que codifica una forma negativa dominante de un receptor de GDF. Tras la administración de tetraciclina, o un análogo de tetraciclina, a un sujeto que contiene un polinucleótido ligado de manera operativa a un promotor inducible de tet, la expresión del péptido codificado está inducido por lo cual el péptido puede efectuar su actividad, por ejemplo, por lo cual un agente peptídico puede reducir o inhibir la transducción de la señal de miostatina. Tal procedimiento se puede usar, por ejemplo, para inducir la hipertrofia de músculo en un organismo adulto.

El polinucleótido también puede estar ligado de manera operativa a un elemento regulador específico de tejido, por ejemplo, un elemento regulador específico de célula muscular, de manera que la expresión de un péptido codificado se restringe a las células musculares en un individuo, o a células musculares en una población mixta de células en cultivo, por ejemplo, un cultivo de órganos. Los elementos reguladores específicos de las células musculares que incluyen, por ejemplo, el promotor de creatina quinasa de músculo (Sternberg et al., Mol. Célula. Biol. 8: 2896 - 2909, 1988, que se incorpora en el presente documento por referencia) y el potenciador / promotor de la cadena ligera de miosina (Donoghue et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88: 5847 - 5851, 1991) se conocen bien en la técnica.

Los vectores de expresión viral pueden ser particularmente útiles para introducir un polinucleótido en una célula, particularmente una célula en un sujeto. Los vectores virales proporcionan la ventaja que pueden infectar células huésped con relativamente alta eficacia y puede infectar tipos de células específicas. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un prodominio de miostatina o su parte de péptido funcional se puede clonar en un vector baculovirus, que después se puede usar para infectar una célula huésped de insecto, proporcionando por lo tanto un medio para producir grandes cantidades del prodominio codificado. El vector viral también se puede derivar de un virus que infecta células de un organismo de interés, por ejemplo, células huésped de vertebrado tales como células huésped de mamífero, aviar o pisciformes. Los vectores virales pueden ser particularmente útiles para introducir un polinucleótido útil en la realización de un procedimiento de la invención en una célula diana. Los vectores virales se han desarrollado para uso en particular sistemas huésped, particularmente sistemas de mamífero e incluyen, por ejemplo, vectores retrovirales, otros vectores lentivirus tales como los basados en el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), vectores de adenovirus, adenoasociados, vectores de virus herpes, vectores de virus vacunal, y similares (véase Miller y Rosman, BioTechniques 7:980 - 990, 1992; Anderson et al., Nature 392: 25 - 30 Suppl., 1998; Venna y Somia, Nature 389: 239 - 242, 1997; Wilson, New Engl. J. Med. 334: 1185 - 1187 (1996)).

Cuando los retrovirus, por ejemplo, se usan para transferencia de genes, los retrovirus de replicación competentes teóricamente se pueden desarrollar debido a la recombinación del vector retroviral y las secuencias del gen viral en la línea celular de empaquetamiento utilizada para producir el vector retroviral. Las líneas celulares de empaquetamiento en las que la producción del virus del componente de replicación por recombinación se han reducido o eliminado se pueden usar para minimizar la probabilidad de que se producirá un componente de retrovirus de replicación producido. Todos los sobrenadantes del vector retroviral usados para infectar células se seleccionan para virus competentes de replicación por ensayos convencionales tales como ensayos de PCR y transcriptasa inversa. Los vectores retrovirales permiten la integración de un gen heterólogo en un genoma de células huésped, que permite que el gen pase a las células hijas después de la división celular.

Un polinucleótido, que puede estar contenido en un vector, se puede introducir en una célula por cualquiera de una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica (Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1987, y suplementos a lo largo de 1995)). Tales procedimientos incluyen, por ejemplo, transfección, lipofección, microinyección, electroporación y, con vectores virales, infección; y pueden incluir el uso de liposomas, microemulsiones o similares, que puede facilitar la introducción del polinucleótido en la célula y

puede proteger al polinucleótido de la degradación antes de su introducción en la célula. La selección de un procedimiento particular, por ejemplo, sobre la célula en la que el polinucleótido se va a introducir, así como si la célula se aísla en cultivo, o está en un tejido u órgano en cultivo o *in situ*.

La introducción de un polinucleótido en una célula por infección con un vector viral es particularmente ventajosa ya que puede introducir de manera eficaz la molécula de ácido nucleico en una célula *ex vivo* o *in vivo* (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.399.346). Además, los virus están muy especializadas y se pueden seleccionar como vectores basados en la capacidad de infectar y propagarse en uno o pocos tipos específicos de células. De este modo, su especificidad natural se puede usar para dirigir la molécula de ácido nucleico contenida en el vector a tipos de células específicos. Como tal, un vector basado en un HIV se puede usar para infectar linfocitos T, un vector basado en un adenovirus se puede usar, por ejemplo, para infectar células epiteliales respiratorias, un vector basado en un herpesvirus se puede usar para infectar células neuronales, y similares. Otros vectores, tal como virus adenoasociado pueden tener intervalo mayor de células huésped y, por lo tanto, se pueden usar para infectar diferentes tipos de células, aunque vectores virales o no virales también se pueden modificar con receptores o ligandos para alterar la especificidad diana mediante episodios mediados por receptores.

También se describen en el presente documento anticuerpos que específicamente se unen a una parte de péptido de un polipéptido de promiostatina o un polipéptido de miostatina mutante. Los anticuerpos particularmente útiles incluyen anticuerpos que específicamente se unen a un prodominio de miostatina, o su parte de péptido funcional, y anticuerpos que se unen a un polipéptido de promiostatina y reducen o inhiben la escisión proteolítica de la promiostatina a un péptido de miostatina madura. Además, el anticuerpo puede específicamente unirse a un receptor de GDF, o su parte de péptido funcional, como se describe más adelante. Procedimientos de preparación y aislamiento de un anticuerpo se describen en mayor detalle más adelante.

Miostatina es esencial para la regulación apropiada de la masa de músculo esquelético. Cuando se compara con ratones de tipo natural, los ratones genéticamente deficientes en miostatina, que carecen de miostatina, tienen dos a tres veces cantidad de músculo debido a una combinación de hiperplasia e hipertrofia. Como se describe en el presente documento, los ratones genéticamente deficientes en miostatina también tienen una reducción notable en la acumulación de grasa debida, al menos en parte, a un estado anabólico de tejido de músculo esquelético por todo el cuerpo. De manera inversa, la sobreexpresión de miostatina, en ratones atímicos indujo un síndrome de desgaste que se parece al estado caquéctico observado en pacientes humanos que padecen enfermedades crónicas tales como cáncer o SIDA. Como se describe adicionalmente en el presente documento, la actividad de miostatina se puede mediar mediante una transducción de la señal que tiene las características de la ruta de la transducción de la señal Smad.

De acuerdo con lo anterior, un efecto de miostatina sobre una célula se puede modular poniendo en contacto la célula con un agente que afecta a la transducción de la señal de miostatina en la célula.

Como se usa en el presente documento, el término "modular," cuando se usa en referencia a un efecto de miostatina sobre una célula, significa que la transducción de la señal de miostatina en la célula o bien se incrementa o se reduce o se inhibe. Los términos "incrementar" y "reducir o inhibir" son útiles en referencia a un nivel inicial de actividad de la transducción de la señal de, que puede ser el nivel de actividad de la ruta de transducción de la señal en la ausencia de miostatina, o el nivel de actividad en una célula normal en la presencia de miostatina. Por ejemplo, la ruta de actividad de la transducción de la señal de miostatina muestra una actividad particular en una célula muscular puesta en contacto con miostatina, y, tras la puesta en contacto adicional de la célula muscular con un prodominio de miostatina, la actividad de la transducción de la señal de miostatina se puede reducir o inhibir. Como tal, un prodominio de miostatina es un agente útil para reducir o inhibir la transducción de la señal de miostatina. De manera similar, un prodominio de otro miembro de la familia de GDF tal como un prodominio de GDF-11, u otro miembro de la familia de TGF- β tal como un prodominio de activina, prodominio MIS, o similares, puede ser útil para reducir la transducción de la señal de miostatina. Los términos "reducir o inhibir" se usan en el presente documento debido a que, en algunos casos, el nivel de transducción de la señal de miostatina se puede reducir por debajo de un nivel que se puede detectar por un ensayo particular. Como tal, puede no ser determinable usando tal ensayo como si un bajo nivel de transducción de la señal de miostatina permanezca, o si la transducción de la señal se inhibe completamente.

Como se usa en el presente documento, el término "transducción de la señal de miostatina" se refiere a la serie de episodios, en general una serie de interacciones proteína-proteína, que se produce en una célula debido a la interacción específica de interacción específica de miostatina con un receptor de miostatina expresado sobre la superficie de la célula. Como tal, la transducción de la señal de miostatina se puede detectar, por ejemplo, mediante la detección de una interacción específica de miostatina con su receptor sobre una célula, mediante la detección de la fosforilación de uno o más polipéptidos implicados en una ruta de transducción de la señal de miostatina en la célula, mediante detección de la expresión de uno o más genes que están específicamente inducidos a la transducción de la señal de miostatina, o mediante la detección de un cambio fenotípico que se produce en

respuesta a la transducción de la señal de miostatina (véanse los Ejemplos). Como se describe en el presente documento, un agente útil en la modulación de miostatina puede actuar como agonista para estimular la transducción de la señal de miostatina o como un antagonista para reducir o inhibir transducción de la señal de miostatina.

- 5 Los procedimientos descritos en el presente documento se ejemplifican en general en el presente documento con respecto a miostatina. Sin embargo, se debe reconocer que los procedimientos pueden más ampliamente modular un efecto de otros péptidos de GDF, por ejemplo, GDF-11, sobre una célula poniendo en contacto la célula con un agente que afecta a la traducción de señal debida a GDF en la célula. Procedimientos de poner en práctica en ámbito completo de la descripción se conocerá fácilmente en vista de la presente descripción, que incluye, por ejemplo, procedimientos para identificar receptores de GDF, procedimientos para identificar agentes que modulan la transducción de la señal debida a una interacción específica del GDF con su receptor, y similares.

- 15 Una transducción de la ruta de la señal de miostatina se ejemplifica en el presente documento por la ruta de Smad, que se inicia tras la interacción de miostatina específicamente con el dominio extracelular de un receptor de activina de tipo II y se propaga mediante las interacciones de polipéptidos intracelulares, incluyendo proteínas de Smad, en la célula. En general, la transducción de la señal de miostatina está asociada a la fosforilación o desfosforilación de polipéptidos intracelulares específicos tales como polipéptidos Smad. De este modo, la transducción de la señal de miostatina en una célula se puede detectar mediante la detección de un aumento del nivel de fosforilación de uno o más polipéptidos de Smad en la presencia de miostatina cuando se compara con el nivel de fosforilación de los polipéptidos en la ausencia de miostatina. Un procedimiento descrito en el presente documento proporciona un medio para incrementar o reducir la transducción de la señal de miostatina y, por lo tanto, el nivel de fosforilación de un polipéptido de Smad implicado en una ruta transducción de la señal de miostatina se incrementarán por encima de un nivel normal o disminuye por debajo de un nivel esperado a en la presencia de miostatina, respectivamente.

- 25 Un procedimiento descrito en el presente documento se puede realizar, por ejemplo, poniendo en contacto en condiciones adecuadas una célula diana y un agente que afecta a la transducción de la señal de miostatina en la célula. Las condiciones adecuadas se pueden proporcionar mediante la colocación de la célula, que puede ser una célula aislada o puede ser un componente de un tejido u órgano, en un medio de cultivo apropiado, o poniendo en célula in situ en un organismo. Por ejemplo, un medio que contiene la célula se puede poner en contacto con un agente que afecta a la capacidad de miostatina para interactuar específicamente con un receptor de miostatina expresado sobre la célula, o con un agente que afecta a una ruta de transducción de la señal de miostatina en la célula. En general, la célula es un componente de un tejido u órgano en un sujeto, en cuyo caso poner en contacto la célula puede comprender la administración del agente al sujeto: Sin embargo, la célula también se puede manipular en cultivo, después se puede manipular en cultivo, administrarse a un sujeto, o usarse para producir un animal no humano transgénico.

- 35 Un agente útil en un procedimiento descrito en el presente documento puede ser cualquier tipo de molécula, por ejemplo, un polinucleótido, un péptido, un peptidomimético, peptoides tales como peptoides vinillogos, una molécula pequeña orgánica, o similares, y puede actuar de cualquiera de las diversas formas para afectar a la transducción de la señal de miostatina. El agente puede actuar extracelularmente mediante la unión a miostatina o un receptor de miostatina tal como un receptor de activina, alterando por lo tanto la capacidad de miostatina de interactuar específicamente con su receptor, o puede actuar intracelularmente para alterar la transducción de la señal de miostatina en la célula. Además, el agente puede ser un agonista, que imita o potencia el efecto de miostatina sobre una célula, por ejemplo, la capacidad de miostatina de interactuar específicamente con su receptor, aumentando por lo tanto la transducción de la señal de miostatina en la célula; o puede ser un antagonista, que puede reducir o inhibir el efecto de miostatina en una célula, reduciendo o inhibiendo por lo tanto transducción de la señal de miostatina en la célula.

- 45 Como se usa en el presente documento, el término "interacción específica" o "se une específicamente" o similares significa que dos moléculas forman a complejo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. El término se usa en el presente documento en referencia a diversas interacciones, incluyendo, por ejemplo, la interacción de miostatina y un receptor de miostatina, la interacción de los componentes intracelulares de una ruta de transducción de la señal de miostatina, la interacción de un anticuerpo y su antígeno, y la interacción de un prodominio de miostatina con miostatina. Una interacción específica se puede caracterizar por una constante de disociación de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M, en general al menos aproximadamente 1×10^{-7} M, usualmente al menos aproximadamente 1×10^{-8} M, y particularmente al menos aproximadamente 1×10^{-9} M o 1×10^{-10} M o mayor. Una interacción específica en general es estable en condiciones fisiológicas, incluyendo, por ejemplo, las condiciones que se producen en un individuo vivo tal como un ser humano vertebrado o invertebrado, así como condiciones que se producen en un cultivo de células tal como se usa para mantener células de mamífero o células de otro organismo vertebrado o un organismo invertebrado. Además, una interacción específica tal como la interacción extracelular de un prodominio de miostatina y miostatina en general es estable en condiciones tales como los usados para acuicultura de un organismo marino comercialmente disponible. Procedimientos para

determinar si dos moléculas interactúan específicamente se conocen bien e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmón de superficie, y similares.

Un agente que altera una interacción específica de miostatina con su receptor puede actuar, por ejemplo, mediante unión a miostatina de manera que no pueda interactuar específicamente con su receptor celular, mediante competición con miostatina para unión a su receptor, o de otra manera mediante desviación del requerimiento de que la miostatina interactúe específicamente con sus receptores con el fin de inducir la transducción de la señal de miostatina. Un receptor de miostatina truncado tal como un dominio extracelular soluble de un receptor de miostatina es un ejemplo de un agente que se puede unir a miostatina, secuestrando por lo tanto miostatina y reduciendo o inhibiendo su capacidad para interactuar específicamente con un receptor de superficie celular de miostatina. Un predominio de miostatina o su parte de péptido funcional es otro ejemplo de un agente que puede unirse a miostatina, reduciendo o inhibiendo por lo tanto la capacidad de la miostatina de interactuar específicamente con un receptor de la superficie celular de miostatina. Tales antagonistas de miostatina son útiles en la práctica de un procedimiento descrito en el presente documento, particularmente para reducir o inhibir la transducción de la señal de miostatina en una célula.

La folistatina es otro ejemplo de un agente que se puede unir a miostatina, reduciendo o inhibiendo por lo tanto la capacidad de miostatina de interactuar específicamente con su receptor. Folistatina se puede unir a e inhibir la actividad de diversos miembros de la familia de TGF- β , incluyendo miostatina (GDF-8; Patente de Estados Unidos Nº 6.004.937) y GDF-11 (Gamer et al., Devel. Biol. 208: 222 - 232, 1999) y por lo tanto, se puede usar para realizar un procedimiento como se ha descrito. Aunque previamente se ha descrito el uso de folistatina para modular los efectos de miostatina (Patente de Estados Unidos Nº 6.004.937), no se sabía, antes de la presente descripción, que la folistatina reduce o inhibe la capacidad de miostatina de interactuar específicamente con un receptor de miostatina tal como Act RIIB.

Un agente útil en un procedimiento descrito en el presente documento también puede interactuar con un receptor celular de miostatina, compitiendo por lo tanto con miostatina por el receptor. Tal agente puede ser, por ejemplo, un anticuerpo que específicamente se une a un receptor de la superficie celular de miostatina, incluyendo todo o una parte del dominio de unión a miostatina, evitando por lo tanto que la miostatina interactúe específicamente con el receptor. Tal anticuerpo del receptor de anti-miostatina se puede seleccionar por su capacidad para unirse específicamente al receptor sin activar la transducción de la señal de miostatina y, por lo tanto, puede ser útil como un antagonista de miostatina para reducir o inhibir la transducción de la señal de miostatina; o se puede seleccionar por su capacidad para unirse específicamente al receptor y activar la transducción de la señal de miostatina, actuando de este modo como un agonista de miostatina. El anticuerpo se puede elevar usando un receptor de miostatina, o el dominio extracelular del receptor, como un inmunógeno, o puede ser un anticuerpo anti-idiotipo, que se induce contra un anticuerpo anti-miostatina e imita a la miostatina. Los anticuerpos de receptores Anti-GDF se describen en mayor detalle más adelante.

Un agente útil en un procedimiento descrito en el presente documento también puede ser un agente que reduce o inhibe la escisión proteolítica de un polipéptido pro-GDF a un péptido de GDF maduro, reduciendo o inhibiendo por lo tanto la transducción de la señal de GDF. Tal agente puede ser un inhibidor de la proteasa, particularmente uno que inhiba la actividad de una proteasa que reconoce y escinde un sitio de reconocimiento proteolítico Arg-Xaa-Xaa-Arg (SEC ID Nº: 21). Cuando el pro-GDF es promiostatina, un anticuerpo anti-miostatina que reduce o inhibe la unión específica de una proteasa al sitio de escisión proteolítica Arg-Xaa-Xaa-Arg (SEC ID Nº: 21) en miostatina también se puede usar para reducir o inhibir la proteólisis de promiostatina, reduciendo por lo tanto la cantidad de miostatina madura producida. Tal anticuerpo puede unirse al sitio de escisión proteolítica, o se puede unir en algún otro sitio sobre el polipéptido pro-GDF de manera que la unión y la escisión por la proteasa se reduce o se inhibe.

Además, un agente útil en un procedimiento descrito en el presente documento puede ser un receptor de miostatina mutante, que, por ejemplo, carece de la actividad de transducción de la señal de miostatina en respuesta a unión a miostatina, o tiene actividad de transducción de la señal de miostatina constitutiva. Por ejemplo, un receptor de miostatina mutante puede tener una mutación puntual, una supresión, o similares en su dominio quinasa de manera que el receptor carece de actividad quinasa. Tal receptor de miostatina mutante negativa dominante carece de la capacidad de transmitir la transducción de la señal de miostatina a pesar del hecho que se pueda unir específicamente a miostatina.

Un agente útil en un procedimiento descrito en el presente documento también puede modular el nivel de actividad de un polipéptido intracelular implicado en la ruta e la transducción de la señal de miostatina. Como se describe en el presente documento, la regulación del crecimiento de músculo por la miostatina puede implicar los componentes de una ruta transducción de la señal que se activa mediante receptores de activina de tipo II (véanse los Ejemplos 7 y 9; véase, también, el Ejemplo 14). La miostatina interactúa específicamente con receptores de activina de tipo IIB (Act RIIB) expresados en células COS en cultivo (Ejemplo 7). La baja afinidad de unión indica que la unión a miostatina de Act RIIB *in vivo* puede implicar otros factores, similares a TGF- β , que tiene de manera significativa

una mayor afinidad para el receptor de tipo II cuando el receptor de tipo I también está presente (Attisano et al., Cell 75: 671 - 680,1993), o a otros sistemas que requieren otras moléculas para presentar el ligando al receptor de señalización (Massague, supra, 1998; Wang et al., Cell 67: 795 - 805, 1991).

La interacción específica de la miostatina con Act RIIIB indica que la transducción de la señal de miostatina puede implicar los componentes de la ruta transducción de la señal Smad. De este modo, la ruta transducción de la señal Smad proporciona una diana para modular el efecto de miostatina sobre una célula, y agentes que afectan a la ruta de Smad pueden ser útiles para la modulación de la transducción de la señal de miostatina en una célula.

Los agentes útiles para modular el nivel o actividad de componentes polipéptidos intracelulares de una transducción de la señal de GDF incluyen agonistas, que pueden incrementar la actividad de la transducción de la señal, y antagonistas, que pueden reducir o inhibir la actividad de la transducción de la señal. Con respecto a miostatina, por ejemplo, agentes que pueden incrementar la actividad de la transducción de la señal de miostatina se ejemplifican por los inhibidores de fosfatasa, que puede reducir o inhibir la desfosforilación de polipéptidos Smad, prolongando por lo tanto la actividad de transducción de señal del Smad. Los polipéptidos Smad 6 o Smad 7 dominantes negativos, que pueden anular el efecto inhibitorio de Smad 6 y Smad 7 en la transducción de la señal de miostatina, son ejemplos adicionales de agentes que pueden incrementar la actividad de la transducción de la señal de miostatina incrementando la transducción de la señal de Smad.

Los agentes antagonistas que pueden reducir o inhibir la actividad de la transducción de la señal de miostatina se ejemplifican por polipéptidos de Smad dominantes negativos tal como Smad 2, Smad 3 o Smad 4 dominantes negativos, en los que los sitios de fosforilación C-terminales se han mutado. Los polipéptidos de Smad inhibidores tales como Smad 6 y Smad 7, que inhiben la activación de Smad 2 y Smad 3; y un polipéptido c-ski, que se une a polipéptidos de Smad e inhibe la transducción de la señal, son ejemplos adicionales de antagonistas útiles para reducir o inhibir la transducción de la señal de miostatina disminuyendo transducción de la señal de Smad.

Cuando el agente que actúa intracelularmente es un péptido, se puede poner en contacto con la célula directamente, o un polinucleótido que codifica el péptido (o polipéptido) se puede introducir en la célula y el péptido se puede expresar en la célula. Se reconoce que alguno de los péptidos útiles en un procedimiento descrito en el presente documento son relativamente grandes y, por lo tanto, pueden no atravesar fácilmente la membrana de la célula. Sin embargo, se conocen diversos procedimientos para introducir un péptido en una célula. La selección de un procedimiento para introducir tal péptido en una célula dependerá, en parte, sobre las características de la célula diana, en la que el polipéptido se va a proporcionar. Por ejemplo, cuando las células diana, o unos pocos tipos de célula incluyendo las células diana, expresan un receptor, que tras unirse a un ligando particular, se internaliza en la célula, el agente peptídico puede estar asociado de manera operativa con el ligando. Tras la unión al receptor, el péptido se transloca en la célula por endocitosis mediada por receptor. El agente peptídico también se puede encapsular en un liposoma o formularse en un complejo lipídico, que puede facilitar la entrada del péptido en la célula, y se puede además modificar para expresar un receptor (o ligando), como antes. El agente peptídico también se puede introducir en una célula por ingeniería del péptido para que contenga un dominio de transducción de proteína tal como el dominio de transducción de proteína del virus de inmunodeficiencia humana TAT, que facilita la translocación del péptido en la célula (véase Schwarze et al., Science 285: 1569 - 1572 (1999), véase, también, Derossi et al., J. Biol. Chem. 271: 18188 (1996)).

La célula diana también se puede poner en contacto con el polinucleótido que codifica el agente peptídico, que se puede expresar en la célula. El agente peptídico expresado puede ser un receptor de GDF mutante o su parte de péptido. Ejemplo de un receptor de GDF mutante incluye una forma deficiente en quinasa de un receptor de miostatina tal como un Act RIIA o Act RIIIB dominante negativo, que puede, pero no necesita, tener la capacidad de unirse específicamente a un ligando (por ejemplo, miostatina); y un receptor de miostatina u otro de GDF, tal como una forma soluble de un receptor de miostatina, que se une a miostatina, secuestrándolo por lo tanto de interactuar específicamente con un receptor celular de miostatina; una forma negativa dominante de un polipéptido de Smad tal como un Smad 3 dominante negativo, en el que los sitios de fosforilación C-terminales se han mutado (Lin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10669 - 10674,1997); un polipéptido Smad 7, que inhibe la activación de Smad 2 y Smad 3 (Heldin et al., Nature 390:465-471, 1997); o un polipéptido c-ski, que puede unirse a un polipéptido de Smad e inhibir la transducción de la señal por el Smad (Sutcliffe et al., Genes Devel. 4: 1462 - 1472, 1990).

La expresión de un agente peptídico c-ski en una célula puede ser particularmente útil para la modulación de la transducción de la señal de miostatina. Los ratones que carecen de c-ski muestran una reducción severa en la masa de músculo esquelético (Berk et al., Genes Devel. 11: 2029 - 2039, 1997), mientras que ratones transgénicos que sobreexpresan c-ski en músculo muestran una hipertrofia de músculo notable (Sutcliffe et al., supra, 1990). c-ski interactúa con y bloquea la actividad de ciertas proteínas Smad, incluyendo Smad 2, Smad 3 y Smad 4, que median la señalización de TGF- β y receptores de activina de tipo II (Luo et al., Genes Devel. 13: 2196 - 1106, 1999; Stroschein et al., Science 286: 771 - 774, 1999; Sun et al., Mol. Cell 4: 499 - 509,1999a; Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 96:112442 - 12447, 1999b; Akiyoshi et al., J. Biol. Chem. 274: 35269, 1999). De este modo, en

vista de la presente descripción que la actividad de miostatina se puede mediar mediante unión a Act RIIB, se reconocerá que la actividad de miostatina, o de cualquier GDF que utiliza una ruta Smad, se puede modular incrementando o disminuyendo la expresión de c-ski en una célula diana.

Un agente útil en un procedimiento descrito en el presente documento puede ser un polinucleótido que pueda estar en contacto con o introducirse en una célula como se ha descrito anteriormente. En general, pero no necesariamente, el polinucleótido se introduce en la célula, cuando efectúa su función o bien directamente, o después de la transcripción o después de la traducción o ambos. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, el polinucleótido puede codificar un agente peptídico, que se expresa en la célula y modula la actividad de miostatina. Tal péptido expresado puede ser, por ejemplo, un polipéptido de miostatina mutante, que no se puede escindir en miostatina activa; o puede ser un receptor de miostatina mutante, por ejemplo, un dominio del receptor de miostatina extracelular truncado; un dominio del receptor de miostatina extracelular asociado de manera operativa a un dominio de anclaje de membrana; o un receptor de miostatina mutante que carece de actividad proteína quinasa. Los procedimientos para introducir un polinucleótido en una célula se ejemplifican más adelante o de otra manera se conocen en la técnica.

Un agente polinucleotídico útil en un procedimiento descrito en el presente documento también puede ser, o puede codificar, una molécula no codificante, una ribozima o un agente de formación de tríplex. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser (o puede codificar) una secuencia nucleotídica no codificante tal como una secuencia de c-ski no codificante, que puede actuar como un agonista para incrementar la transducción de la señal de miostatina en una célula; o una secuencia nucleotídica no codificante de Smad, que puede actuar o bien como un agonista para incrementar la transducción de la señal de miostatina o como antagonista para reducir o inhibir transducción de la señal de miostatina, dependiendo de la secuencia nucleotídica no codificante de Smad particular. Tales polinucleótidos se pueden poner en contacto directamente con una célula diana y, tras la captación por la célula, puede efectuar su actividad no codificante, ribozima o de formación de tríplex; o se puede codificar por un polinucleótido que se introduce en una célula, tras lo cual el polinucleótido se expresa para producir, por ejemplo, una molécula de ARN no codificante o ribozima, que efectúa su actividad.

Un polinucleótido no codificante, ribozima o agente de formación de tríplex es complementario a una secuencia diana, que puede ser una secuencia de ADN o ARN, por ejemplo, ARN mensajero, y puede ser una secuencia de codificación, a secuencia de nucleótidos que comprende una unión intrón-exón, una secuencia reguladora tal como una secuencia Shine-Delgado, o similares. El grado de complementariedad es tal que el polinucleótido, por ejemplo, un polinucleótido no codificante, puede interactuar específicamente con la secuencia diana en una célula. Dependiendo de la longitud total de polinucleótido no codificante u otro, una o más discordancias con respecto a la secuencia diana se puede tolerar sin la pérdida de la especificidad del polinucleótido para su secuencia diana. De este modo, pocas si hay algunas discordancias se toleran en una molécula no codificante que consta, por ejemplo, de 20 nucleótidos, mientras varias discordancias no afectarán a la eficacia de la hibridación de una molécula no codificante que es complementaria, por ejemplo, a la longitud completa de un ARNm que codifica un polipéptido celular. El número de discordancias que se puede tolerar se puede estimar, por ejemplo, usando fórmulas bien conocidas para determinar la cinética de hibridación (véase Sambrook et al., supra, 1989) o se puede determinar empíricamente usando los procedimientos como se describen en el presente documento o de otra manera conocidos en la técnica, particularmente mediante determinación de la presencia del polinucleótido no codificante, ribozima, o agente de formación de tríplex en una célula disminuye el nivel de la secuencia diana o la expresión de un polipéptido codificado por la secuencia diana en la célula.

Un polinucleótido útil como una molécula no codificante, una ribozima o un agente de formación de tríplex puede inhibir la traducción o escindir la molécula de ácido nucleico, modulando por lo tanto la transducción de la señal de miostatina en una célula. Una molécula no codificante, por ejemplo, puede unirse a un ARNm para formar una molécula bicatenaria que no se puede traducir en una célula. Se prefieren los oligonucleótidos no codificantes de al menos aproximadamente 15 a 25 nucleótidos ya que se sintetizan más fácilmente y se pueden hibridar específicamente con una secuencia diana, aunque moléculas no codificantes más largas se pueden expresar a partir de polinucleótido introducido en la célula diana. Las secuencias de nucleótidos útiles como moléculas no codificantes se pueden identificar usando procedimientos bien conocidos, por ejemplo, procedimientos de secuenciación de genes (véase, por ejemplo, Seimiya et al., J. Biol. Chem. 272: 4631 - 4636 (1997)). Cuando la molécula no codificante se pone en contacto directamente con una célula diana, puede estar de manera operativa asociada a un grupo químicamente reactivo tal como EDTA ligado a hierro, que escinde un ARN diana en el sitio de hibridación. Un agente de formación de tríplex agente, in comparación, con stall transcription (Maher et al., No codificante Res. Devel. 1:227 (1991); Helene, Anticancer Drug Design 6:569 (1991)). De este modo, un agente de formación de triplexación se puede diseñar para reconocer, por ejemplo, una secuencia de un elemento regulador del gen de Smad, reduciendo o inhibiendo por lo tanto la expresión de un polipéptido de Smad en la célula, modulando por lo tanto la transducción de la señal de miostatina en una célula diana.

Se describe en el presente documento un procedimiento de identificación de un agente que puede alterar el efecto

de un GDF tal como miostatina sobre una célula, particularmente agentes que pueden alterar la capacidad del GDF de interactuar específicamente con su receptor celular. Tales agentes pueden actuar incrementando o disminuyendo la capacidad del GDF de interactuar específicamente con su receptor y, por lo tanto, son útiles para incrementar o disminuir la transducción de la señal de GDF, respectivamente. Un procedimiento de selección se ejemplifica en el presente documento usando un receptor de miostatina, por ejemplo, un receptor de activina de tipo II tal como Act RIIA o Act RIIB.

Un procedimiento de selección descrito en el presente documento se puede realizar, por ejemplo, poniendo en contacto en condiciones adecuadas la miostatina, o su parte de péptido funcional, un receptor de miostatina tal como Act RIIA o Act RIIB. Y un agente a ensayar. La miostatina, el receptor y el agente se pueden poner en contacto en cualquier orden según se desee. Como tal, el procedimiento de selección se puede usar para identificar los agentes que pueden inhibir de manera competitiva o no competitiva la unión de miostatina al receptor, agentes que pueden mediar o potenciar la unión de miostatina al receptor, agentes que pueden inducir la disociación de miostatina unida específicamente desde el receptor, y agentes que de otra manera afectan a la capacidad de miostatina de inducir la transducción de la señal, tales agentes que tienen actividad agonista o antagonista. Las reacciones de control apropiadas se realizan para confirmar que la acción del agente es específica con respecto a la miostatina u otro receptor de GDF.

Las condiciones adecuadas para realizar un procedimiento de selección descrito en el presente documento pueden ser cualesquiera condiciones que permitan que la miostatina interactúe específicamente con su receptor, incluyendo procedimientos como se describen en el presente documento (véanse los Ejemplos 7 y 9), o de otra manera conocidos en la técnica. De este modo, las condiciones adecuadas para realizar el ensayo de selección pueden ser, por ejemplo, condiciones *in vitro* usando receptor de miostatina sustancialmente purificado, condiciones de cultivo de célula, utilizando una célula que normalmente expresa un receptor de miostatina, por ejemplo, un adipocito o una célula muscular, o una célula que se ha modificado genéticamente para expresar un receptor de miostatina funcional sobre su superficie; o condiciones *in situ* como se produce en un organismo.

Un procedimiento de selección descrito en el presente documento también se puede realizar usando los procedimientos de modelado molecular como se han descrito anteriormente. La utilización de un procedimiento de modelado molecular proporciona un medio rentable conveniente para identificar esos agentes, entre una gran población de manera que una genoteca de combinación de agentes potenciales, que es lo más probable que interactúen específicamente con un receptor de GDF, reduciendo por lo tanto el número de agentes potenciales que necesitan seleccionarse usando un ensayo biológico. Tras la identificación de agentes que interactúan específicamente con un receptor de GDF tal como Act RIIB usando un procedimiento de modelado molecular, los agentes seleccionados se pueden determinar para evaluar su capacidad de modular un efecto de un GDF tal como miostatina sobre una célula usando los procedimientos descritos en el presente documento.

La capacidad de un agente de ensayo para modular un efecto de miostatina se puede detectar usando los procedimientos como se describen en el presente documento (véanse los Ejemplos 7 y 9) o de otra manera conocidos en la técnica. El término "agente de ensayo" o "molécula de ensayo" se usa ampliamente en el presente documento para significar cualquier agente que se está examinando para evaluar la actividad agonista o antagonista en un procedimiento descrito en el presente documento. Aunque el procedimiento en general se usa como un ensayo de selección para identificar las moléculas previamente conocidas que pueden actuar como agentes agonistas o antagonistas como se describe en el presente documento, los procedimientos también se pueden usar para confirmar que un agente que se sabe que tiene una actividad particular de hecho tiene la actividad, por ejemplo, en la estandarización de la actividad del agente.

Un procedimiento de selección descrito en el presente documento se puede realizar, por ejemplo, poniendo en contacto la miostatina con una célula que se ha modificado genéticamente para expresar un receptor Act RIIB, y determinar el efecto de un agente, por ejemplo, un Act RIIB dominante negativo, examinando la fosforilación de un polipéptido de Smad implicado en la ruta de la transducción de la señal de miostatina. Si se desea, la célula además se puede modificar genéticamente para que contenga una secuencia de nucleótido indicadora, la expresión de lo cual depende de la ruta de la transducción de la señal de miostatina, por ejemplo, en la activación de la ruta de Smad, y el efecto del agente de ensayo se puede determinar mediante comparación de la expresión de la secuencia de nucleótido indicadora en la presencia y ausencia del agente, la miostatina, o ambos. La expresión de la secuencia de nucleótidos indicadora se puede detectar, por ejemplo, detectando una transcripción de ARN de la secuencia de nucleótido indicadora, o mediante la detección de un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótido indicadora. Un indicador de polipéptido puede ser, por ejemplo, una β -lactamasa, cloranfenicol acetiltransferasa, adenosina desaminasa, aminoglicósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa, higromicina-B fosfotransferasa, timidina quinasa, β -galactosidasa, luciferasa o un polipéptido de xantina guanina fosforibosiltransferasa o similares, y se puede detectar, por ejemplo, mediante detección de la radiactividad, luminescencia, quimioluminiscencia, fluorescencia, actividad enzimática o unión específica debida al polipéptido indicador.

Un procedimiento de selección descrito en el presente documento proporciona la ventaja que se puede adaptar a análisis de alto rendimiento y, por lo tanto, se puede usar para seleccionar genotecas de combinación de los agentes de ensayo con el fin de identificar los agentes que pueden modular un efecto de miostatina sobre una célula, incluyendo los agentes que pueden alterar una interacción específica de miostatina y un receptor de miostatina. Procedimientos para la preparar genoteca de combinación de moléculas que se pueden ensayar para evaluar una actividad deseada se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, procedimientos de preparación de una genoteca de despliegue de fago de péptidos, que puede ser péptidos encodados (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.622.699; Patente de Estados Unidos Nº 5.206.347; Scott y Smith, Science 249: 386 - 390, 1992; Markland et al., Gene 109: 13 - 19, 1991); una genoteca de péptidos (Patente de Estados Unidos Nº 5.264.563); una genoteca peptidomimética (Blondelle et al., Trends Anal. Chem. 14: 83 - 92, 1995; una genoteca de ácido nucleico (O=Connell et al., supra, 1996; Tuerk y Gold, supra, 1990; Gold et al., supra, 1995); una genoteca de oligosacáridos (York et al., Carb. Res., 285: 99 - 128, 1996; Liang et al., Science, 274: 1520 - 1522, 1996; Ding et al., Adv. Expt. Med. Biol., 376: 261 - 269, 1995); a J. célula Biol., 130: 567 - 577, 1995); o una genoteca química que contiene, por ejemplo, fármacos u otros agentes farmacéuticos (Gordon et al., J. Med. Chem., 37:1385 - 1401, 1994; Ecker y Crooke, Bio/Technology, 13: 351 - 360, 1995). Polinucleótidos pueden ser particularmente útiles como agentes que pueden modular una interacción específica de miostatina y su receptor debido a que las moléculas de ácido nucleico que tienen especificidad de unión para la diana celular, incluyendo polipéptidos celulares, existen de forma natural, y porque las moléculas sintéticas que tienen tal especificidad se pueden preparar e identificar fácilmente (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.750.342).

En vista de la presente descripción, se reconocerá de diversos sistemas de modelo animal se pueden usar como herramientas de investigación para identificar los agentes útiles. Por ejemplo, ratones transgénicos u otros animales experimentales se pueden preparar usando las diversas construcciones de inhibidores de miostatina descritas en el presente documento, y el organismo transgénico no humano se puede examinar directamente para determinar el efecto producido por la expresión de diversos niveles de un agente particular en el organismo. Además, el organismo transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, se puede cruzar con otros ratones, por ejemplo, con ratones ob/ob, db/db, o amarillo letal agouti, para determinar los niveles óptimos de expresión de un inhibidor miostatina útil para tratar o prevenir un trastorno tal como obesidad, diabetes de tipo II, o similares. Como tal, se describen en el presente documento organismos transgénicos no humanos, particularmente organismos transgénicos que contienen un polinucleótido que codifica un prodominio de miostatina, que puede incluir el péptido de señal de miostatina o un polinucleótido que codifica un polipéptido de miostatina mutante.

Se conocen diversos procedimientos para producir un animal transgénico. En un procedimiento, un embrión en la fase pronuclear ("un embrión de célula") se recoge de una hembra y el transgén se microinyecta en el embrión, en cuyo caso el transgén se integrará cromosómicamente en las células germinales y células somáticas del animal maduro resultante. En otro procedimiento, células del tronco embrionario se aíslan y el transgén se incorporan en la células del tronco mediante electroporación, transfección de plásmido o microinyección; las células de tronco se reintroducen después en el embrión, cuando colonizan y contribuyen a la línea germinar. Procedimientos para microinyección de polinucleótidos en las especies de mamífero se describen, por ejemplo, en Patente de Estados Unidos Nº 4.873.191. En todavía otro procedimiento, células embrionarias se infectan con un retrovirus que contiene el transgén, por lo cual las células germinales del embrión tienen un transgén integrado cromosómicamente en él.

Cuando los animales que van a ser transgénicos son aviares, microinyección en el pronúcleo del huevo fertilizado es problemático debido a que los huevos fertilizados aviares en general a través de la división de la célula durante las primeras veinte horas en el oviducto y, por lo tanto, el pronúcleo es inaccesible. De este modo, el procedimiento de infección de retrovirus se prefiere para preparar especies aviares transgénicos (véase la Patente de Estados Unidos No. 5.162.215). Si se va a usar microinyección con especies aviares, sin embargo, el embrión se puede obtener a partir de animales sacrificados aproximadamente 2,5 horas después de la puesta del huevo colocado previo, el transgén se microinyecta en el citoplasma del disco germinal y el embrión se cultiva en un célula huésped hasta madurez (Love et al., Biotechnology 12,1994). Cuando los animales que van a ser transgénicos son bovinos o porcinos, la microinyección puede estar impedida por la opacidad de los huevos, haciendo por lo tanto que los núcleos sean difíciles identificar, por microscopía diferencial tradicional de interferencia - contraste. Para superar este problema, los huevos primero se pueden centrifugar para segregar los pronúcleos para mejor visualización.

Los animales transgénicos no humanos pueden ser bovinos, porcinos, ovinos, aviares u otros animales. El transgén se puede introducir en células diana embrionarias en diversas fases de desarrollo, y diferentes procedimientos se seleccionan dependiendo de la fase de desarrollo de la célula diana embrionaria. El cigoto es la mejor diana para microinyección. El uso de cigotos como una diana para la transferencia de genes tiene una ventaja principal ya que el ADN inyectado puede incorporarse en el gen huésped antes de la primera escisión (Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82: 4438 - 4442, 1985). Como consecuencia, todas las células del animal transgénico no humano llevan el transgén incorporado, contribuyendo de este modo a la transmisión eficaz del transgén de descendencia del fundador, ya que 50% de las células germinales alojarán el transgén.

Un animal transgénico se puede producir mediante cruce de dos animales quiméricos, cada uno de los cuales incluye material genético humano dentro de las células usadas en la reproducción. El veinticinco por ciento de la descendencia resultante serán animales transgénicos que son homocigóticos para el material genético exógeno, 50% de los animales resultantes serán homocigóticos, y el 25% restante carecerá de material genético exógeno y tendrá un fenotipo de tipo natural.

En el procedimiento de microinyección, el transgén se digiere y se purifica dejando libre de cualquier ADN vector, por ejemplo, mediante electroforesis en gel. El transgén puede incluir un promotor asociado de manera operativa, que interactúa con las proteínas celulares implicadas en la transcripción, y proporciona la expresión constitutiva, expresión específica de tejido, expresión específica de la fase de desarrollo, o similares. Tales promotores incluyen los de citomegalovirus (CMV), virus de leucemia de Moloney (MLV), y herpes virus, así como los de los genes que codifican metalotioneína, actina esquelética, Fosfenolpiruvato carboxilasa (PEPCK), fosfoglicerato (PGK), dihidrofolato reductasa (DHFR), y timidina quinasa (TK). Promotores de largas repeticiones virales terminales (LTR) tal como sarcoma de virus de Rous LTR también se pueden emplear. Cuando los animales que van a ser transgénicos son aviares, los promotores preferidos incluyen los de un gen β -globina de pollo, gen de lisozima de pollo, y virus de leucosis aviar. Las construcciones útiles en la transfección en plásmido de células del tronco embrionarias emplearán reguladores de elementos adicionales, incluyendo, por ejemplo, elementos potenciadores para estimular la transcripción, aceptores de ajuste, señales de terminación y poliadenilación, sitios de unión a ribosoma para permitir la traducción, y similares.

En el procedimiento de infección retroviral, el desarrollo del embrión no humano se puede cultivar *in vitro* a la fase de blastocisto. Durante este tiempo, los blastómeros pueden ser dianas para la infección retroviral (Jaenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1260 - 1264, 1976). La infección eficaz de los blastómeros se obtiene mediante tratamiento enzimático para reducir la zona pelúcida (Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986). El sistema de vector viral usado para introducir el transgén es típicamente un retrovirus deficiente de replicación que lleva el transgén (Jahner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82: 6927 - 6931, 1985; Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82: 6148 - 6152, 1985). La transfección se obtiene fácilmente y eficazmente mediante cultivo de los blastómeros en una monocapa de células que producen virus (Van der Putten et al., supra, 1985; Stewart et al., EMBO J. 6: 383 - 388, 1987). De manera alternativa, la infección se puede determinar en una fase posterior. Virus o células que producen virus se pueden inyectar en el blastocoele (Jahner et al., Nature 298: 623 - 628, 1982). La mayoría de los fundadores serán mosaico para el transgén ya que la incorporación se produce solamente en un subconjunto de las células que forman el animal transgénico no humano. Además, el fundador puede contener diversas infecciones retrovirales del transgén en diferentes posiciones en el genoma, que en general se segregará en la descendencia. Además, también es posible introducir transgenes en la línea germinal, aunque con baja eficiencia, por infección retroviral intrauterina del embrión de media gestación (Jahner et al., supra, 1982).

También se puede dirigir células del tronco embrionario (ES) para la introducción del transgén. Las células ES se obtienen a partir de la preimplantación de embriones cultivados *in vitro* y se fusionan con embriones (Evans et al. Nature 292: 154 - 156, 1981; Bradley et al., Nature 309: 255 - 258, 1984; Gossler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9065 - 9069, 1986; Robertson et al., Nature 322: 445 - 448, 1986). Los transgenes se pueden introducir eficazmente en las células ES mediante transfección de ADN o mediante transducción mediada por retrovirus. Tales células ES transformadas pueden después combinarse con blastocitos a partir de un animal no humano. Las células ES después de esto colonizan el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante (véase Jaenisch, Science 240: 1468 - 1474, 1988).

Como se describe en el presente documento, la miostatina puede ejercer su actividad, al menos en parte, mediante la ruta transducción de la señal de Smad, y la expresión de miostatina puede estar asociada a diversas afecciones patológicas. Como tal, se proporcionan nuevas dianas para el tratamiento de diversas afecciones patológicas asociadas a miostatina, incluyendo afecciones metabólicas tales como obesidad y diabetes de tipo II. De acuerdo con lo anterior se describen en el presente documento son procedimientos para mejorar la gravedad de una afección patológica en un sujeto, en el que la afección patológica se caracteriza al menos en parte por una cantidad anormal, desarrollo o actividad metabólica anormal de músculo o tejido adiposo, por modulación de la transducción de la señal de miostatina en una célula muscular o célula de tejido adiposo en el sujeto.

Las funciones de la miostatina como un regulador negativo de crecimiento de músculo (McPherron et al., supra, 1997). Los ratones genéticamente deficientes en miostatina que pesan aproximadamente 25% a 30% más que las camadas de tipo natural, y este incremento en peso corporal en los ratones examinados dio como resultado completamente un incremento notable en el peso de tejido de músculo esquelético. En ratones que carecen de miostatina, los músculos esqueléticos pesaron aproximadamente 2 a 3 veces como mucho más que los músculos correspondientes de las camadas de tipo natural. Este incremento de peso de músculo en los ratones homocigóticos deficientes producidos a partir de una combinación de hiperplasia e hipertrofia.

Como se describe en el presente documento, los ratones genéticamente deficientes en miostatina también tienen aumento de la masa muscular, esquelética aunque hasta un menor grado observados en los ratones mutantes homocigóticos, demostrando de este modo que la miostatina actúa de una manera dependiente de la dosis *in vivo* (véase Ejemplo 1). Además, la sobreexpresión de la miostatina en animales tiene el efecto contrario con respecto al crecimiento del músculo. Por ejemplo, ratones atímicos que llevan tumores que expresan miostatina desarrollaron un síndrome de desgaste caracterizado por una pérdida notable de músculo y peso de grasa (véase Ejemplo 8). Este síndrome en los ratones atímicos se parece al estado caquético que se produce en los pacientes con enfermedades crónicas tales como cáncer o SIDA.

Los niveles en suero de material inmunorreactivo a miostatina están correlacionados con el estado de los pacientes con respecto a desgaste de músculo (González-Kadavid et al., Proc. Natl. Acad. Med., USA 95: 14938 - 14943, 1998). De este modo, pacientes con SIDA, que también mostró signos de caquexia como se mide por pérdida de peso total, tenía niveles en suero ligeramente aumentados de material inmunorreactivo de miostatina comparados o bien con machos normales sin SIDA o a pacientes de SIDA que no tenían pérdida de peso. Sin embargo, la interpretación de estos resultados se complicó debido al material inmunorreactivo de miostatina detectado en muestras de suero no tenían la movilidad sobre geles de SDS que se esperaba para miostatina procesada auténtica.

Como se describe en el presente documento, la miostatina no afecta solamente a la masa muscular, sino también afecta al metabolismo global de un organismo. Por ejemplo, miostatina se expresa en tejido adiposo, y los ratones genéticamente deficientes en miostatina tienen una reducción notable en la acumulación de grasa como los animales de edad (véanse los Ejemplos II y III). Aunque ningún mecanismo para la acción de miostatina se propone en el presente documento, el efecto de miostatina puede ser efecto directo de miostatina sobre el tejido adiposo, o puede ser un efecto indirecto provocado por la carencia de actividad de miostatina en el tejido de músculo esquelético. Independientemente del mecanismo, el efecto anabólico global en el tejido muscular que da como resultado la respuesta a la actividad de miostatina disminuida puede alterar el metabolismo global del organismo y afecta al almacenamiento de energía en la forma de grasa, como se demuestra por la introducción de una mutación de miostatina en una raza de ratón obeso (ratones amarillos letal agouti (Ay)), que suprimían la acumulación de grasa cinco veces (véase el Ejemplo 5). El metabolismo de glucosa anormal también estaba parcialmente suprimido en ratones agouti que contienen la mutación de miostatina. Estos resultados demuestran que los procedimientos de inhibición de miostatina se pueden usar para tratar o prevenir enfermedades metabólicas tales como obesidad y diabetes de tipo II.

La invención es útil, por ejemplo, para mejorar la gravedad de diversas afecciones patológicas, incluyendo, por ejemplo, la caquexia asociada a enfermedades crónicas tales como cáncer (véase Norton et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 7289 - 327, 1987), así como afecciones tal como diabetes de tipo II, obesidad, y otros trastornos metabólicos. Como se usa en el presente documento, el término "afección patológica" se refiere a un trastorno que se caracteriza, al menos en parte, por una cantidad, desarrollo o actividad metabólica anormal de tejido muscular o adiposo. Tales afecciones patológicas, que incluyen, por ejemplo, obesidad; afecciones asociadas a obesidad, por ejemplo, aterosclerosis, hipertensión, e infarto de miocardio; trastornos de desgaste de músculo como distrofia muscular, enfermedades neuromusculares, caquexia, y anorexia; y trastornos metabólicos tales como diabetes de tipo II, que en general, pero no necesariamente, está asociada a obesidad, son particularmente capaces de tratar usando un procedimiento de la invención.

Como se usa en el presente documento, el término "anormal," cuando se usa en referencia a la cantidad, desarrollo o actividad metabólica de tejido muscular o adiposo, se usa en sentido relativo en comparación con una cantidad, desarrollo o actividad metabólica que los clínicos expertos u otro experto relevante reconocería por ser normal o ideal. Tales valores normales o ideales se conocen por los clínicos y se basan en los valores medios en general observados o deseados en individuos sanos en una población correspondiente. Por ejemplo, el clínico conocería que la obesidad está asociada a un peso corporal que es aproximadamente el veinte por ciento por encima de un intervalo de peso "ideal" para una persona de una altura y tipo de cuerpo particular. Sin embargo, el clínico reconocería que una construcción de cuerpo no es necesariamente obesa simplemente en virtud de tener un peso de cuerpo que está un veinte por ciento o más por encima del peso esperado para una persona de la misma altura y tipo de cuerpo en una población correspondiente diferente. De manera similar, el experto conocería un paciente que presenta esa apariencia parece disminuir anormalmente la actividad muscular se puede identificar por tener desarrollo de músculo anormal, por ejemplo, sometiendo al paciente a diversos ensayos de resistencia y comparando los resultados con los esperados para un individuo sano medio en una población correspondiente.

La invención puede mejorar la gravedad de una afección patológica que se caracteriza, al menos en parte, por una cantidad, desarrollo o actividad metabólica anormal en tejido muscular o adiposo, mediante la modulación de la transducción de la señal de miostatina en una célula de tejido muscular o adiposo asociada a la etiología de la afección. Como se usa en el presente documento, el término "mejorar," cuando se usa en referencia a la gravedad de una afección patológica, significa que los signos o síntomas asociados a la afección se disminuyen. Los signos o

síntomas a controlar serán característicos de una afección patológica particular y son conocidos por los expertos en la técnica, así como los procedimientos para controlar los signos y afecciones. Por ejemplo, cuando la afección patológica es diabetes de tipo II, los clínicos expertos controlan los niveles de glucosa, tasas de eliminación de glucosa, y similares en el sujeto. Cuando la afección patológica es obesidad o caquexia, el clínico puede simplemente controlar el peso corporal de sujeto.

El agente a administrar al sujeto se administra en condiciones que faciliten el contacto del agente con la célula diana y, si es apropiado, entrar en la célula. La entrada de un agente polinucleotídico en una célula, por ejemplo, se puede facilitar incorporando el polinucleótido en un vector viral que puede infectar las células. Si un vector viral específico para el tipo de célula no está disponible, el vector se puede modificar para expresar un receptor (o ligando) específico para un ligando (o receptor) expresado en la célula diana, o se puede encapsular dentro de un liposoma, que también se puede modificar para incluir tal ligando (o receptor). Un agente peptídico se puede introducir en una célula mediante diversos procedimientos, incluyendo, por ejemplo, mediante ingeniería genética del péptido para que contenga un dominio de transducción de proteína tal como el dominio de transducción de proteína TAT del virus de inmunodeficiencia humana, que puede facilitar la translocación del péptido en la célula (véase Schwarze et al., supra, 1999; Derossi et al., supra, 1996).

La presencia del agente en la célula diana se puede identificar directamente, por ejemplo, mediante unión de manera operativa de una etiqueta detectable al agente, mediante el uso de un anticuerpo específico para el agente, particularmente un agente peptídico, o mediante detección de un efecto cadena abajo al agente, por ejemplo, fosforilación disminuida de un polipéptido de Smad en la célula. Un agente se puede marcar de manera que sea detectable usando procedimientos bien conocidos en la técnica (Hermanson, "Bioconjugate Techniques" (Academic Press 1996); véase, también, Harlow y Lane, supra, 1988). Por ejemplo, un agente peptídico o polinucleotídico se puede etiquetar con diversos restos detectables incluyendo una etiqueta radiactiva, una enzima tal como fosfatasa alcalina, biotina, un fluorocromo, y similares. Cuando el agente está contenido en un kit, los reactivos para etiquetar el agente también pueden estar incluidos en el kit, o los reactivos se pueden comprar separadamente de una fuente comercial.

Un agente útil en la invención se puede administrar en el sitio de la afección patológica, o se puede administrar mediante cualquier otro procedimiento que proporcionen las células diana con el polinucleótido o péptido. Como se usa en el presente documento, el término "células diana" significa células musculares o adipocitos que se van a poner en contacto con el agente. Para la administración a un sujeto vivo, el agente en general se formula en una composición farmacéutica adecuada para la administración al sujeto. De este modo, las composiciones farmacéuticas que contienen un agente son útiles para la modulación de la transducción de la señal de miostatina en una célula, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como tal, los agentes son útiles como medicamentos para tratar a un sujeto que padece una afección patológica como se define en el presente documento.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas tal como agua o solución salina fisiológicamente tamponada u otros disolventes o vehículos 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 conjugado. Tales compuestos fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, carbohidratos, tal como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular o estabilizantes o excipientes. Los expertos en la técnica conocerán que la elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable, lo que incluye un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de las características físico - químicas de agente terapéutico y en la vía de administración de la composición, que puede ser, por ejemplo, por vía oral o parenteral tal como vía intravenosa, y por inyección, incubación, u otro tal procedimiento conocido en la técnica. La composición farmacéutica también puede contener un reactivo tal como un reactivo diagnóstico; sustancia nutricional, toxina, o agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico de cáncer.

El agente se puede incorporar dentro de un material encapsulador como en una emulsión aceite en agua, una microemulsión, micela, micela mixta, liposoma, microesfera u otra matriz polimérica (véase, por ejemplo, Gregoriadis, Liposome Technology, Vol. 1 (CRC Press, Boca Ratón, FL 1984); Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77 (1981)). Los liposomas, por ejemplo, que constan de fosfolípidos u otros lípidos, son no tóxicos, vehículos fisiológicamente aceptables y metabolizables que son relativamente simples para preparar y administrar. Los liposomas "sigilosos" (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Números 5.882.679; 5.395.619; y 5.225.212) son un ejemplo de tales materiales de encapsulación particularmente útiles para preparar una composición farmacéutica útil para practicar un procedimiento de la invención, y otros liposomas "enmascarados" de manera similar se pueden usar, tales liposomas que extienden el tiempo que el agente terapéutico permanece en la circulación. Los liposomas catiónicos, por ejemplo, también se pueden modificar por receptores o ligandos específicos (Morishita et al., J. Clin. Invest., 91: 2580 - 2585 (1993)). Además, un agente polinucleotídico se puede introducir en una célula usando, por ejemplo, complejos de ADN de adenovirus-polilisina (véase, por ejemplo,

Michael et al., J. Biol. Chem. 268: 6866 - 6869 (1993)).

La vía de administración de una composición farmacéutica que contiene un agente que altera la transducción de la señal de miostatina dependerá, en parte, de la estructura química de la molécula. Polipéptidos y polinucleótidos, por ejemplo, no son particularmente útiles cuando se administran por vía oral debido a que se pueden degradar en el tracto digestivo. Sin embargo, procedimientos para modificar los polipéptidos químicamente, por ejemplo, para hacerlos menos susceptibles a la degradación por proteasas endógenas o más absorbibles a través del tracto alimentario se conocen bien (véase, por ejemplo, Blondelle et al., supra, 1995; Ecker y Crook, supra, 1995). Además, un agente peptídico se puede preparar usando D-aminoácidos, o pueden contener uno o más dominios basados en peptidomiméticos, que son moléculas orgánicas que imitan la estructura del dominio peptídico; o basándose en un peptoide tal como un peptoide viniloligo.

Una composición farmacéutica como se describe en el presente documento se puede administrar a un individuo mediante diversas rutas incluyendo, por ejemplo, por vía oral o parenteral, tales como vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraorbital, intracapsular, intraperitoneal, intrarrectal, intracisternal o mediante absorción pasiva o facilitada a través de la piel usando, por ejemplo, un parche cutáneo o iontoforesis transdérmica, respectivamente. Además, la composición farmacéutica se puede administrar mediante inyección, intubación, vía oral o tópica, la última de las cuales puede ser pasiva, por ejemplo, mediante aplicación directa de una pomada, o activa, por ejemplo, usando una pulverización nasal o inhalador, en cuyo caso un componente de la composición es un propulsor adecuado. Una composición farmacéutica también se puede administrar al sitio de una afección patológica, por ejemplo, por vía intravenosa o intraarterial en un vaso sanguíneo que abastece a un tumor.

La cantidad total de un agente a administrar en la práctica de un procedimiento de la invención a administrar a un sujeto en forma de una única dosis, o bien como inyección en embolada o mediante infusión durante un período relativamente corto de tiempo, o se puede administrar usando un protocolo de tratamiento fraccionado, en el que se administran dosis múltiples durante un período prolongado de tiempo. Los expertos en la técnica conocerán que la cantidad de la composición farmacéutica para tratar una afección patológica en un sujeto depende de muchos factores incluyendo la edad y salud general del sujeto así como la vía de administración y el número de tratamientos a administrar. En vista de estos factores, los expertos en la técnica ajustan la dosis particular según sea necesario. En general, la formulación de la composición farmacéutica y las vías y frecuencia de administración se determinan, inicialmente, usando los ensayos clínicos de Fase I y Fase.

La composición farmacéutica se puede formular para formulación oral, tal como un comprimido, o una forma en solución o en suspensión; o puede comprender una mezcla con un vehículo o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para aplicaciones entéricas o parenterales, y se puede combinar, por ejemplo, con los vehículos farmacéuticamente aceptables usuales no tóxicos para comprimidos, gránulos, cápsulas, supositorios, soluciones, emulsiones, suspensiones, u otra forma adecuada para uso. Los vehículos, además de los descritos anteriormente, puede incluir glucosa, lactosa, manosa, goma arábiga, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea, triglicéridos de longitud de cadena media, dextranos, y otros vehículos adecuados para uso en la fabricación de preparaciones, en forma sólida, semisólida o líquida. Además se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes o colorantes y perfumes, por ejemplo un agente seco estabilizante tal como trióxido (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.314.695).

Se describe en el presente documento un procedimiento para la modulación del crecimiento de tejido muscular o tejido adiposo en un sujeto. Como se describe en el presente documento, receptores de GDF tales como Act RIIA y Act RIIB están implicados en la mediación de los efectos de un GDF tal como miostatina, que está implicada en la formación de tejido muscular y tejido adiposo. De este modo, un procedimiento de modulación del crecimiento de tejido muscular o tejido adiposo puede incluir la afectación de la transducción de la señal de un receptor de GDF, tal como un receptor de activina, por ejemplo, Act RIIA o Act RIIB. Tal procedimiento se puede realizar poniendo en contacto células del tejido, o que se expresan en las células, un receptor de GDF mutante, que tiene actividad negativa dominante, actividad constitutiva, o similares.

Un procedimiento de modulación del crecimiento de tejido muscular o tejido adiposo en un organismo puede de manera alternativa realizarse mediante la administración al organismo de un agente que afecte a la transducción de la señal de miostatina. Preferiblemente, el agente es o codifica un prodominio de miostatina o un polipéptido de miostatina mutante, o bien que puede incluir un péptido de señal de miostatina. Como se usa en el presente documento, el término "crecimiento" se usa en un sentido relativo en referencia a la masa de tejido muscular o masa de tejido adiposo en un organismo que se ha sometido a tal procedimiento comparado con un organismo correspondiente que no se ha sometido a tales procedimientos. De este modo, cuando se realiza tal procedimiento de manera que la transducción de la señal de miostatina se ha reducido o inhibido, se reconocerá que el crecimiento de tejido muscular en el organismo dará como resultado un incremento de masa muscular en el organismo cuando se compara con la masa muscular de un organismo correspondiente (o población de

organismos) en el que la transducción de la señal de miostatina no se había efectuado.

Un procedimiento descrito en el presente documento puede ser útil para incrementar la masa muscular o reducir el contenido de grasa de un organismo o ambos. Por ejemplo, cuando tal procedimiento se realiza en un organismo que es útil como fuente de alimento, el contenido de proteína del alimento puede estar aumentado, el nivel de colesterol puede estar disminuido, y la calidad de producto alimenticio puede estar mejorada. Tal procedimiento también puede ser útil para disminuir el crecimiento de tejido muscular en un organismo, por ejemplo, un organismo que es perjudicial para el ambiente, de manera que el organismo es menos capaz de competir en el ambiente. De este modo, un procedimiento descrito en el presente documento se puede realizar sobre cualquier organismo eucariótico que exprese miostatina, incluyendo un organismo vertebrado, por ejemplo, organismo mamífero, aviar o ictícola, o puede ser un organismo invertebrado, por ejemplo, un molusco, equinodermo, gasterópodo o cefalópodo.

El agente puede ser cualquier agente que altere la transducción de la señal de miostatina, como se describe en el presente documento, y se puede administrar al organismo de cualquier manera conveniente. Por ejemplo, cuando el organismo a tratar son peces, camarón, zamburriñas, o similares, que se crían en acuicultura, el agente se puede añadir al agua en la que los organismos se mantienen o se pueden incluir en su alimentación, particularmente cuando el agente es un péptido soluble o una molécula orgánica pequeña.

Cuando el agente usado en un procedimiento descrito en el presente documento es un polinucleótido que codifica un agente peptídico, un agente no codificante, o similares, células germinales de un organismo no humano que contiene el polinucleótido se puede seleccionar y se pueden producir organismos transgénicos que expresan el agente. Preferiblemente, el polinucleótido está bajo el control de un elemento regulador inducible, de manera que el agente codificado por el polinucleótido se puede expresar a la vez y durante una duración según se desee. De acuerdo con lo anterior, se describen en el presente documento organismos transgénicos no humanos, así como productos alimenticios producidos por estos organismos. Tales productos alimenticios tienen valor nutricional aumentado debido al incremento en el tejido muscular. Los animales transgénicos no humanos pueden ser cualesquiera especies como se describe en el presente documento, incluyendo organismos vertebrados tales como ganado vacuno, cerdos, ovejas, pollo, pavo y peces, y especies de invertebrado tal como camarón, langosta, cangrejos, calamar, ostras y oreja de mar.

La regulación de los miembros de la familia TGF- β y sus interacciones específicas con el receptor de la superficie celulares están comenzando a aclararse. De este modo, la coexpresión del prodominio de un miembro de la familia de TGF- β con una región madura de otro miembro de la familia TGF- β está asociada a la dimerización intracelular y secreción de homodímeros biológicamente activos (Gray et al., Science 247: 1328, 1990). Por ejemplo, uso del prodominio BMP-2 con la región madura de BMP-4 condujo a una expresión mejorada notablemente de BMP-4 maduro (Hammonds et al., Mol. Endocrinol. 5: 149, 1991). Para la mayoría de los miembros de la familia que se han estudiado, las especies homodímeras son biológicamente activas, mientras que otros miembros de la familia tales como las inhibinas (Ling et al., Nature 321 : 779, 1986) y los TGF- β (Cheifetz et al., Cell 48: 409, 1987), heterodímeros también se han detectado y parece que tienen diferentes propiedades biológicas que los homodímeros respectivos.

Los estudios de interacción receptor-ligando han revelado mucha información de cómo las células responden a estímulos externos, y han conducido al desarrollo de compuestos terapéuticamente importantes tales como eritropoyetina, los factores estimuladores de colonias, y PDGF. De este modo, se han hecho esfuerzos continuos en la identificación de los receptores que median la acción de los miembros de la familia TGF- β . Como se describe en el presente documento, la miostatina interactúa específicamente con un receptor de tipo II de activina. La identificación de esta interacción proporciona dianas para identificar antagonistas y agonistas útiles para propósitos terapéuticos agrícolas y humanos, por ejemplo, para tratar diversas afecciones patológicas tales como obesidad, diabetes de tipo II, y caquexia. La identificación de esta interacción específica también proporciona un medio para identificar otros receptores de miostatina, así como los receptores específicos de otros factores de diferenciación de crecimiento.

Un receptor de GDF descrito en el presente documento ejemplificado en el presente documento por un receptor de miostatina, particularmente un receptor de tipo II de activina, que interactúa específicamente con miostatina y con GDF-11. Sin embargo, receptores de miostatina que interactúan específicamente con miostatina, pero no con GDF-11, también se describen en el presente documento, como son receptores de GDF-11 que específicamente interactúan con GDF-11 pero no con miostatina, y similares. Por conveniencia de descripción, los receptores se refieren en el presente documento en general como un "receptor GDF" y se ejemplifican por un receptor de miostatina, que es un receptor que interactúa específicamente al menos con miostatina. Como tal, aunque se hace referencia en general a una interacción específica de miostatina con un receptor de miostatina, se reconocerá que la presente descripción más ampliamente abarca cualquier receptor de GDF, incluyendo un receptor de GDF-11, que interactúa específicamente al menos con GDF-11.

También se proporciona una línea celular recombinante que expresa un polipéptido de receptor de GDF, como son

anticuerpos que se unen específicamente al receptor, polinucleótidos sustancialmente purificados que codifican el receptor, y polipéptidos del receptor de GDF sustancialmente purificados. También se proporcionan partes de péptido de un receptor de GDF, incluyendo, por ejemplo, dominios extracelulares solubles de un receptor de GDF tal como un receptor de miostatina, que, como se describe en el presente documento, puede alterar la interacción específica de miostatina con un receptor celular de miostatina; un dominio de quinasa intracelular constitutivamente activo de un receptor de GDF, que puede inducir, estimular o de otra manera mantener la transducción de la señal de GDF en una célula; u otra parte truncada de un receptor de GDF que tiene una capacidad de modular la miostatina u otra transducción de la señal de GDF.

Se describen en el presente documento procedimientos para identificar un polipéptido de receptor de GDF, incluyendo procedimientos de selección de genotecas genómicas o de ADNc, que pueden ser genotecas de expresión, usando sondas de nucleótido o sondas de anticuerpo; procedimientos de selección de células que son sensibles a y, por lo tanto expresan el receptor, usando, por ejemplo, un GDF tal como miostatina o su parte de péptido funcional, ensayos de dos híbridos, como se ha descrito anteriormente, usando, por ejemplo, el péptido de GDF como un componente de un híbrido y péptidos expresados de una genoteca de ADNc, que se prepara a partir de células que expresan un receptor para GDF, como componentes de los segundos híbridos, y similares.

Como se ha descrito anteriormente, agentes que específicamente interactúan con un receptor de GDF, por ejemplo, un receptor de miostatina tal como Act RIIB como se identifica por el uso del receptor para seleccionar tales agentes. De manera inversa, un agente que se ha identificado por tener la capacidad de interactuar específicamente con un receptor de miostatina tal como el receptor Act RIIB, se puede usar para seleccionar receptores de miostatina adicionales u otros receptores de GDF. Tal procedimiento puede incluir la incubación de componentes tal como el agente (o miostatina u otro GDF) y una célula que expresa un receptor de GDF, que puede ser un receptor unido a membrana truncado o un receptor soluble, en condiciones suficientes para permitir que el agente (o GDF) interactuar específicamente con el receptor, midiendo el agente (o GDF) unido al receptor, y aislar el receptor. Un procedimiento de modelado molecular como se ha descrito anteriormente también puede ser útil como un procedimiento de selección para identificar un receptor de GDF, o su parte de péptido funcional.

También se proporcionan animales transgénicos no humanos que tienen un fenotipo caracterizado por la expresión de un receptor de GDF, estando conferido el fenotipo por un transgén contenido en las células somáticas y germinales del animal. El transgén comprende un polinucleótido que codifica el receptor de GDF, por ejemplo, polipéptido de receptor de miostatina. Los procedimientos de producción de tales animales transgénicos están descritos en el presente documento o se conocen de otra manera en la técnica.

Se describe en el presente documento un polinucleótido sustancialmente purificado que codifica toda o una parte de péptido de un receptor de GDF. Aunque un receptor de GDF se ejemplifica en el presente documento por un receptor de tipo II de activina, polinucleótidos que codifican receptores de activina de tipo II se han descrito previamente (Patente de Estados Unidos Nº 5.885.794). De este modo, se debe reconocer que tales receptores de activina de tipo II no están abarcados dentro de la presente invención (Massague, supra, 1998; Heldin et al., supra, 1997). De manera similar, receptores de tipo I de activina, incluyendo Act RIB; receptores TGF- β , incluyendo TGF- β RI y TGF- β RII; y receptores BMP, incluyendo BMP RIA, BMP RIB y BMP RII, se han descrito y se conocen bien en la técnica (Massague, supra, 1998; Heldin et al., supra, 1997) y, por lo tanto, y por lo tanto no están abarcados dentro de los receptores de GDF de la presente descripción.

Un polinucleótido descrito en el presente documento puede codificar un polipéptido que tiene una actividad de receptor de miostatina, por ejemplo, actividad de unión de miostatina, o puede codificar un receptor de miostatina mutante, por ejemplo, un receptor de miostatina mutante que tenga una mutación en un dominio quinasa, de manera que el mutante actúe como un receptor de miostatina negativo dominante (véase antes). De este modo, tal polinucleótido puede ser un polinucleótido de origen natural, sintético, o manipulado intencionalmente. Por ejemplo, partes de la secuencia de ARNm se puede alterar debido a patrones de ajuste de ARN o el uso de promotores alternativos para la transcripción de ARN. Como otro ejemplo, el polinucleótido se puede someter a mutagénesis dirigida al sitio. El polinucleótido también puede ser secuencia de nucleótido no codificante. Los polinucleótidos de receptor de GDF incluyen secuencias que degeneran como resultado del código genético. Existen 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los cuales se especifican por más de un codón. Por lo tanto, están incluidas todas las secuencias de nucleótidos degeneradas, siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido del receptor de GDF codificada por el polinucleótido esté funcionalmente sin cambio. También se incluyen secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos del receptor de miostatina.

Las partes de oligonucleótido de un polinucleótido que codifica un receptor de GDF de la invención también están abarcadas dentro de la presente invención. Tales oligonucleótidos en general son al menos aproximadamente de 15 bases de longitud, que es suficiente para permitir que el oligonucleótido se hibride de manera selectiva a un polinucleótido que codifica el receptor, y puede ser de al menos aproximadamente 18 nucleótidos o 21 nucleótidos o más de longitud. Como se usa en el presente documento, el término "hibridación selectiva" "se hibrida de manera

selectiva" se refiere a la hibridación en condiciones fisiológicas moderadamente rigurosas o altamente rigurosas, que pueden distinguir secuencias de nucleótidos relacionadas de las secuencias de nucleótidos no relacionadas.

En reacciones de hibridación de ácido nucleico, las condiciones usadas para lograr un nivel particular de rigurosidad variará, dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se están hibridando. Por ejemplo, la longitud, grado de complementariedad, composición de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, contenido relativo de GC:AT), y tipo de ácido nucleico, es decir, si el oligonucleótido o la secuencia de ácido nucleico diana es ADN o ARN, se pueden considerar en la selección de las condiciones de hibridación. Una consideración adicional es si uno de los ácidos nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, en un filtro. Procedimientos para seleccionar condiciones de rigurosidad apropiadas se pueden determinar empíricamente o estimarse usando diversas fórmulas, y se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., supra, 1989).

Un ejemplo de condiciones de rigurosidad progresivamente mayores es como sigue:

2X SSC/0,1 % de SDS a aproximadamente temperatura ambiente (condiciones de hibridación);

0,2X SSC/0,1% de SDS a aproximadamente temperatura ambiente (condiciones de baja rigurosidad);

0,2X SSC/0,1% de SDS a aproximadamente 42°C (condiciones de moderada rigurosidad); y

0,1X SSC a aproximadamente 68°C (condiciones de alta rigurosidad). El lavado se puede llevar a cabo usando solamente una de estas condiciones, por ejemplo, condiciones de alta rigurosidad, o cada una de las condiciones se puede usar, por ejemplo, durante 10 a 15 minutos cada una, en el orden enumerado anteriormente, repitiendo cualquiera o todas las etapas de las etapas enumeradas.

Un receptor de polinucleótido que codifica GDF se puede obtener mediante cuales de los varios procedimientos. Por ejemplo, el polinucleótido se puede aislar usando hibridación o técnicas basadas en ordenador, como se conocen bien en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, 1) hibridación de genotecas genómicas o de ADNc con sondas para detectar secuencias de nucleótidos homólogas; 2) selección de anticuerpo de genotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas; 3) reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre ADN genómico o ADNc usando cebadores capaces de hibridarse a la secuencia de ADN de interés; 4) las investigaciones de ordenador de las bases de datos de secuencias para secuencias similares (véase antes); 5) selección diferencial de una genoteca de ADN sustraída; y 6) ensayos de dos híbridos que usan, por ejemplo, un péptido de GDF maduro en uno de los híbridos.

En vista de la presente descripción que un receptor de activina interactúa específicamente con miostatina, sondas de oligonucleótido se pueden diseñar basándose en la secuencia que codifica un receptor de activina, por ejemplo, una secuencia que codifica el dominio extracelular, que se une a miostatina, y se usa para seleccionar una genoteca preparada a partir de células tales como células musculares o adipocitos, que son sensibles a miostatina, facilitando de esta modo la identificación de un polinucleótido que codifica un receptor de miostatina. Se pueden seleccionar además clones seleccionados, por ejemplo, mediante subclonación de las inserciones en un vector de expresión y, después de la expresión de las secuencias clonadas, la selección de los polipéptidos expresados usando miostatina.

Un polinucleótido descrito en el presente documento, por ejemplo, en polinucleótido que codifica un receptor de miostatina, se puede derivar de una especie de vertebrado, incluyendo un mamífero, aviar, o especies icícolas, o a partir de una especie de invertebrado. Los procedimientos de selección que dependen de la hibridación de ácido nucleico permiten el aislamiento de cualquier secuencia de gen a partir de cualquier organismo, siempre que esté disponible la sonda apropiada. Las sondas de oligonucleótido que corresponden a una parte de la secuencia que codifica la proteína en cuestión se pueden sintetizar químicamente. Esto requiere que se conozcan tramos de oligopéptidos cortos de secuencia de aminoácidos. Una secuencia polinucleótidos que codifica el receptor se puede deducir del código genético, teniendo en cuenta la degeneración del código genético. De este modo, se pueden realizar reacciones de adición mixtas cuando la secuencia está degenerada. Esto incluye una mezcla heterogénea de ADN de doble cadena desnaturalizada. Para tal selección, la hibridación se realiza preferiblemente sobre o bien ADN de una sola cadena o sobre ADN de doble cadena desnaturalizado. La hibridación es particularmente útil en la detección de clones de ADNc derivados de la fuente en la que una cantidad extremadamente baja de secuencias de ARNm con relación al polipéptido de interés están presentes. De este modo, mediante el uso de condiciones de hibridación rigurosas dirigidas a evitar la unión no específica, visualización autorradiográfica se puede usar para identificar un clon de ADNc específico por la hibridación del ADN diana a una sonda de oligonucleótido en la mezcla que es el complemento completo del ácido nucleico diana (Wallace et al., Nucl. Acid Res., 9:879, 1981). De manera alternativa, se puede usar una genoteca de sustracción, eliminando por lo tanto clones de ADNc no específicos.

Cuando la secuencia de aminoácidos entera de un polipéptido deseado no se conoce, la síntesis directa de secuencias de ADN no es posible y el procedimiento de elección es la síntesis de secuencias ADNc. Entre los

procedimientos estándar para aislar secuencias de interés de ADNc es la formación de genotecas de ADNc preparados en plásmidos o fago, en los que las genotecas se derivan de la transcripción inversa de ARNm que es abundante en células donantes que tienen un alto nivel de expresión genética. Cuando se usa en combinación con la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa, incluso se pueden clonar productos de expresión raros.

5 Cuando se conocen porciones significativas de la secuencia de aminoácidos del polipéptido, la producción de secuencias de una o doble cadena marcadas duplicando una secuencia supuestamente presente en el ADNc diana se pueden emplear en los procedimientos llevados a cabo en copias clonadas del ADNc, que se han desnaturalizado en una forma de una cadena (Jay et al., Nucl. Acid Res., 11:2325, 1983).

Una genoteca de expresión de ADNc, tal como una genoteca lambda gt11, se puede seleccionar para péptidos de receptor GDF usando un anticuerpo específico para un receptor de GDF, por ejemplo, un anticuerpo anti-Act RIIb. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, y se puede usar para detectar el producto de expresión indicativo de la presencia de un ADNc de receptor de GDF. Tal genoteca de expresión también se puede seleccionar con un péptido de GDF, por ejemplo, con miostatina, o su parte de péptido funcional, para identificar un clon que codifica al menos una parte de un dominio de unión a miostatina de un receptor de miostatina.

15 Los polinucleótidos que codifican receptores de GDF mutantes y polipéptidos de receptor de GDF mutantes también se describen en el presente documento. Una alteración en un polinucleótido que codifica un receptor de GDF puede ser una mutación intragénica tal como una mutación puntual, mutación no codificante (STOP), mutación sin sentido, mutación en el sitio de ajuste o desplazamiento de fase, o puede ser una supresión heterocigótica u homocigótica, y puede ser una mutación de origen natural o se puede modificar por ingeniería usando

20 procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo. Tales alteraciones se pueden detectar usando procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, análisis de secuencia de nucleótidos, análisis de transferencia Southern, un análisis basado en PCR tal como PCR múltiplex o análisis de sitios etiquetados de secuencia (STS), o análisis de hibridación in situ. Los polipéptidos de receptor de GDF se pueden analizar mediante SDS-PAGE estándar, análisis de inmunoprecipitación, análisis de transferencia de

25 western, o similares. Los receptores de GDF mutantes se ejemplifican por receptores de GDF truncados, incluyendo un dominio extracelular soluble, que puede tener la capacidad de unirse específicamente a su GDF afín, pero carece de un dominio quinasa; un dominio quinasa de receptor de GDF intracelular, que puede mostrar actividad quinasa constitutiva; así como por receptores de GDF que contienen una mutación puntual, que altera la actividad quinasa del receptor o la actividad de unión al ligando del receptor; y similares. Tales mutantes del

30 receptor de GDF son útiles para modular la transducción de la señal de GDF.

Un polinucleótido que codifica un receptor de GDF se puede expresar *in vitro* introduciendo el polinucleótido en una célula huésped adecuada. "Células huésped" pueden ser cualesquiera células en las que el vector particular se puede propagar, y, cuando sea apropiado, en las que un polinucleótido contenido en el vector se puede expresar. El término "células huésped" incluye cualquier progenie de una célula huésped original. Se entiende que toda la

35 progenie de la célula huésped puede no ser idéntica a la célula parental debido, por ejemplo, a mutaciones que se producen durante la replicación. Sin embargo, tal progenie está incluida cuando el término "células huésped" se usa. Procedimientos de obtención de una célula huésped que contiene transitoriamente o establemente un polinucleótido introducido se conocen bien en la técnica.

Un polinucleótido receptor de GDF se puede insertar en un vector, que puede ser un vector de clonación o un

40 vector de expresión recombinante. El término "vector de expresión recombinante" se refiere a un plásmido, virus u otro vehículo conocido en la técnica que se ha manipulado mediante inserción o incorporación de un polinucleótido, particularmente, un polinucleótido que codifica toda o una parte de péptido de un receptor de GDF. Tales vectores de expresión contienen una secuencia promotora, que facilita la transcripción eficaz de la secuencia genética insertada del huésped. El vector de expresión en general contiene un origen de replicación, un promotor, así como

45 genes específicos que permiten la selección fenotípica de las células transformadas. Los vectores adecuados para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión basado en T7 para expresión en bacterias (Rosenberg, et al., Gene 56: 125, 1987), el vector de expresión pMSXND para expresión en células de mamífero (Lee y Nathans, J. Biol. Chem. 263: 3521, 1988) y vectores derivados de baculovirus para expresión en células de insecto. El segmento de ADN puede estar presente en el vector de manera operativa ligados a

50 elementos reguladores, por ejemplo, un promotor, que puede ser un promotor de T7, promotor de metalotioneína I, promotor de polihedrina, u otro promotor según se desee, particularmente promotores específicos de tejido o promotores inducibles.

Una secuencia de polinucleótidos que codifica un receptor de GDF se puede expresar o bien en procariotas o eucariotas. Los huéspedes pueden incluir organismos microbianos, de levadura, de insecto y de mamífero.

55 Procedimientos de expresión de polinucleótidos que tienen secuencias eucarióticas o virales en procariotas se conocen bien en la técnica, como son vectores de ADN virales y de plásmidos biológicamente funcionales capaces de expresión y replicación en un huésped. Procedimientos para la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido de la invención se conocen bien, como son los factores a considerar en la selección de

señales de control de transcripción o de traducción, incluyendo, por ejemplo, si el polinucleótido se va a expresar preferiblemente en un tipo de célula particular o en condiciones particulares (véase, por ejemplo, Sambrook et al., supra, 1989).

Una diversidad de sistemas de células huésped/vectores de expresión se pueden utilizar para la expresión de una secuencia que codifica un receptor de GDF, que incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido; células de levadura transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes; sistemas de célula vegetales infectadas con vectores de expresión virus recombinantes tales como un virus de mosaico de coliflor o virus de mosaico de tabaco, o transformadas con vector de expresión de plásmido recombinante tal como un plásmido de Ti; células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes tal como un baculovirus; sistemas de células animales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes tales como un retrovirus, adenovirus, o vector de virus vaccinia; y sistemas de células animales transformadas modificadas por ingeniería genética para la expresión estable. Cuando el receptor de GDF expresado se modifica después de la traducción, por ejemplo, por glicosilación, puede ser particularmente ventajoso para seleccionar un sistema de célula huésped/vector de expresión que puede efectuar la modificación necesaria, por ejemplo, un sistema de células huésped/vector de expresión de mamíferos.

Dependiendo del sistema de células huésped/vector utilizado, cualquiera de un número de elementos adecuados de transcripción y traducción, incluyendo promotores constitutivos e inducibles, elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, y similares se pueden usar en el vector de expresión (Bitter et al., Meth. Enzymol. 153: 516 - 544, 1987). Por ejemplo, cuando se clonan en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles tales como pL de bacteriófago 2, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y similares. Cuando se clonan en sistemas de células de mamífero, se pueden usar promotores derivados del genoma de células de mamífero, por ejemplo, un promotor metalotioneína humano o de ratón, o de virus de mamífero, por ejemplo, una repetición terminal larga de retrovirus, un promotor tardío de adenovirus o un promotor 7,5 K de virus vaccinia. Los promotores producidos por técnicas de ADN recombinante ADN o sintéticas también se pueden usar para proporcionar la transcripción de los receptores de GDF insertados que codifican secuencia.

En células de levadura, se puede usar una serie de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles (véase Ausubel et al., supra, 1987, véase capítulo 13; Grant et al., Meth. Enzymol. 153: 516 - 544, 1987; Glover, DNA Cloning Vol. II (IRL Press, 1986), véase capítulo 3; Bitter, Meth. Enzymol. 152: 673 - 684, 1987; véase, también, The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* (Eds., Strathern et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982), Vols. I y II. Se puede usar un promotor de levadura constitutivo tal como ADH o LEU2 o un promotor inducible tal como GAL (Rothstein, DNA Cloning Vol. II (supra, 1986), capítulo 3). De manera alternativa, se pueden usar vectores que promueven la integración de secuencias de ADN extraño en el cromosoma de levadura.

Los sistemas eucarióticos, particularmente sistemas de expresión de mamífero, permiten las modificaciones después de la traducción apropiadas de proteínas de mamífero expresadas. Las células eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado de la transcripción primaria, glicosilación, fosforilación, y ventajosamente, inserción en la membrana plasmática del producto génico se puede usar como células huésped para la expresión de un polipéptido del receptor de GDF, o su parte de péptido funcional.

Sistemas de células de mamífero que utilizan elementos de virus recombinante o virales para dirigir la expresión se puede modificar por ingeniería. Por ejemplo, cuando se usan vectores de expresión de adenovirus, la secuencia que codifica los receptores de GDF pueden estar ligados a un complejo de un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío secuencia guía tripartita. De manera alternativa; se puede usar promotor de 7,5K de virus vaccinia (Mackett et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 79: 7415 - 7419, 1982; Mackett et al., J. Virol. 49: 857 - 864, 1984; Panicali et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 79: 4927 - 4931, 1982). Particularmente útiles son vectores de virus de papilloma bovino, que se pueden replicar como elementos extracromosómicos (Sarver et al., Mol. Célula. Biol. 1: 486, 1981). De manera breve después de la entrada de este ADN en células de ratón, el plásmido se replica hasta aproximadamente 100 a 200 copias por célula. Transcripción del ADNc insertado no requiere integración del plásmido en el cromosoma de las células huésped, produciendo por lo tanto un alto nivel de expresión. Estos vectores se pueden usar para la expresión estable incluyendo un marcador seleccionable en el plásmido, tal como, por ejemplo, el gen neo. De manera alternativa, el genoma retroviral se puede modificar para uso como un vector capaz de introducir y dirigir la expresión del gen de los receptores de GDF en las células huésped (Cone and Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81: 6349 - 6353, 1984). La expresión de alto nivel también se puede lograr usando promotores inducibles, que incluyen, pero no se limitan a, el promotor de metalotioneína IIA y promotores de choque térmico.

Para la producción a largo plazo, de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Mejor que el uso de vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, células huésped se pueden transformar con el ADN de los receptores de GDF controlados por elementos de control de expresión

apropiados tal como promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, y sitios de poliadenilación, y un marcador seleccionable. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante puede conferir resistencia a la selección, y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crecen para formar locos, que, a su vez se pueden clonar y expandir en las líneas celulares. Por ejemplo, después de la introducción de ADN extraño, células modificadas por ingeniería se puede permitir que se desarrollen 1 a 2 días en un medio enriquecido, y después se cambian a un medio selectivo. Se pueden usar un número de sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, genes de timidina quinasa de virus herpes simplex (Wigler et al., célula 11:223, 1977), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 48: 2026, 1982), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, et al., Cell 22:817, 1980) que se pueden emplear en células tk-, hgp^rt- o apr^rt- respectivamente. También, se puede usar resistencia antimetabolito como la base de selección para dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567, 1980; O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 78: 1527, 1981); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 78: 2072, 1981); genes neo, que confieren resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150: 1, 1981); e higo, que confiere resistencia a hidromicina (Santerre et al., Gene 30:147, 1984). Los genes adicionales seleccionables que incluyen trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano; hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman y Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85: 8047, 1988); y ODC (ornitina descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina decarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, Curr. Comm. Mol. Biol. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987), también se han descrito.

Cuando el huésped es un eucariota, tales procedimientos de transfección de ADN como fosfato de calcio coprecipita, se pueden usar procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encerrado en liposomas, o vectores de virus. Las células eucarióticas también se pueden cotransformar con secuencias ADN que codifican los receptores de GDF de la invención, y una segunda molécula de ADN extraño que codifica un fenotipo seleccionable, tal como el gen de la timidina quinasa de herpes simplex. Otro procedimiento es para usar un vector viral vector eucariótico, tal como virus 40 de simio (SV40) o virus de papiloma bovino, para infectar o transformar de manera transitoria células eucarióticas y expresar la proteína. (Gluzman, Eukaryotic Viral Vectors (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982)).

También se describen en el presente documento líneas celulares recombinantes cuyas células expresan polipéptido del receptor de GDF y contienen ADN que codifica receptores de GDF. Los tipos de célula adecuados incluyen, pero no se limitan a, células NIH 3T3 (murinas), células C2C12, células L6, y células P19. C2C12 y mioblastos L6 se diferencian de manera espontánea en cultivo y forman miotubos dependiendo de las condiciones de crecimiento particulares (Yaffe y Saxel, Nature 270: 725 - 727, 1977; Yaffe, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 61: 477 - 483, 1968). P19 es una línea celular de carcinoma embrionaria. Tales células se describen, por ejemplo, en el Catálogo de Línea Celular de la Colección americana de Cultivos Tipo (ATCC). Estas células se pueden transformar de manera estable usando procedimientos bien conocidos (véase, por ejemplo, Ausubel et al., supra, 1995, véanse las secciones 9.5.1 - 9.5.6).

Un receptor de GDF se puede expresar a partir de un polinucleótido recombinante usando elementos reguladores inducibles o constitutivos, como se describe en el presente documento. La secuencia que codifica la proteína deseada y un promotor ligado de manera operativa se puede introducir en una célula receptora o bien como una molécula de ADN no replicante (o ARN), que puede ser o bien una molécula lineal o una molécula circular cerrada de manera covalente. Expresión de la molécula deseada se puede producir debido a la expresión transitoria de la secuencia introducida, o el polinucleótido se puede mantener de manera estable en la célula, por ejemplo, mediante integración en un cromosoma de célula huésped, permitiendo de esta manera una expresión más permanente. De acuerdo con lo anterior, las células pueden ser células transformadas de manera estable o transitoriamente transformadas (transfectadas).

Un ejemplo de un vector que se puede emplear en uno que es capaz de integrar las secuencias de gen deseadas en el cromosoma de la célula huésped. Células que han integrado de manera estable el ADN introducido en sus cromosomas se pueden seleccionar mediante también introduciendo uno o más marcadores que permiten la selección de células huésped que contienen el vector de expresión. El marcador puede complementar una auxotrofia en el huésped tal como leu2, o ura3, que son marcadores autotróficos de levaduras comunes; pueden conferir una resistencia a biocida, por ejemplo, a un antibiótico o a iones de metales pesados tal como cobre, o similares. El gen marcador seleccionable puede o bien estar directamente ligado a las secuencias de genes de ADN a expresar, o se pueden introducir en la misma célula por cotransfección.

La secuencia introducida se puede incorporar en un plásmido o vector viral capaz de replicación autónoma en el huésped receptor. Se pueden emplear cualesquiera de los vectores para este propósito. Factores de importancia en la selección de un plásmido o vector viral particular incluyen la facilidad con la que las células receptoras que contienen el vector se pueden reconocer y seleccionar de las células que no contienen el vector; el número de copias del vector deseado en una célula huésped particular; y si es deseable que sea capaz de "transferir" el vector

entre células huésped de diferentes especies.

Para un huésped de mamífero, están disponibles varios sistemas de vector para la expresión. Una clase de vectores utiliza elementos de ADN que proporcionan replicación autónoma de plásmidos extra-cromosómicos derivados de virus animal, por ejemplo, a virus de papiloma bovino, virus de polioma, adenovirus, o virus SV40. Una segunda clase de vectores incluye vectores de expresión de virus vaccinia. Una tercera clase de vectores depende de la integración de las secuencias de los genes deseados en el cromosoma huésped. Células que han integrado establemente el ADN introducido en sus cromosomas se pueden seleccionar también mediante la introducción de uno o más genes marcadores (como se ha descrito anteriormente), que permiten la selección de células huésped que contienen el vector de expresión. El gen marcador seleccionable puede estar ligado directamente a las secuencias de ADN a expresar, o introducir en la misma célula mediante cotransfección. Se pueden incluir elementos adicionales para proporcionar una síntesis óptima de un ARNm o péptido codificado, incluyendo, por ejemplo, señales de ajuste, promotores o potenciadores de transcripción, y señales de terminación de transcripción o traducción. vectores de expresión de ADNc que incorporan los elementos reguladores apropiados se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Okayama, Mol. Célula. Biol. 3:280, 1983).

Una vez que el vector o secuencia de ADN que contiene la construcción se ha preparado para la expresión, la construcción de ADN se puede introducir en un huésped apropiado. Se pueden usar diversos procedimientos para introducir el polinucleótido en una célula, incluyendo, por ejemplo, procedimientos de transfección o transformación tales como fusión de protoplastos, precipitación por fosfato de calcio, y electroporación u otras técnicas convencionales, por ejemplo, infección cuando el vector es un vector viral.

Los animales transgénicos pueden tener células que expresan un receptor de GDF recombinante. Tales animales transgénicos se pueden seleccionar para que tengan contenido en grasa disminuido o la masa muscular aumentada, o ambos, y, por lo tanto, pueden ser útiles como fuente de productos alimenticios con alto contenido en músculo y proteína, y contenido en grasa y colesterol reducido. Los animales se han alterado cromosómicamente en sus células germinales y células somáticas de manera que la producción de un GDF, particularmente miostatina, se mantiene a un nivel normal, pero el receptor de miostatina se produce en cantidades reducidas, o se altera completamente, dando como resultado las células en los animales que tienen una capacidad disminuida de unirse a miostatina y, por consiguiente, que tiene niveles mayores que los normales de tejido muscular, preferiblemente sin niveles de grasa o colesterol incrementados. De acuerdo con lo anterior, los productos alimenticios se pueden proporcionar por los animales. Teniendo tales productos alimenticios valor nutricional aumentado debido a que el incremento en el tejido muscular. Los animales transgénicos no humanos incluyen animales bovinos, porcinos, ovinos y aves, así como otros vertebrados, y además incluyen invertebrados transgénicos.

Un procedimiento de producción de productos alimenticios animales que tienen contenido en músculo aumentado puede incluir la modificación de la composición genética de las células germinales de un embrión pronuclear del animal, implantando el embrión en el oviducto de una hembra preñada falsamente, permitiendo por lo tanto que el embrión madure hasta que la progenie llegue a término, ensayar la progenie para la presencia del transgén para identificar la progenie positiva al transgén, cruzar la progenie positiva al transgén para obtener progenie positiva al transgén adicional, y procesar la progenie para obtener un comestible. La modificación de la célula germinal comprende la alteración de la composición genética de manera que reduzca o inhiba la expresión del gen de origen natural que codifica la producción de una proteína de receptor de miostatina. Por ejemplo, el transgén puede comprender una molécula no codificante que es específica de un polinucleótido que codifica un receptor de miostatina, puede comprender una secuencia no funcional que reemplaza o interviene en el gel o el transgén endógeno del receptor de miostatina; o puede codificar un antagonista del receptor de miostatina, por ejemplo, un receptor de miostatina negativo dominante tal como un Act RIIB negativo dominante.

Como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a cualquier ave, pez o mamífero, excepto un ser humano, e incluye cualquier fase de desarrollo, incluyendo fases embrionarias y fetales. Animales de granja tales como cerdos, cabras, ovejas, vacas, caballos, conejos y similares; roedores tales como ratones; y mascotas domésticas tales como gatos y perros se incluyen dentro del significado del término "animal." Además, el término "organismo" se usa en el presente documento para incluir animales como se ha descrito anteriormente, así como otros eucariotas, incluyendo, por ejemplo, otros vertebrados tales como reptiles y anfibios, así como invertebrados como se ha descrito anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "transgénico," cuando se usa en referencia a un animal o un organismo, significa que las células del animal u organismo se han manipulado genéticamente para que contengan una secuencia de polinucleótidos exógena que se mantiene establemente con las células. La manipulación puede ser, por ejemplo, microinyección de un polinucleótido o infección con un virus recombinante que contienen el polinucleótido. De este modo, el término "transgénico" se usa en el presente documento para referirse a animales (organismos) en los que una o más células reciben un polinucleótido recombinante, que se puede integrar en un cromosoma en la célula, o se puede mantener como un polinucleótido de replicación extracromosómico, de

manera que se pueda modificar por ingeniería en un cromosoma artificial de levadura. El término "transgénico animal" también incluye un transgénico animal de "línea de célula germinal". Un animal transgénico de línea de célula germinal es un animal transgénico en el que la información genética se ha recogido e incorporado en una célula de línea germinal, confiriendo por lo tanto la capacidad de transferir la información a la prole. Si tal prole de hecho posee algo o toda la información, la prole también se considera que sean animales transgénicos. La invención además abarca organismos transgénicos.

Un organismo transgénico puede ser cualquier organismo cuyo genoma se ha alterado mediante manipulación *in vitro* de un embrión de fase temprana o un huevo fertilizado, o por cualquier tecnología transgénica para inducir una inactivación de gen específico. El término "inactivación de gen" se refiere a la ruptura dirigida de un gen en una célula o *in vivo* que da como resultado la pérdida completa de la función. Un gen dirigido en un animal transgénico se puede hacer no funcional por una inserción dirigida al gen para que se haga no funcional, por ejemplo, mediante recombinación homóloga, o mediante cualquier otro procedimiento para la rotura de la función de un en una célula.

El transgén a usar puede ser una secuencia de ADN que comprende una secuencia que codifica receptores de GDP modificados. Preferiblemente, el gen del receptor de GDP modificado es uno que está roto por la dirección homóloga en las células del tronco embrionario. Por ejemplo, la región C-terminal entera madura del gen de los receptores de GDF se pueden suprimir (véase el Ejemplo 13). Opcionalmente, rotura (o supresión) se puede acompañar mediante inserción del reemplazo con otro polinucleótido, por ejemplo, una secuencia del receptor de GDF no funcional. Un fenotipo "inactivado" también se puede conferir mediante la introducción de o expresión de un polinucleótido de receptor de GDF no codificante en una célula en el organismo, o mediante expresión de un anticuerpo o un receptor de GDF dominante negativo en las células. Cuando es apropiado, polinucleótidos que codifican proteínas que tienen actividad de receptor de GDF, pero que difieren en secuencia de nucleótidos de una secuencia génica de GDF de origen natural debido a la degeneración del código genético, se pueden usar en el presente documento, como formas truncadas, variantes alélicas y homólogos interespecies.

Los anticuerpos que específicamente se unen a un receptor de GDF, y que bloquean la unión de GDF al receptor pueden ser útiles, por ejemplo, para mejorar una afección patológica tal como un trastorno proliferativo de células asociado a tejido muscular.

Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un receptor de GDF, particularmente a un receptor de miostatina, puede incrementar el desarrollo de los músculos esqueléticos. Un anticuerpo monoclonal del receptor de GDF, polipéptido, o un polinucleótido se puede administrar a un paciente que padece una afección patológica tal como una enfermedad de desgaste de músculo, un trastorno neuromuscular, atrofia muscular, envejecimiento, o similares. El anticuerpo del receptor de GDF, particularmente un anticuerpo del receptor de anti-miostatina, también se puede administrar a un paciente que padece una afección patológica tal como una distrofia muscular, lesión de la médula espinal, lesión traumática, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (COPD), SIDA o caquexia.

El anticuerpo anti - receptor de miostatina se puede administrar a un paciente con enfermedad de desgaste muscular o trastorno mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea; preferiblemente, un anticuerpo monoclonal se administra dentro de un intervalo de dosis entre aproximadamente 0,1 Tg/kg a aproximadamente 100 mg/kg; más preferiblemente entre aproximadamente 1 Tg/kg a 75 mg/kg; lo más preferiblemente entre aproximadamente 10 mg/kg a 50 mg/kg. El anticuerpo se puede administrar, por ejemplo, mediante inyección embolada o mediante infusión lenta. Se prefiere durante un período de 30 minutos a 2 horas. El anticuerpo anti - receptor de miostatina, u otro anticuerpo anti receptor de GDF, se puede formular en una formulación adecuada para administración a un paciente. Tales formulaciones se conocen en la técnica.

La pauta de dosificación se determinará por el medico asistente considerando diversos factores que modifican la acción de la proteína del receptor de miostatina, por ejemplo, cantidad de tejido deseada a realizar, el sitio de daño de tejido, la condición del tejido dañado, el tamaño de una herida, tipo de tejido dañado, la edad del paciente, sexo, y dieta, la gravedad de cualquier infección, tiempo de administración y otros factores clínicos. La dosificación puede variar con el tipo de matriz usada en la reconstitución y los tipos de agente, tales como anticuerpos anti - receptor de miostatina, a usar en la composición. En general, la administración sistémica o inyectable, tal como inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea. La administración en general a una dosis que es en forma mínima eficaz, y la dosis se incrementa durante un curso de tiempo preseleccionado hasta que se observa un efecto positivo. Posteriormente, incrementos crecientes en la dosificación se realizan limitando tales incrementos crecientes hasta que tales niveles producen un incremento correspondiente en el efecto, aunque teniendo en cuenta cualquier efecto adverso que pueda aparecer. La adición de otros factores de crecimiento, tales como IGF I (factor I de crecimiento de tipo insulina I), hormona de crecimiento humano, bovino, o de pollo, que puede ayudar en el incremento de la masa muscular, a la composición final, también puede afectar a la dosificación. Cuando se administra un anticuerpo anti - receptor de miostatina, el anticuerpo en general se administra dentro de un intervalo de dosis de aproximadamente 0,1 Tg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg.; más preferiblemente entre aproximadamente 10 mg/kg a 50 mg/kg.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio para incluir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de unión a antígeno de tales anticuerpos. Un anticuerpo, o su fragmento de unión a antígeno, se puede caracterizar, por ejemplo, por tener actividad de unión específica por un epítipo de un receptor de GDF, por ejemplo, un receptor de miostatina. Además, como se ha descrito anteriormente, un anticuerpo puede ser un anticuerpo que específicamente se une a una parte de péptido de un polipéptido de miostatina, particularmente un prodominio de miostatina o su parte de péptido funcional. Se reconocerá que los siguientes procedimientos, que ejemplifican la preparación y caracterización de anticuerpos del receptor de GDF, además son aplicables a la preparación y caracterización de anticuerpos adicionales incluyendo anticuerpos que específicamente se unen a un prodominio de miostatina, anticuerpos que específicamente se unen a un polipéptido de promiostatina y reducen o inhiben la escisión proteolítica de la promiostatina a miostatina, y similares

El término "se une específicamente" o "actividad de unión específica" cuando se usa in referencia a un anticuerpo significa que una interacción del anticuerpo y un epítipo particular tiene una constante de disociación constante de al menos aproximadamente 1×10^{-6} en general al menos aproximadamente 1×10^{-7} , usualmente al menos aproximadamente 1×10^{-8} , and particularmente al menos aproximadamente 1×10^{-9} o 1×10^{-10} o menos. Como tal, los fragmentos Fab, F(ab')₂, Fd y Fv de un anticuerpo que mantiene la actividad específica para un epítipo de un receptor de GDF, se incluyen dentro de la definición de un anticuerpo. Un anticuerpo que reacciona específicamente con un epítipo de un receptor de miostatina, por ejemplo, se considera que sustancialmente no reacciona con un receptor TGF- β o un receptor BMP si el anticuerpo tiene al menos una afinidad de unión dos veces mayor, en general al menos una afinidad de unión cinco veces mayor, y particularmente al menos una afinidad de unión diez veces mayor por el receptor de miostatina cuando se compara con el receptor TGF- β o BMP:

El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento incluye anticuerpos de origen natural así como anticuerpos de origen no natural, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos de una cadena, anticuerpos quiméricos, bifuncionales y humanizados, así como sus fragmentos de unión a antígeno. Tales anticuerpos de origen no natural se pueden construir usando síntesis de péptido de fase sólida, se pueden producir de manera recombinante o se pueden obtener, por ejemplo, por selección de genotecas de combinación que constan de cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase Huse et al., Science 246: 1275 - 1281 (1989)). Estos y otros procedimientos de preparación de, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, injertados a CDR, de una cadena, y bifuncionales se conocen bien por los expertos en la técnica (Winter and Harris, Immunol. Today 14: 243 - 246, 1993; Ward et al., Nature 341: 544 - 546, 1989; Harlow y Lane, Antibodies: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Hilyard et al., Protein Engineering: A practical approach (IRL Press 1992); Borrabeck, Antibody Engineering, 2ª ed. (Oxford University Press 1995)).

Anticuerpos que se unen específicamente con un receptor de GDF se pueden inducir usando el receptor como un inmunógeno y eliminando los anticuerpos que reaccionan de manera cruzada, por ejemplo, con un receptor de tipo o tipo II de TGF- β , con un receptor de activina tal como Act RIB, Act RIIA o Act RIIB, o receptores de BMP tales como BMP RII, BMP RIA y BMP RIB (véase Massague, supra, 1998). Se puede inducir convenientemente un anticuerpo usando una parte de péptido de un receptor de miostatina que no está presente en un receptor TGF- β , activina, o BMP. De manera similar, un anticuerpo que específicamente se une a un prodominio de miostatina se puede inducir usando el prodominio, o su parte de péptido funcional como el inmunógeno. Cuando tal péptido es no-inmunogénico, puede ser hecho inmunogénico mediante acoplamiento de hapteno a una molécula vehículo tal como albúmina sérica bovina (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH), o que expresan la parte de péptido como una proteína de fusión. Diversas otras moléculas vehículo y procedimientos para acoplamiento de un hapteno a una molécula vehículo se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, supra, 1988).

Si se desea, se puede preparar un kit que incorpora un anticuerpo u otro agente. Tal kit puede contener, además del agente, una composición farmacéutica en la que el agente se puede reconstituir para administración a un sujeto. El kit también puede contener, por ejemplo, reactivos para detectar el anticuerpo, o para detectar unión específica del anticuerpo a un receptor de GDF. Tales reactivos detectables útiles para marcar o de otra manera identificar el anticuerpo se describen en el presente documento y se conocen en la técnica.

Procedimientos para inducir anticuerpos policlonales, por ejemplo, en un conejo, cabra, ratón u otro mamífero, se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera," en Immunochemical Protocols (Manson, ed., Human Press 1992), páginas 1 - 5; Coligan et al., "Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters" en Curr. Protocols Immunol. (1992), sección 2.4.1). Además, anticuerpos monoclonales se pueden obtener usando procedimientos que se conocen bien y por rutina en la técnica (Harlow y Lane, supra, 1988). Por ejemplo, células de bazo de un ratón inmunizado con una recepción de miostatina o su fragmento de epítipo, se puede fusionar a una línea celular de mieloma apropiada tales como células de mieloma SP/02 para producir células de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma se pueden seleccionar usando antígeno marcado para identificar clones que secretan anticuerpos monoclonales que tienen la

especificidad apropiada, e hibridomas que expresan anticuerpos que tienen una especificidad deseable y afinidad se pueden aislar y utilizar como una fuente continua de los anticuerpos. Los anticuerpos se pueden además seleccionar por la incapacidad de unirse específicamente con el receptor de miostatina. Tales anticuerpos son útiles por ejemplo, para preparar kits convencionales para uso clínico. Un fago recombinante que expresa, por ejemplo, un anticuerpo anti - receptor de miostatina de una cadena también proporciona un anticuerpo que se puede usar para preparar kits convencionales.

Se conocen bien los procedimientos de preparación de anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature 256: 495, 1975; véase, también, Coligan et al., supra. 1992, véanse las secciones 25.1-2.6.7; Harlow and Lane, supra, 1988). En resumen, anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante inyección a ratones con una composición que comprende un antígeno, verificar la presencia de producción de anticuerpo mediante eliminación de una muestra de suero, retirar el bazo para obtener linfocitos B, fusionar los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonar los hibridomas, seleccionar clones positivos que producen anticuerpos al antígeno, y aislar los anticuerpos de los cultivos de hibridoma.

Anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar a partir de cultivos de hibridoma mediante una diversidad de técnicas bien establecidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de afinidad con Proteína-A SEPHAROSE, cromatografía de exclusión por tamaño, y cromatografía de intercambio iónico (Coligan et al., supra, 1992, véanse las secciones 2.7.1 - 2.7.12 y la sección 2.9.1-2.9.3; véase, también, Barnes et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," en Meth.: Molec. Biol. 10:79-104 (Humana Press 1992)). Procedimientos de multiplicación *in vitro* e *in vivo* de anticuerpos monoclonales se conoce bien por los expertos en la técnica. Multiplicación *in vitro* se puede llevar a cabo en medio de cultivo adecuado tal como Medio Eagle Modificado de Dulbecco o medio RPMI 1640, opcionalmente relleno por un suero de mamífero tal como suero de ternera fetal o elementos en pequeñas cantidades y desarrollan suplementos de mantenimiento tales como células de exudado peritoneal de ratón normal, células de bazo, macrófagos de médula ósea. Producción *in vitro* proporciona preparaciones de anticuerpo relativamente puras y permite aumentar a escala para producir grandes cantidades de los anticuerpos deseados. El cultivo a gran escala de hibridomas se puede llevar a cabo mediante cultivo en suspensión homogénea en un reactor de transporte aéreo, en un reactor con agitación continua, o en cultivo de células inmovilizadas o atrapadas. Multiplicación *in vivo* se puede llevar a cabo mediante inyección de clones de células en mamíferos histocompatibles con las células precursoras células, por ejemplo, ratones singénicos, que provocan el desarrollo de tumores que producen anticuerpo. Opcionalmente, los animales se ceban con un hidrocarburo, especialmente aceites tal como pristano (tetrametilpentadecano) antes de inyección. Después de una a tres semanas, el anticuerpo monoclonal deseado se recupera del fluido corporal del animal.

Las aplicaciones terapéuticas para anticuerpos descritos en el presente documento también se describen en el presente documento. Por ejemplo, anticuerpos también se pueden derivar de anticuerpo de primate subhumano. Las técnicas generales para inducir anticuerpos terapéuticamente útiles en babuinos se pueden encontrar, por ejemplo, en Goldenberg et al., Solicitud de patente Internacional WO 91/11465 (1991); y Losman et al., Int. J. Cancer 46: 310, 1990.

Un anticuerpo anti - receptor de GDF terapéuticamente útil también se puede derivar de un anticuerpo monoclonal "humanizado". Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen mediante transferencia de regiones determinantes de complementariedad de ratón de las cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón en un dominio variable humano, y después sustituyendo los restos humanos en las regiones marco conservadas de los homólogos murinos. El uso de componentes de anticuerpo derivados de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los problemas potenciales asociados a la inmunogenicidad de regiones constantes murinas. Se conocen las técnicas generales para la clonación de dominios variables de inmunoglobulina murina (véase, por ejemplo, Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86:3833, 1989. También se conocen las técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados véase, por ejemplo, Jones et al., Nature 321: 522, 1986; Riechmann et al., Nature 332: 323, 1988; Verhoeven et al., Science 239: 1534, 1988; Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89: 4285, 1992; Sandhu, Crit. Rev. Biotechnol. 12: 437, 1992; y Singer et al., J. Immunol. 150: 2844, 1993.

Anticuerpos también se pueden derivar de fragmentos de anticuerpo humano aislados de una genoteca de inmunoglobulina de combinación (véase, por ejemplo, Barbas et al., METHODS: A Companion to Methods in Immunology 2: 119, 1991; Winter et al., Ann. Rev. Immunol. 12: 433, 1994). Se pueden obtener vectores de clonación y expresión que son útiles para producir una genoteca de fago de inmunoglobulina humana, por ejemplo, a partir de STRATAGENE Cloning Systems (La Jolla, CA).

Un anticuerpo también se puede derivar de un anticuerpo monoclonal humano. tales anticuerpos se obtienen a partir de ratones transgénicos que se han "modificado por ingeniería" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una exposición antigénica. En esta técnica, los elementos de los loci de cadena pesada y ligera humana se introducen en las razas de ratones derivados de líneas celulares del tronco embrionario que

contienen alteraciones dirigidas de los loci de la cadena ligera y pesada endógena. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para los antígenos humanos, y los ratones se pueden usar para producir hibridomas que secretan anticuerpos humanos. Procedimientos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen, por ejemplo, por Green et al., *Nature Genet.* 7: 13, 1994; Lonberg et al., *Nature* 368: 856, 1994; y Taylor et al., *Int. Immunol.* 6: 579, 1994.

Los fragmentos de anticuerpo se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo, o mediante expresión en *E. coli* de ADN que codifica el fragmento. Fragmentos de anticuerpo se pueden obtener mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos enteros mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpo se pueden producir mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento se puede además escindir usando un agente redactor de tiol, y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que se producen por escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos 3.5S Fab' monovalentes. De manera alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos monovalentes Fab' y un fragmento Fc directamente (véase, por ejemplo, Goldenberg, Patente de Estados Unidos N° 4.036.945 y Patente de Estados Unidos N° 4.331.647, y las referencias contenidas en ellas; Nisonhoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89: 230, 1960; Porter, *Biochem. J.* 73: 119, 1959; Edelman et al., *Meth. Enzymol.*, 1: 422 (Academic Press 1967); véase, también, Coligan et al., *supra*, 1992, véanse las secciones 2.8.1 - 2.8.10 y 2.10.1 - 2.10.4).

Otros procedimientos de escisión de anticuerpos, tales como separación de las cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera y pesada monovalentes, además la escisión de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas, o genéticas también se pueden usar, siempre que los fragmentos específicamente se unen al antígeno que se reconoce por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser no covalente (Inbar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 69: 2659, 1972). De manera alternativa, las cadenas variables pueden estar ligadas mediante un enlace disulfuro intermolecular o reticuladas mediante compuestos químicos tal como glutaraldehído (Sandhu, *supra*, 1992). Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas mediante un engarce peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de una cadena (sFv) se preparan mediante construcción de un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula huésped tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una única cadena de polipéptido con un péptido de engarce que une por puentes los dos dominios V. Procedimientos para producir sFvs se describen, por ejemplo, por Whitlow et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2: 97, 1991; Bird et al., *Science* 242: 423 - 426, 1988; Ladner et al., Patente de Estados Unidos N° 4.946.778; Pack et al., *Bio/Technology* 11:1271-1271, 1993; véase, también Sandhu, *supra*, 1992.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una región determinante de complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") se puede obtener mediante construcción de genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, mediante el uso de reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable de ARN de células que producen anticuerpo (véase, por ejemplo, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2: 106, 1991).

Un procedimiento para identificar un receptor de polipéptido de GDF se puede determinar, por ejemplo, mediante incubación de los componentes que comprenden polipéptido de GDF y una célula que expresa un receptor de longitud completa o receptor truncado en condiciones suficientes para permitir que el GDF se una al receptor, midiendo la unión del polipéptido de GDF al receptor, y aislamiento del receptor. El GDF puede ser cualquiera de los GDF conocidos (por ejemplo, GDF-1-16), y preferiblemente es GDF-8 (miostatina) o GDF-11. Procedimientos de aislamiento de los receptores se describen en más detalle en la sección Ejemplos más adelante. De acuerdo con lo anterior, un receptor de GDF sustancialmente purificado, así como péptidos y derivados de péptido de un receptor de GDF que tienen menores restos de aminoácidos que un receptor de origen natural de GDF se describen en el presente documento. Tales péptidos y derivados de péptido son útiles como herramientas de investigación y diagnóstico en el estudio de enfermedades de desgaste de músculo y el desarrollo de más agentes terapéuticos eficaces.

Como se usa en el presente documento, el término "variante de receptores de GDF" significa una molécula que simula al menos parte de la estructura de receptores de GDF. Variantes del receptor de GDF pueden ser útiles en la reducción o inhibición de la unión de GDF, mejorando por lo tanto una afección patológica como se describe en el presente documento. Ejemplos de variantes de receptor de GDF incluyen, pero no se limitan a, receptores de GDF truncados tales como un dominio extracelular soluble de un receptor de GDF; un receptor de GDF dominante negativo tal como un receptor Act RUB dominante negativo, que carece de actividad quinasa; u otros receptores de GDF truncados o mutantes.

Se describe en el presente documento no solamente péptidos y derivados de péptido de un receptor de GDF de origen natural, sino también variantes de receptor de GDF, incluyendo receptores de GDF mutantes, y derivados sintetizados químicamente de receptores de GDF que específicamente se unen a un GDF, por ejemplo, miostatina. Por ejemplo, cambios en la secuencia de aminoácidos de un receptor de GDF se contemplan en el presente documento. Los receptores de GDF se pueden alterar cambiando el ADN que codifica la proteína. Preferiblemente, solamente se abordan alteraciones de aminoácido conservadoras, usando aminoácidos que tienen las mismas propiedades o similares. Las sustituciones de aminoácido ilustrativas incluyen los cambios de alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina, glutamina, o glutamaa; metionina a leucina o isoleucina; phenylalanina a tyrosine, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; valina a isoleucina o leucina.

Las variantes útiles pueden comprender análogos, homólogos, muteínas y miméticos de un receptor de GDF que retienen la capacidad de unirse específicamente a sus GDF respectivos. Los receptores de GDF variantes que tienen actividad dominante negativa también se contemplan, independientemente de si la variante también interactúa específicamente con su GDF. Péptidos de los receptores de GDF se refieren a porciones de la secuencia de aminoácidos de receptores de GDF que tienen estas capacidades. Las variantes se pueden generar directamente a partir de los propios receptores de GDF mediante modificación química, mediante digestión enzimática proteolítica, o mediante sus combinaciones. De manera adicional, se pueden emplear técnicas de modificación por ingeniería, así como procedimientos de síntesis de polipéptidos directamente de restos de aminoácido.

Se pueden sintetizar péptidos mediante aquellos procedimientos usados comúnmente como protección con t-BOC o FMOC de grupos alfa-amino. Ambos procedimientos implican síntesis por etapas por lo cual un único aminoácido se añade en cada etapa comenzando a partir del extremo C del péptido (Coligan, et al., *Current Protocols in Immunology* (Wiley Interscience, 1991), Unidad 9). También se pueden sintetizar péptidos por procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida bien conocidos (Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149, 1962; Stewart and Young, *Solid Phase Peptides Synthesis* (Freeman, San Francisco, 1969), véanse las páginas 27 - 62), usando un copoli(estireno-divinilbenceno) que contienen 0,1 - 1,0 mMol aminas/g de polímero. Tras la finalización de la síntesis química, los péptidos se pueden desproteger y escindir del polímero mediante tratamiento con HF líquido - anisol al 10% durante aproximadamente 1/4 - 1 horas 0°C. Después de la evaporación de los reactivos, los péptidos se extraen del polímero con solución de ácido acético al 1% que después se liofiliza para producir el material bruto. Esto se puede normalmente purificar mediante tales técnicas como filtración en gel sobre Sephadex G-15 usando ácido acético al 5% como disolvente. La liofilización de fracciones apropiadas de la columna producirá el péptido homogéneo o derivados de péptido, que después se pueden caracterizar por técnicas convencionales tales como análisis de aminoácidos, cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alto rendimiento, espectroscopía de absorción ultravioleta, rotación molar, solubilidad, y se cuantifica por degradación en Edman de fase sólida.

Los compuestos no peptídicos que imitan la unión y función de receptores de GDF ("miméticos") se pueden producir mediante el planteamiento indicado por Saragovi et al. (*Science* 253: 792 - 95, 1991). Los miméticos son moléculas que imitan a los elementos de estructura secundaria de proteína (Johnson et al., "Peptide Turn Mimetics," en *Biotechnology and Pharmacy* (Pezzuto et al., Eds.; Chapman y Hall, New York 1993)). La razón fundamental que subyace detrás del uso de miméticos de péptido es que la estructura central del péptido de proteínas existe principalmente para orientar las cadenas laterales de aminoácido de tal forma que facilita las interacciones moleculares. Un mimético aproximado se puede considerar que es el equivalente de un receptor de GDF.

Se pueden producir péptidos más largos mediante la técnica de ligación "química nativa" que liga péptidos entre sí (Dawson et al., *Science* 266:776, 1994). Variantes se pueden crear mediante técnicas recombinantes que emplean procedimientos genómicos o de clonación de ADNc. Se pueden emplear las técnicas de mutagénesis dirigida específica de sitio y región (Ausubel et al., supra, 1989 y 1990 a 1993 suplementos), véase volumen 1, capítulo 8; *Protein Engineering* (Oxender y Fox eds., A. Liss, Inc., 1987)). Además, se pueden emplear técnicas de rastreadores de engarces y mediadas por PCR para mutagénesis (Erllich, *PCR Technology* (Stockton Press 1989); Ausubel et al., supra, 1989 a 1993). Los planteamientos de secuenciación de proteínas, estructura y modelización para uso con cualquiera de las técnicas anteriores se describen en las referencias citadas anteriormente.

También se describen en el presente documento agentes de unión al receptor de GDF que bloquean la unión específica de un GDF a su receptor. Tales agentes son útiles, por ejemplo, como herramientas de investigación y diagnóstico en el estudio de trastorno de desgaste de músculo como se ha descrito anteriormente y como agentes terapéuticos eficaces, y se pueden identificar usando los procedimientos como se describen en el presente documento, por ejemplo, un procedimiento de modelado molecular. Además, las composiciones farmacéuticas que comprenden los agentes de unión al receptor de GDF pueden representar agentes terapéuticos eficaces. La frase

"agente de unión al receptor de GDF " significa un ligando de origen natural de un receptor de GDF, por ejemplo, GDF-1 a GDF-16; un ligando sintético de receptores de GDF, o un derivado apropiado de los ligandos naturales o sintéticos. La determinación y ligación de ligandos se conoce bien en la técnica (Lerner, Trends Neurosci. 17:142 - 146, 1994).

- 5 También se describen en el presente documento agentes de unión al receptor de GDF que interfirieren con la unión entre un receptor de GDF y un GDF. Tales agentes de unión pueden interferir mediante inhibición competitiva, o mediante unión no - competitiva o mediante inhibición sin competición. Interferencia con unión normal entre receptores de GDF y uno o más GDF pueden dar como resultado un efecto farmacológico útil.

- 10 Un procedimiento para identificar una composición que se une a un receptor de GDF puede incluir la incubación de componentes que comprenden la composición y un receptor de GDF en condiciones suficientes para permitir que los componentes interactúen específicamente, y midan la unión de la composición a los receptores de GDF. Composiciones que se unen a los receptores de GDF incluyen péptidos, peptidomiméticos, polipéptidos, compuestos químicos y agentes biológicos como se ha descrito anteriormente. La incubación incluye la exposición de los reactivos a condiciones que permitan el contacto de la composición de ensayo y receptores de GDF, y proporcionan condiciones adecuadas para una interacción específica como se produciría *in vivo*. Poner en contacto puede ser en solución o en fase sólida. El ligando/composición de ensayo pueden opcionalmente ser una genoteca de combinación para seleccionar una pluralidad de composiciones, como se ha descrito anteriormente. Las composiciones identificadas en el procedimiento se pueden además evaluar, detectar, clonar, secuenciar, y similares, o bien en solución o después de unión a un soporte sólido, mediante cualquier procedimiento usualmente aplicado a la detección de una secuencia de ADN específica tal como PCR, restricción de oligómero (Saiki et al., Bio/Technology 3:1008 - 1012, 1985), análisis de sonda de oligonucleótido específico de alelo (ASO) (Conner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80: 278, 1983), ensayos de ligación de oligonucleótido (OLA) (Landegren et al., Science 241:1077 1988), y similares (véase Landegren et al., Science 242:229-237, 1988).

- 25 Para determinar si una composición puede formar complejos funcionalmente con proteína receptora, inducción de un gen exógeno se puede controlar mediante el control de cambios en el nivel de proteína de una proteína codificada por el gen exógeno, o cualquier otro procedimiento como se describe en el presente documento. Cuando una composición se identifica que puede inducir la transcripción del gen exógeno, se concluye que esta composición se puede unir específicamente a la proteína receptora codificada por el ácido nucleico que codifica la composición de ensayo de la muestra inicial.

- 30 La expresión del gen exógeno se puede controlar mediante un ensayo funcional o ensayo para un producto de proteína, por ejemplo. El gen exógeno por lo tanto es un gen que proporciona un producto de expresión que se puede ensayar/medir con el fin de permitir la detección de la expresión del gen exógeno. Tales genes exógenos incluyen, pero no se limitan a, genes indicadores tales como gen de cloramfenicol acetiltransferasa, un gen de fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, un gen de luciferasa, un gen de la proteína fluorescente verde, guanina xantina fosforribosiltansferasa, fosfatasa alcalina, y genes de resistencia a antibiótico tales como neomicina fosfotransferasa (véase antes).

- 40 La expresión del gen exógeno es indicativa de una interacción específica de una composición y un receptor de GDF; de este modo, la composición de unión o de bloqueo se puede identificar y aislar. Las composiciones se pueden extraer y purificar del medio de cultivo o una célula mediante el uso de técnicas de purificación de proteínas conocidas empleadas comúnmente, incluyendo, por ejemplo, extracción, precipitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, filtración en gel y similares. Las composiciones se pueden aislar mediante cromatografía de afinidad usando el dominio extracelular de proteína receptora unido a una matriz de columna o mediante cromatografía de heparina.

- 45 También se incluye en el procedimiento de selección descrito en el presente documento con procedimientos de química de combinación para identificar los compuestos químicos que se unen a los receptores de GDF, como se ha descrito anteriormente. De este modo, el procedimiento de selección es también útil para identificar variantes, agentes de unión o de bloqueo, etc., que funcionalmente, si no actúan físicamente (por ejemplo, estéricamente) como antagonistas o agonistas, según se desee.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la invención.

50 **Ejemplo 1**

La miostatina actúa de una manera dependiente de la dosis

Este ejemplo demuestra que la actividad de la miostatina en la inhibición del crecimiento del músculo depende del nivel de expresión de miostatina *in vivo*.

La miostatina es un regulador negativo de masa de músculo esquelético (McPherron et al., supra, 1997; McPherron

y Lee, supra, 1997). Los ratones genéticamente deficientes en miostatina que eran homocigóticos para una supresión del gen de miostatina tenían un incremento del 25 - 30% en la masa del cuerpo total. Un examen de los ratones homocigóticos genéticamente deficientes revelaron que el incremento de la masa muscular se debía a aproximadamente un incremento del 100 - 200% en masa de músculo esquelético por todo el cuerpo.

- 5 Ratones que eran heterocigóticos para la mutación de miostatina también tenía un incremento en la masa de cuerpo total. Sin embargo, el incremento de la masa de los heterocigotos era menor que los homocigotos, y era estadísticamente significativa en solamente un grupo de edad y sexo entre los muchos examinados. Con el fin de determinar si los ratones heterocigóticos tienen un fenotipo intermedio entre el de los ratones de tipo natural y ratones homocigóticos genéticamente deficientes en miostatina, el análisis de pesos de músculo se extendió a los
- 10 ratones heterocigóticos. Se muestrearon músculos individuales de ratones heterocigóticos que pesaban aproximadamente 25 - 50% más que los ratones de tipo natural. Estos resultados demuestran que los ratones que son heterocigóticos para la supresión de un gen de miostatina que tiene un fenotipo que es intermedio entre el de los ratones de tipo natural y ratones genéticamente deficientes en miostatina homocigóticos, y demuestran que la miostatina produce un efecto dependiente de la dosis *in vivo*.
- 15 Estos resultados indican que la manipulación de actividad de miostatina puede ser útil en el tratamiento de enfermedades de desgaste de músculo y otros trastornos asociados a actividad de miostatina. Además, el efecto de miostatina dependiente de la dosis indica que un efecto terapéutico se puede obtener sin lograr la inhibición completa de actividad de miostatina, permitiendo por lo tanto un ajuste de actividad de miostatina si, por ejemplo, un cierto nivel de actividad produce efectos secundarios en un sujeto.

20 **Ejemplo 2**

El efecto de la miostatina disminuye con la edad en ratones genéticamente deficientes

Este ejemplo demuestra que una disminución en la diferencia en peso corporal entre ratones de tipo natural y ratones genéticamente deficientes en miostatina homocigóticos está asociada a disminución en el peso muscular de los ratones mutantes.

- 25 Ratones genéticamente deficientes en miostatina que pesaban aproximadamente 25-30% más que los ratones de tipo natural a los cinco meses de edad (McPherron et al., supra, 1997). Sin embargo, esta diferencia en los pesos de peso corporal llega a ser significativamente más pequeña o desaparecían en conjunto como los animales viejos. Con el fin de determinar si este efecto era debido a una pérdida relativa de peso en los ratones genéticamente deficientes, por ejemplo, a degeneración muscular, o a una ganancia en peso relativamente mayor por los ratones
- 30 de tipo natural, un análisis detallado de pesos musculares se realizó en función de la edad.

- A todas las edades examinadas de 2 meses a 17 meses, el músculo pectoral pesaba significativamente más en ratones homocigóticos mutantes que los compañeros de camada de tipo natural. La diferencia más notable se observó a los 5 meses, en el momento que el peso pectoral era aproximadamente 200% mayor en los ratones mutantes. Aunque el peso pectoral disminuye ligeramente en las edades mayores, el peso de este músculo en
- 35 ratones mutantes se mantenía dos veces mayor que el de los ratones de tipo natural. Esta misma tendencia en todos los otros músculos examinados, incluyendo los tríceps braquiales, los cuádriceps, el gastrocnemio y plantar y el tibial anterior. Se observaron tendencias similares en tanto ratones macho como hembras. Estos resultados demuestran que la disminución en la diferencia en los pesos de cuerpo total entre ratones mutantes y de tipo natural observados con el envejecimiento se debe a una ligera disminución en los pesos musculares en los ratones
- 40 mutantes.

Ejemplo 3

La miostatina afecta a la acumulación de grasa de una manera dependiente de la dosis

Este ejemplo demuestra que ratones genéticamente deficientes en miostatina no acumulan grasa, y que la disminución en acumulación de grasa se asocia al nivel de expresión de miostatina *in vivo*.

- 45 Ya que la disminución en los pesos musculares en mutantes de miostatina, como se demuestra en el Ejemplo 2, no daban cuenta totalmente de la observación de que los animales de tipo natural eventualmente pesaban aproximadamente lo mismo que los ratones mutantes, se examinó la cantidad de acumulación de grasa en ratones de tipo natural y mutantes. Se examinaron las almohadillas de grasa inguinales, de epidídimo y retroperitoneales en ratones macho. No había diferencia en los pesos de ninguna de estas almohadillas de grasa entre los ratones de
- 50 tipo natural y mutantes a los dos meses de edad. A los 5 a 6 meses de edad, ratones de tipo natural y heterocigóticos genéticamente deficientes mostraban ambos un gran intervalo de pesos de almohadilla grasa, y, de promedio, los pesos de almohadilla grasa se incrementaron en aproximadamente 3 veces a 5 veces en el momento en que los animales alcanzaban 9 a 10 meses de edad. Debido al gran intervalo de pesos de almohadilla grasa observados en estos animales, algunos animales mostraron un incremento mucho mayor (hasta 10 veces) que los

otros.

Al contrario que los ratones salvajes y heterocigóticos genéticamente deficientes, los pesos de almohadilla grasa de ratones homocigóticos mutantes de miostatina estaban en un intervalo relativamente estrecho y eran virtualmente idénticos en los ratones de 2 meses de edad y en los ratones de 9 a 10 meses de edad. De este modo, el incremento en la acumulación de grasa que se produce con el envejecimiento en los ratones de tipo natural no se observó en los ratones genéticamente deficientes en miostatina homocigóticos. Esta diferencia en acumulación de grasa, junto con la ligera disminución en pesos musculares, en función de la edad en los ratones homocigóticos mutantes eran completamente responsables de la observación de que los animales de tipo natural eventualmente tenían el mismo peso corporal que los mutantes.

Los pesos medios de almohadilla grasa de ratones heterocigóticos genéticamente deficientes a los 9 a 10 meses de edad era intermedio entre la de los ratones de tipo natural y los ratones homocigóticos mutantes. Aunque esta diferencia no era estadísticamente significativa, debido al amplio intervalo de pesos de almohadilla grasa en estos ratones y los de tipo natural, estos resultados sin embargo indican que la miostatina tiene un efecto dependiente de la dosis de la acumulación de grasa, similar a su efecto en el desarrollo de músculo.

Ejemplo 4

Efecto de la miostatina en el metabolismo

Este ejemplo demuestra que los niveles de insulina y glucosa en suero, así como actividad metabólica, están afectados por el nivel de expresión de miostatina.

Con el fin de determinar si la hipertrofia del músculo esquelético y la carencia de acumulación de grasa en los ratones mutantes de miostatina se deben a un efecto sobre el metabolismo global, se examinó el perfil metabólico de los ratones mutantes. Los niveles de colesterol en suero y triglicéridos en suero eran significativamente menores en los ratones mutantes de miostatina cuando se comparan con los ratones de control de tipo natural (Tabla 1). Los niveles de insulina en suero también parecían ser menores en los ratones mutantes de miostatina. Sin embargo, los niveles de glucosa comidos y en ayunas eran ambos indistinguibles entre los ratones homocigóticos mutantes y los ratones de tipo natural (Tabla 1), y ambos grupos de ratones tenían una respuesta normal en un ensayo de tolerancia a glucosa. Los resultados demuestran que los ratones genéticamente deficientes en miostatina homocigóticos pueden mantener niveles normales de glucosa en suero incluso aunque su nivel de insulina en suero sea menor que el de los animales de tipo natural.

Tabla 1. PARÁMETROS EN SUERO

	+/+	-/-	
triglicéridos (mg/dl)	131,5+/-16,5	66,8+/- 11,4	p = 0,012
colesterol (mg/dl)	138,3+/- 8,1	94,5+/- 6,8	p = 0,0034
glucosa alimentado (mg/dl)	114,0+/- 4,8	119,3+/- 5,2	n.s.(p=0,43)
glucosa en ayunas (mg/dl)	86,5+/- 3,8	103,3 + 9,3	n.s. (p=0,13)

+/+ indica ratones de tipo natural ; -/- indica ratones homocigóticos genéticamente deficientes

Con el fin de determinar si las diferencias en tasas metabólicas pueden explicar la pérdida de acumulación de grasa en los ratones mutantes, la tasa de consumo de oxígeno de ratones de tipo natural y mutantes se comparó usando un colorímetro. Los ratones mutantes tenían una tasa de metabolismo basal menor y una tasa de metabolismo basal global menor que los ratones control de tipo natural. Estos resultados indican que la pérdida de acumulación de grasa en los ratones mutantes de miostatina no se debe a una tasa mayor de actividad metabólica.

Ejemplo 5

La miostatina afecta a la acumulación de grasa en ratones genéticamente obesos

Este ejemplo demuestra que una pérdida de expresión de miostatina suprime la acumulación de grasa en ratones que son un modelo genético para obesidad.

Con el fin de determinar si la pérdida de actividad de miostatina puede suprimir la acumulación de grasa no solamente en ratones normales sino en ratones obesos, se examinó el efecto de la mutación miostatina en ratones agouti letales amarillos (Ay), que representan un modelo genético de obesidad (Yen et al., FASEB J. 8: 479 - 488, 1994). Se generaron ratones que eran doblemente heterocigóticos para las mutaciones letal amarillo y miostatina, y

se examinó la prole de los cruces de estos ratones doblemente heterocigóticos.

El peso corporal total del ratón doble mutante Ay/a, miostatina -/- se redujo notablemente (aproximadamente 9 gramos) comparado con la del ratón Ay/a, miostatina +/+. Esta reducción en el peso corporal total era incluso más notable considerando que el ratón doble mutante Ay/a, miostatina -/- tenía aproximadamente 2 a 3 veces más músculo esquelético que el que tenía Ay/a, miostatina +/+. El doble mutante tenía aproximadamente 10 gramos más músculo que el ratón Ay/a, miostatina +/+ y, por lo tanto, la reducción de peso total en el resto de los tejidos era aproximadamente 19 gramos.

La reducción en peso corporal total se produjo por una reducción en el contenido de grasa total. Como se muestra en la Tabla 2, los pesos de las almohadillas grasas parametrial y retroperitoneal se redujo 5 veces a 6 veces en el ratón Ay/a, miostatina -/- doble mutante comparado con el Ay/a, miostatina +/+. Estos resultados indican que la presencia de la mutación miostatina suprime notablemente la acumulación de grasa en obesidad.

La presencia de la mutación miostatina también afectó notablemente el metabolismo de la glucosa. Los ratones Agouti letales que carecen de la mutación miostatina tenían resultados de ensayo de tolerancia a la glucosa enormemente anormales, con niveles de glucosa en suero que a menudo alcanzaban 450 a 600 mg/dl y solamente recuperación lenta a los niveles iniciales en un período de 4 horas. Ratones hembra agouti letales estaban afectadas menos que los ratones macho, y algunas hembras respondían casi normalmente en este ensayo, como se ha descrito previamente (véase Yen et al., supra, 1994). Por el contrario, aunque los ratones Ay/a, miostatina -/- tenían ensayos de tolerancia a la glucosa ligeramente anormales, pero ninguno de estos animales tenían las grandes anomalías observadas en los ratones Ay/a miostatina +/+.

Estos resultados indican que la mutación miostatina al menos suprimía parcialmente el desarrollo de metabolismo de glucosa anormal en los ratones agouti letales. De manera significativa, ratones que eran heterocigóticos para la mutación miostatina tenían una respuesta intermedia comparada con los ratones miostatina +/+ y miostatina -/-, confirmando de este modo el efecto miostatina dependiente de la dosis.

Ejemplo 6

Purificación de miostatina recombinante

Este ejemplo proporciona un procedimiento para preparar y aislar miostatina recombinante.

Con el fin de aclarar la actividad biológica de la miostatina, grandes cantidades de proteína miostatina se purificaron mediante bioensayos. Líneas celulares estables de ovario de hámster chino (CHO) que producen altos niveles de proteína miostatina se generaron mediante amplificación conjunta de un módulo de expresión de miostatina con un módulo de dihidrofolato reductasa usando un módulo de selección de metotrexato (McPherron et al., supra, 1997). Miostatina se purificó a partir del medio acondicionado de la línea de producción más alta por fraccionamiento sucesivo sobre hidroxipatita, lectina en lentejas SEPHAROSE, DEAE agarosa, y heparina SEPHAROSE. El análisis con tinción de plata reveló que la proteína purificada obtenida siguiendo estas cuatro etapas de cromatografía en columna (llamada "eluido de heparina ") consistía en dos especies con pasas moleculares de aproximadamente 35 kilodaltons (kDa) y 12 kDa.

La preparación de la proteína purificada se determinó mediante diversos criterios para representar un complejo de dos péptidos de prodominio de miostatinas y dímero ligado por disulfuro de péptidos de miostatina C-terminales maduros. Primero, análisis de transferencia de western, usando anticuerpos inducidos contra partes específicas de la secuencia de promiostatina, identificó la banda de 35 kDa como el prodominio y la banda de 12 kDa como el péptido C-terminal maduro. Segundo, en condiciones no reductoras, las especies que reaccionan con anticuerpos dirigidos contra el péptido C-terminal maduro tenían una movilidad electroforética consistente con un dímero ligado por disulfuro. Tercero, la relación molar de prodominio a péptido C-terminal maduro era aproximadamente 1:1. Cuarto, el prodominio y péptido C-terminal maduro se purificó conjuntamente a través de las cuatro etapas de cromatografía en columna. Finalmente, el péptido C-terminal maduro unido a la columna de lectina en lentejas incluso aunque la región C-terminal no contiene señales de glicosilación ligadas a N de consenso, indicando que el péptido C-terminal maduro unido a la columna debido a su interacción con el péptido de prodominio, que contiene un sitio de glicosilación potencial ligado a N.

Estos resultados indican que la miostatina producida por las células CHO genéticamente modificadas se secreta en una forma procesada proteolíticamente, y que el prodominio resultante y región C-terminal madura se asocia de manera no covalente para formar un complejo que contienen dos péptidos de prodominio y un dímero ligado por disulfuro de fragmentos proteolítico C-terminales, similares al descrito para TGF- β . En el complejo TGF- β , el dímero C-terminal existe en una forma inactiva, latente (Miyazono et al., J. Biol. Chem. 263: 6407 - 6415, 1988), y la especie activa puede liberarse de este complejo latente mediante tratamiento con ácido, agentes caotrópicos, especies de oxígeno reactivo, o plasmina, o mediante interacciones con otras proteínas, incluyendo

trombospondina e integrina $\text{Iv}\beta 6$ (Lawrence et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 133: 1026 - 1034, 1985; Lyons et al., J. Cell Biol. 106: 1659 - 1665, 1988; Schultz-Cherry y Murphy-Ullrich, J. Cell Biol. 122: 923 - 932, 1993; Barcellos-Hoff y Dix, Mol. Endocrinol. 10: 1077 - 1083, 1996; Munger et al., Cell 96: 319 - 328, 1999). Además, la adición de péptido de prodominio purificado (también conocido como péptido asociado a latencia o LAP) al complejo TGF- β inhibe la actividad biológica de del dímero C-terminal *in vitro* e *in vivo* (Gentry y Nash, Biochemistry 29: 6851 - 6857, 1990; Bottinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93: 5877 - 5882, 1996).

El eluido de heparina, que constaba de un complejo de prodominio y péptido C-terminal maduro, se purificó además usando una columna de fase inversa HPLC C4. El dímero C-terminal eluido de la columna de HPLC antes que el prodominio, permitiendo de esta manera el aislamiento del dímero C-terminal libre de prodominio. También se obtuvieron las fracciones que contenían la mayoría de prodominio, aunque estas fracciones contenían pequeñas cantidades del dímero C-terminal. Alguna de las proteínas también estaba presente como complejos de mayor peso molecular. La naturaleza de los complejos de mayor peso molecular se desconoce, pero, basándose en el análisis de transferencia de western en la presencia o ausencia de agentes de reducción, estos complejos pueden contener al menos un péptido de prodominio y un péptido de miostatina madura C terminal ligado por uno o más enlaces bisulfuro. De hecho, la mayoría del péptido C-terminal maduro presente en la fracción de HPLC enriquecida por el propéptido (fracciones de HPLC 35 - 37) estaba presente en estos complejos de alto peso molecular. Estos complejos de alto peso molecular probablemente representan proteínas indebidamente plegadas que se secretan por las células CHO genéticamente modificadas.

Ejemplo 7

La miostatina interactúa específicamente con un receptor de activina

Este ejemplo demuestra que la miostatina específicamente se une a un receptor de tipo II de activina expresado sobre las células en cultivo, y que esta unión específica está inhibida por un prodominio de miostatina.

Los receptores para algunos de los miembros de la familia de TGF- β se han identificado, y la mayoría son únicas serina/treonina quinasas que se extienden sobre la membrana (Massague y Weis-Garcia, Cancer Surveys 27: 41-64, 1996). Los receptores de activina de tipo II (Act RIIA y / o Act RIIB), por ejemplo, se conoce que se unen a miembros de la superfamilia de TGF- β . El fenotipo de ratones que carecen del receptor Act RIIB mostró defectos de modelado axial anterior/posterior y anomalías de riñón que eran muy similares a las observados en ratones genéticamente deficientes en GDF-11 (McPherron et al., Nat. Genet. 22: 260 - 264, 1999; Oh y Li, Genes Devel. 11: 1812 - 1826, 1997). Ya que las secuencias de aminoácidos de GDF-11. y miostatina (GDF-8) son 90% idénticas en la región C-terminal madura, se examinó la capacidad de miostatina de interactuar específicamente con un receptor de tipo II de activina.

La miostatina se marcó por radio-yodación, y se realizaron estudios de unión usando células COS transfectadas con una construcción de expresión de Act RIIB. La miostatina interactuó específicamente con las células COS transfectadas. La unión de la miostatina se completó de una manera dependiente de la dosis por un exceso de miostatina no marcada, y era significativamente menor en células COS control, que se transfectaron con un vector vacío. No se produjo ninguna unión significativa a células transfectadas con una construcción de expresión BMP RII o TGF- β RII. La unión de miostatina a células transfectadas con Act RIIB era saturable, y la afinidad de unión era aproximadamente 5 nM como se determinó mediante análisis de Scatchard.

El ensayo de unión al receptor también se usó para examinar la capacidad del prodominio de miostatina de inhibir la capacidad del dímero C-terminal maduro de interactuar específicamente con Act RIIB en este sistema. La adición de péptido de prodominio purificado bloqueó la capacidad del dímero C-terminal para unirse a las células COS transfectadas con Act RIIB de una manera dependiente de la dosis. Estos resultados indican que el prodominio de miostatina es un inhibidor de miostatina natural.

Ejemplo 8

Niveles incrementados de miostatina inducen pérdida de peso

Este ejemplo demuestra que niveles elevados de miostatina puede conducir a pérdida de peso sustancial *in vivo*.

En un conjunto de experimentos, células CHO que expresan miostatina se inyectaron en ratones atímicos. Los ratones atímicos que tenían tumores de células CHO que expresan miostatina mostraron desgaste grave durante el curso de aproximadamente 12 a 16 días después de la inyección de las células. Este síndrome de desgaste no se observó en los ratones atímicos inyectados con cualquiera de una diversidad de líneas de CHO de control que se habían sometido un proceso de selección similar pero no expresaban miostatina. Además, la secuencia de codificación de miostatina en la construcción usada para transfectar las células CHO estaba bajo el control de promotores de metalotioneina, y el síndrome de desgaste se exacerbó cuando los ratones que llevan los tumores que expresan miostatina se mantuvieron en agua que contenía sulfato de zinc. El análisis de transferencia de

Western reveló altos niveles de proteína miostatina en el suero de los ratones atímicos que llevaban las células CHO que expresan miostatina. Estos resultados indican que el síndrome de desgaste se indujo en respuesta al nivel elevado de miostatina en los ratones atímicos y, como se describe más adelante, este resultado se confirmó mediante observación de los efectos similares en ratones inyectados con miostatina purificada.

- 5 La drástica pérdida de peso observada en los ratones atímicos que llevan células CHO que expresan miostatina era debido principalmente a una pérdida desproporcionada de peso de grasa como de peso muscular. Los pesos de almohadilla de grasa blanca (grasa blanca intraescapular, uterina, y retroperitoneal) se redujeron en más de 90% comparado con los ratones que llevan tumores de células CHO de control. Pesos musculares también se redujeron gravemente, pesando los músculos individuales aproximadamente la mitad tanto como en los ratones que expresan miostatina como en los ratones control el día 16. Está pérdida en peso muscular se reflejó mediante una disminución correspondiente en los tamaños de fibra y contenido en proteína.

- 10 Ratones que llevan los tumores de las células CHO que expresan miostatina también llegaron a ser gravemente hipoglucémicos. Sin embargo, la pérdida de peso e hipoglucemia no se debían a una diferencia en el consumo de alimento, ya que todos los ratones consumían cantidades equivalentes de alimento en cada intervalo de tiempo examinados durante el curso de 16 días del estudio. Estos resultados indican que la sobreexpresión de miostatina induce una pérdida de peso notable, que se parece al síndrome de desgaste caquético que se produce en pacientes que padecen enfermedades crónicas tales como cáncer o SIDA.

- 15 Con más administraciones crónicas usando bajas dosis de miostatina, se observaron cambios en el peso de grasa. Por ejemplo; inyecciones dos veces al día de 1 µg de proteína miostatina durante 7 días dio como resultado una disminución de aproximadamente 50% en los pesos de un número de almohadillas de grasa blanca (almohadillas de grasa blanca intraescapular, uterina, y retroperitoneal) sin efecto significativo sobre la grasa marrón (marrón intrascapular). Estos resultados confirman que la miostatina puede inducir la pérdida de peso y, en casos extremos, un síndrome de desgaste *in vivo*.

Ejemplo 9

- 25 Caracterización de unión de miostatina a un receptor de activina

Este ejemplo describe un procedimiento para caracterizar la relación de unión de miostatina a un receptor de activina con los efectos biológicos producidos por miostatina *in vivo*.

- Los ratones Act RIIA o Act RIIB genéticamente deficientes se pueden usar para confirmar que Act RIIA o Act RIIB es un receptor para miostatina *in vivo*. Un análisis muscular detallada de estos ratones se pueden determinar si la deficiencia de un receptor de activinas está asociada a un cambio en el número o tamaño de fibras musculares. Ya que Act RIIA/Act RIIB doble homocigóticos mutantes mueren pronto durante la embriogénesis (Song et al., Devel. Biol. 213: 157 - 169, 1999), solamente se pueden examinar las diversas combinaciones homocigóticos/heterocigóticos. Sin embargo, ratones genéticamente deficientes específicos de tejido o condicionales se pueden generar de manera que ambos genes se pueden "suprimir" solamente en tejido muscular, permitiendo de esta manera el examen postnatal de los ratones genéticamente deficientes doble homocigóticos.

- El efecto sobre tejido adiposo se puede examinar mediante el envejecimiento de los ratones para determinar si el número de adipocitos o la acumulación de lípido por estos adipocitos está alterado en los ratones genéticamente deficientes. El número y tamaño de adipocito se determina mediante la preparación de suspensiones de células a partir de tejido tratado con collagenasa (Rodbell, J. Biol. Chem. 239: 375 - 380, 1964; Hirsch and Gallian, J. Lipid Res. 9:110 - 119, 1968). En contenido de lípido total en animales se determina midiendo los pesos secos de armazón y después los pesos residuales de armazón residuales después de la extracción de lípido (Folch et al., J. Biol. Chem. 226:497-509, 1957).

- También se puede examinar una diversidad de parámetros en suero, incluyendo glucosa comido y en ayunas e insulina, triglicéridos, colesterol, y leptina. Como se ha descrito anteriormente, los triglicéridos en suero e insulina en suero disminuyeron en los animales mutantes de miostatina. La capacidad de los ratones genéticamente deficientes en receptor de activina de responder a una carga de glucosa exógena también se puede examinar usando ensayos de tolerancia a glucosa. Como se ha descrito anteriormente, la respuesta a una carga de glucosa esencialmente era idéntica en los ratones de tipo natural y mutantes de miostatina a los 5 meses de edad. Esta observación se puede extender mediante la medición de estos parámetros en los ratones según envejecían. Los niveles de insulina en suero también se pueden medir en diversos momentos durante los ensayos de tolerancia a glucosa.

También se pueden controlar las tasas de metabolismo basal usando un calorímetro (Columbus Instruments). Como se ha descrito anteriormente, ratones mutantes de miostatina tienen una tasa metabólica menor a los 3 meses de edad y sus homólogos de tipo natural. Este análisis se puede extender a ratones viejos, y el cociente respiratorio también se puede medir en estos animales. La capacidad de mantener termogénesis normal se puede

determinar midiendo las temperaturas de cuerpo basal así como su capacidad para mantener la temperatura corporal cuando se colocan a 4°C. También se pueden examinar los pesos de grasa marrón y niveles de expresión de UCP1, UCP2, y UCP3 en grasa marrón, grasa blanca, músculo, y otros tejidos (Schrauwen et al., 1999).

La ingesta de alimento relativa a la ganancia de peso se puede controlar, y se puede calcular la eficacia de alimentación. Además, se puede controlar la ganancia de peso de los animales con dietas de alta grasa. Ratones de tipo natural que mantenían una dieta alta en grasa acumulaban grasa rápidamente, mientras los resultados descritos en el presente documento indican que los animales mutantes de receptor de activina permanecían relativamente delgados.

Los resultados de estos estudios pueden proporcionar un perfil más completo del efecto de ratones de miostatina, particularmente con respecto a su estado metabólico global, proporcionando por lo tanto el conocimiento de como si la capacidad de los ratones genéticamente deficientes en miostatina en la supresión de la acumulación de grasa es un efecto anabólico de la mutación miostatina en músculo que conduce a un cambio en la utilización de energía de manera que poca energía está disponible para almacenamiento en la forma de grasa. Por ejemplo, la acumulación de grasa disminuida se puede deber a una tasa incrementada de termogénesis. Estos resultados también proporcionarán una línea base para comparación del efecto de la actividad de miostatina en el contexto de diferentes modelos genéticos de obesidad y diabetes de tipo II.

Ejemplo 10

Caracterización de los efectos de miostatina en modelos genéticos de obesidad and diabetes de tipo II

Este ejemplo describe procedimientos para determinar el efecto de miostatina en el tratamiento de obesidad o diabetes de tipo II.

La reducción notable en la acumulación de grasa global en ratones mutantes de miostatina cuando se compara con ratones de tipo natural indica que la actividad de miostatina se puede manipular para tratar o prevenir obesidad o diabetes de tipo II. El efecto de la mutación miostatina se puede examinar en el contexto de varios modelos de ratón bien caracterizados ratón de estas enfermedades metabólicas, incluyendo, por ejemplo, ratones "obesos" (ob/ob), ratones "diabéticos" (db/db), y razas mutantes agouti letales amarillos (Ay). Cada una de estas razas es anormal para virtualmente cada parámetro y ensayo descrito anteriormente (véase, por ejemplo, Yen et al., supra, 1994, Friedman y Halaas, Nature 395: 763 - 770, 1998). La capacidad de la mutación miostatina para reducir o suprimir el desarrollo de estas anomalías en ratones que llevan estas otras mutaciones se pueden examinar construyendo dobles mutantes, después sometiendo los animales doble mutantes, junto con los de la misma camada de control que llevan solamente las mutaciones ob/ob, db/db, o agouti letales amarillos, a los diversos ensayos.

Como se ha descrito anteriormente, la mutación miostatina en ratones Ay estaba asociada a aproximadamente una supresión de 5 veces de acumulación de grasa en los ratones Ay mutantes de miostatina, y con una supresión parcial del desarrollo de metabolismo de glucosa anormal como se determina mediante ensayos de tolerancia a glucosa. Estos resultados se pueden extender para incluir animales adicionales de diversas edades, y se pueden realizar estudios similares con los mutantes ob/ob y db/db. Ya que ambas de estas mutaciones son recesivas, se pueden generar ratones que son doblemente homocigóticos para la mutación miostatina y cualquier mutación ob o db. Con el fin de examinar los efectos de pérdida parcial de la función de miostatina en estos sistemas de modelos genéticos, también se examinan ratones que son homocigóticos para la mutación ob o db y heterocigóticos para la mutación miostatina. Se han generado ratones que son doblemente heterocigóticos para las mutaciones de miostatina y ob, y se puede examinar la prole de apareamientos de estos ratones doblemente heterocigóticos, particularmente con respecto a la acumulación de grasa y metabolismo de glucosa. La supresión parcial de cualquiera o ambas de estas anomalías en los mutantes obesos puede indicar que la miostatina es una diana para el tratamiento de obesidad y diabetes de tipo II.

Ejemplo 11

Caracterización de ratones transgénicos que expresan polipéptidos negativos dominantes que pueden afectar a la actividad de miostatina

Este ejemplo describe procedimientos para caracterizar el efecto de miostatina postnatal mediante la expresión de polipéptidos negativos dominantes que pueden bloquear la expresión de miostatina o transducción de la señal de miostatina.

Inhibidores de miostatina

La modulación de actividad de miostatina postnatal se puede usar para determinar el efecto de miostatina sobre el número de fibras musculares (hiperplasia) y tamaño de fibra muscular (hipertrofia). Los ratones genéticamente

deficientes en miostatina condicionales, en los que el gen de miostatina está suprimido en momentos definidos durante la vida del animal, se puede usar para estos estudios. El regulador tet en combinación con la recombinasa cre proporciona un sistema para generar tales ratones. En este sistema, la expresión de cre se induce por la administración de doxiciclina.

- 5 Ratones transgénicos que expresan un inhibidor de miostatina de un promotor inducible también se pueden generar de manera que la actividad de miostatina se puede reducir o inhibir en momentos definidos durante la vida del animal. Los reguladores de tetraciclina son útiles para generar tales ratones transgénicos, en los que la expresión de miostatina se induce por la doxiciclina.

10 Una modificación del sistema tet, que utiliza la co-expresión de un transactivador de tet inverso híbrido (proteína de fusión del dominio de activación de VP16 con el represor de tet inverso mutante) y un transrepresor de tet híbrido (proteína de fusión del dominio del represor KRAB de Koxl de mamífero con el represor de tet nativo), puede ser particularmente útil para producir ratones transgénicos (Rossi et al., Nat. Genet. 20: 389 - 393, 1998; Forster et al., Nucl. Acids Res. 27: 708 - 710, 1999). En este sistema, el transactivador de tet inverso híbrido se une a secuencias se operador tet, y activa la transcripción solamente en la presencia de tetraciclina; el transrepresor de tet híbrido se une a secuencias del operador tet y reprime la transcripción solamente en la ausencia de tetraciclina. Mediante la expresión conjunta de estas dos proteínas de fusión, la actividad basal del promotor diana se silencia por el transrepresor de tet en la ausencia de tetraciclina, y se activa por el transactivador de tet inverso tras la administración de tetraciclina.

20 Se pueden generar dos tipos de líneas transgénicas. En el primer tipo, el transgén codifica un polipéptido de inhibidor de miostatina bajo el control de un promotor específico de músculo, por ejemplo, el promotor de creatina quinasa de músculo (Sternberg et al., supra, 1988) o el potenciador/promotor de cadena ligera de miosina (Donoghue et al., supra, 1991). Líneas transgénicas individuales se seleccionaron para la expresión específica de los reguladores de tet en el músculo esquelético, y varias líneas independientes para cada uno de los dos promotores se seleccionan y se examinan para confirmar que cualesquiera efectos observados no se deben, por ejemplo, para efectos específicos del sitio de integración. Se ha construido una construcción que contiene los dos reguladores de tet bajo el control del promotor / potenciador de la cadena ligera de miosina, y se puede usar para inyecciones pronucleares. En el segundo tipo de línea el transgén contiene un polipéptido inhibidor de miostatina bajo el control de un promotor de CMV mínimo que además contiene secuencias del operador de tet.

30 El inhibidor de miostatina puede ser una forma negativa dominante de miostatina o un prodominio de miostatina, que, como se describe en el presente documento, puede inhibir la actividad de miostatina. Se han descrito formas dominantes negativas de miembros de la familia de TGF- β (véase, por ejemplo, López et al., Mol. Cell Biol. 12: 1674 - 1679, 1992; Wittbrodt y Rosa, Genes Devel. 8: 1448 - 1462, 1994), y contienen, por ejemplo, un sitio de escisión proteolítica mutante, evitando por lo tanto que la proteína se procese en las especies biológicamente activas. Cuando se expresan de manera conjunta en una célula con el gen endógeno de tipo natural, la proteína mutante forma heterodímeros no funcionales con la proteína de tipo natural, actuando de esta manera como un negativo dominante. Se ha construido un polipéptido de mioestatina mutante que contiene una mutación en el sitio de escisión de promiostatina, y se puede examinar para un efecto negativo dominante mediante la expresión conjunta de la miostatina de tipo natural en relaciones variantes en las células 293. Medio acondicionado de células 293 transfectadas transitoriamente con las construcciones se pueden examinar mediante análisis de transferencia de western y se puede examinar la capacidad del mutante para bloquear la formación de dímeros C-terminal maduros.

40 También se puede utilizar una construcción de expresión que codifica solamente el prodominio de miostatina. Como se ha descrito anteriormente, el prodominio forma un complejo apretado con el dímero C-terminal maduro y bloquea la capacidad del dímero de miostatina C-terminal maduro para unir Act RUB en células que expresan el receptor en cultivo. Por analogía con TGF- β , el prodominio de miostatina también puede mantener el dímero C-terminal maduro en un complejo latente inactivo *in vivo*.

45 Estos animales transgénicos se pueden cruzar con los que expresan los reguladores de reguladores de tet para generar líneas doblemente transgénicas que contienen tanto los reguladores de tet como construcción diana de inhibidor. Estas líneas doblemente transgénicas se pueden seleccionar para aquellos en los que todos los componentes diferentes se expresan de manera apropiada. El análisis de transferencia de Northern que usa ARN obtenido de diversos músculos y tejidos control de ratones representativos en cada línea, antes y después de la administración de doxiciclina en el agua de beber, se puede usar para identificar tales líneas transgénicas. Líneas transgénicas se seleccionarán para que no expresen el transgén en ningún tejido en la ausencia de doxiciclina, y que expresa el transgén solamente en músculo en la presencia de doxiciclina.

55 Se administra doxiciclina a los animales transgénicos seleccionados y se examina el efecto de la masa muscular. La doxiciclina se puede administrar a madres para inducir la expresión del inhibidor durante la embriogénesis. El efecto de bloqueo de actividad de miostatina durante el desarrollo de los animales transgénicos se puede comparar

con los efectos observados en ratones genéticamente deficientes en miostatina. Ya que los promotores para dirigir la expresión de los reguladores de tet se pueden inducir en un momento más tarde durante el desarrollo que el momento en el que la miostatina se expresa primero, el efecto sobre la masa muscular en ratones transgénicos se puede comparar con el efecto que se produce en las ratones genéticamente deficientes en miostatina .

- 5 El efecto de inhibición de la actividad de miostatina postnatal se puede examinar mediante la administración de doxiciclina a los ratones doblemente transgénicos en diversos momentos después del nacimiento. El tratamiento con doxiciclina puede comenzar, por ejemplo, a las 3 semanas de edad, y los animales se pueden analizar a los 5 meses de edad, que es la edad a la que la diferencia en pesos musculares estaba a un máximo entre los ratones genéticamente deficientes en miostatina frente a los ratones de tipo natural. Los animales se examinaron para los efectos del inhibidor sobre la masa muscular. Músculos también se pueden examinar histológicamente para determinar los efectos sobre el número de fibras y tamaño de fibras. Además, un análisis de tipo de fibra de diversos músculos en los ratones transgénicos se pueden realizar para determinar si existe un efecto selectivo sobre las fibras de tipo I o tipo II.
- 10 La doxiciclina se puede administrar en diferentes dosis y en diferentes momentos para caracterizar el efecto de los inhibidores de miostatina. Los ratones doblemente transgénicos también se pueden mantener de manera crónica sobre doxiciclina, después se analizaron para determinar los efectos sobre los pesos de almohadilla grasa y otros parámetros metabólicos relevantes como se ha descrito anteriormente. Los resultados de estos estudios pueden confirmar que la modulación de la actividad de miostatina postnatal puede incrementar la masa muscular o disminuir la acumulación de grasa, indicando de esta manera que la dirección de miostatina puede ser útil para el tratamiento de una diversidad de enfermedades de desgaste de músculo y metabólicas clínicamente.
- 15 20

Miostatina

- 25 Ratones transgénicos que contenían un transgén de miostatina también se pueden examinar y los efectos producidos tras la expresión de miostatina se pueden comparar con los observados en los ratones atímicos que contenían las células CHO que expresan miostatina. De manera similar como se ha descrito anteriormente, miostatina se pueden colocar bajo el control de reguladores de elementos condicionales (tet) y específicos de tejido, y expresión de miostatina en los ratones transgénicos se puede examinar para determinar si un síndrome de desgaste se produce similar al observado en los ratones atímicos. El transgén de miostatina puede incluir, por ejemplo, señales de procesamiento derivados de SV40, de manera que el transgén se puede distinguir del gen de miostatina endógeno.
- 30 Se pueden aislar muestras de suero de los ratones transgénicos de miostatina en diversos momentos después de la administración de doxiciclina y se puede determinar el nivel del producto génico de miostatina en el suero. Los pesos de cuerpo totales de los animales se controlan con el tiempo para determinar si los animales muestran pérdida de peso significativa. Además, se aíslan y se pesan los músculos individuales y almohadillas de grasa, y el número, tamaño y tipo de fibras de músculo se determinan en muestras de músculo seleccionadas.
- 35 El nivel de expresión del transgén de miostatina se puede modificar variando la dosis de doxiciclina administrada a los animales. La expresión del transgén se puede controlar usando, por ejemplo, análisis de transferencia de northern de niveles de ARN de transgén en el músculo, o niveles de proteína miostatina en suero. La identificación de los niveles específicos de expresión de transgén de miostatina permite una correlación del grado de desgaste inducido por miostatina. Las líneas transgénicas también se pueden cruzar con los ratones genéticamente deficientes en miostatina para generar ratones en los que la única fuente de miostatina es expresión del transgén. Se puede examinar la expresión de miostatina en diversos momentos durante el desarrollo y el efecto of miostatina sobre el número de fibras, tamaño de fibras, y tipo de fibras. La disponibilidad de los ratones en los que la expresión de miostatina se puede controlar precisamente y rápidamente proporciona una herramienta potente para la caracterización adicional de la transducción de la ruta de la señal de miostatina y para examinar los efectos de diversos agentes que potencialmente pueden ser útiles para modulación de la transducción de la señal de miostatina.
- 40 45

Efectores de transducción de la señal de miostatina

- 50 Se pueden generar ratones transgénicos que contienen o bien formas dominantes negativas de una ruta de transducción de la señal de miostatina, que puede incluir componentes de una ruta transducción de la señal de TGF- β □□, que se expresa específicamente en músculo esquelético. Como se describe en el presente documento, las proteínas Smad, que median la transducción de la señal a través de una ruta inducida por receptores de tipo II de activina, pueden estar implicadas en la transducción de la señal de miostatina.

- Act RIIIB se puede unir a GDF-11, que está altamente relacionado con miostatina (McPherron et al., supra, 1997; Gamer et al., supra, 1999; Nakashima et al., Mech. Devel. 80: 185 - 189, 1999), y expresión de c-ski, que puede unirse e inhibir Smad 2, Smad 3, y Smad 4, afecta notablemente al desarrollo de músculo (Sutcliffe et al., supra,
- 55

1990; Berk et al., supra, 1997; véase, también, Luo et al., supra, 1999; Stroschein et al., supra, 1999; Sun et al., supra, 1999 a y b; Akiyoshi et al., supra, 1999). Como se describe en el presente documento, miostatina interactúa específicamente con Act RIIB y, por lo tanto, puede ejercer su efecto biológico, al menos en parte, mediante la unión a receptores de activina de tipo II *in vivo* y activar la ruta de señalización Smad.

- 5 El papel de la ruta de señalización en la regulación del crecimiento muscular se puede examinar usando líneas de ratón transgénicos que están bloqueadas, o son capaces de estar bloqueadas, en puntos específicos en la ruta transducción de la señal de Act RIIB/Smad. El promotor de creatina quinasa de músculo o potenciador/promotor de cadena ligera de miosina se pueden usar para dirigir la expresión de diversos inhibidores de la ruta transducción de la señal de Smad.
- 10 Un inhibidor útil en este sistema puede incluir, por ejemplo, folistatina; un receptor Act RIIB dominante negativo, polipéptido de Smad dominante negativo tal como Smad 3; c-ski; o un polipéptido de Smad inhibidor tal como Smad 7. Folistatina puede unirse e inhibir la actividad de ciertos miembros de la familia de TGF- β , incluyendo GDF-11 (Gamer et al., supra, 1999). Formas dominantes negativas de un receptor de tipo II de activina se puede obtener mediante expresión de un receptor de GDF truncado, por ejemplo, mediante expresión del dominio extracelular, particularmente una forma soluble de un dominio extracelular de Act RIIB, o mediante la expresión de un receptor de Act RIIB truncado que carece del dominio quinasa o contiene una mutación de manera que el receptor mutante carece de actividad quinasa. Smad 7 funciona como un Smad inhibidor que puede bloquear la ruta de señalización inducida por activina, TGF- β , y BMP. Una forma negativa dominante de Smad 3, por ejemplo, se puede construir mediante mutación de los sitios de fosforilación de Smad 3 C-terminales, bloqueando, por lo tanto,
- 20 la función de Smad 3 (Liu et al., supra, 1997). La sobreexpresión de c-ski se ha correlacionado con hipertrofia muscular en ratones transgénicos (Sutcliffe et al., supra, 1990).

Se pueden preparar ratones transgénicos y cada línea fundadora examinada para la expresión apropiada, específica de músculo del transgén. Los ratones seleccionados se examinan para determinar los pesos corporales totales, pesos musculares individuales, y tamaños, números y tipos de fibras musculares. Esas líneas que demuestran un claro efecto de masa muscular se puede examinar además para determinar la acumulación de grasa y otros parámetros metabólicos relevantes como se ha descrito anteriormente. El uso de estos agentes diferentes para dirigir etapas específicas en la ruta de transducción de la señal del receptor de activina/Smad es particularmente informativo debido a las rutas de señalización para los diferentes agentes se superponen en diferentes etapas. Por ejemplo, la folistatina se une a e inhibe la activina y actividad de GDF-11, pero no TGF- β , mientras que un Smad 3 dominante negativo puede bloquear la señalización mediante tanto receptores activina como TGF- β . Smad 7 puede tener incluso uno más pleiotrópico debido a que bloquea la señalización a través de receptores BMP también. Los estudios pueden permitir la identificación de dianas específicas para modular la actividad de miostatina, proporcionando de esta manera diversas estrategias para desarrollar fármacos u otros agentes que modulan la transducción de la señal de miostatina y, por lo tanto, la actividad de miostatina.

- 35 En particular, las líneas transgénicas descritas en el presente documento se pueden usar para determinar el efecto de bloquear la función de miostatina o la ruta de señalización de Smad postnatal en el desarrollo de obesidad o diabetes de tipo II. Por ejemplo, los transgenes inhibidores se pueden cruzar en los ratones mutantes ob/ob, db/db, y Ay. En la ausencia de doxiciclina, un transgén inhibidor no se expresa y, por lo tanto, los animales son indistinguibles entre cada uno de los ratones mutantes parentales. En la presencia de doxiciclina, el inhibidor se expresa y puede bloquear la actividad de miostatina. Se puede examinar el efecto de bloquear la actividad de miostatina en el desarrollo de las anomalías metabólicas en estos animales mutantes.
- 40

La expresión del inhibidor se puede inducir en una edad temprana, por ejemplo, a las 3 semanas de edad, para maximizar el efecto. Además, actividad de miostatina se puede bloquear antes del momento que las anomalías metabólicas lleguen a ser graves así como irreversibles. Animales se pueden mantener sobre doxiciclina y ensamblarse a diversas edades usando los ensayos descritos anteriormente, incluyendo las relacionadas con la acumulación de grasa y metabolismo de glucosa. Se puede identificar cualquier retraso en la edad a la que uno o más resultados de ensayo llegan a ser anormales en los animales mutantes ob/ob, db/db, y Ay. Se pueden realizar estudios similares usando animales, que han desarrollado algunos de los signos de obesidad o diabetes de tipo II, y se puede determinar el efecto de bloquear la actividad de miostatina sobre diversos parámetros, incluyendo peso de grasa y metabolismo de glucosa. Los resultados de estos estudios pueden además identificar dianas específicas que se pueden manipular en un esfuerzo para prevenir o tratar obesidad o diabetes de tipo II.

Ejemplo 12

Caracterización del efecto de la miostatina sobre la inducción de caquexia

- 55 Este ejemplo describe procedimientos para determinar el papel de la transducción de la señal de miostatina en el desarrollo y progresión de caquexia.

La ruta del receptor de activina y Smad puede constituir al menos parte de la ruta de transducción de la señal implicada en la mediación de la actividad de miostatina en individuos normales y, por lo tanto, puede estar implicada en la mediación de los efectos que se producen en un individuo debido a los niveles excesivos de miostatina. Como se describe en el presente documento, la caquexia, por ejemplo, pueden estar medida, al menos en parte, por niveles altamente anormales de miostatina. Como tal, procedimientos para mantener la transducción de la señal a través de la ruta de Smad puede proporcionar una nueva estrategia para desarrollar fármacos para el tratamiento de desgaste de músculo en general y caquexia en particular.

El papel de la ruta de señalización Smad en caquexia se puede examinar mediante examen de la susceptibilidad de las diversas líneas transgénicas descritas anteriormente a caquexia, que se pueden introducir, por ejemplo, por interleucina-6 (IL-6; Black et al., Endocrinology 128: 2657 - 2659, 1991), factor-I de necrosis tumoral (TNF-I; Olliff et al., Cell 50: 555 - 563, 1987), o ciertas células tumorales. En el caso de IL-6 y TNF-I, los transgenes inhibidores se pueden cruzar en un fondo de ratón desnudo, después los animales se pueden exponer a células CHO que producen IL-6 o TNF-I, que inducen desgaste en ratones atímicos que se sobreexpresan de esta manera. Células CHO que sobreproducen IL-6 o TNF-I se pueden preparar usando los procedimientos descritos anteriormente para generar células que sobreproducen miostatina. Por ejemplo, ADNc de TNF-I se puede clonar en el vector de expresión pMSXND (Lee and Nathans, J. Biol. Chem. 263: 3521 - 3527, 1988), después las células que llevan copias amplificadas de la construcción de expresión se pueden seleccionar por etapas en concentraciones crecientes de metotrexato.

Células tumorales tales como células de carcinoma de pulmón de Lewis (Matthys et al., Eur. J. Cancer 27:182 - 187, 1991) células de adenocarcinoma de colon 26 (Tanaka et al., J. Cancer Res. 50: 2290 - 2295, 1990), que pueden inducir caquexia en ratones, también se pueden utilizar para estos estudios. Estas líneas celulares provoca un desgaste grave cuando crecen como tumores en ratones. De este modo, el efecto de estos tumores se puede examinar en los diversos ratones transgénicos descritos en el presente documento. Se reconoce que las diversas células tumorales solamente crecerán en ciertos fondos genéticos. Por ejemplo, la células de carcinoma de pulmón de Lewis se desarrollan de manera rutinaria en ratones C57 BL/6, y las células de adenocarcinoma de colon 26 se desarrollan de manera rutinaria en ratones BALB/c. De este modo, los transgenes se pueden retrocruzar en estos u otros fondos genéticos para permitir el crecimiento de las células tumorales.

Se pueden controlar diversos parámetros, incluyendo peso corporal total, peso muscular individual, tamaño y número de las fibras musculares, ingesta de alimento y parámetros en suero, incluyendo niveles de glucosa. Además, los niveles de miostatina en suero y niveles de ARN de miostatina en músculo se pueden examinar para confirmar que el aumento de expresión miostatina está correlacionado con caquexia. Los resultados de estos estudios pueden confirmar que la acción de miostatina está cadena abajo de los agentes que inducen caquexia en estos modelos experimentales. Los resultados también pueden confirmar que la ruta de señalización de Smad es esencial para el desarrollo de caquexia en estos modelos, y pueden demostrar que un beneficio terapéutico se puede obtener en el tratamiento de caquexia mediante la modulación de la señalización de Smad.

Ejemplo 13

Identificación y caracterización de receptores de factor-8 de diferenciación de crecimiento (gdf-8) y gdf-11

Este ejemplo describe procedimientos para identificar y caracterizar receptores de la superficie celular para GDF-8 (miostatina) y GDF-11.

Las proteínas de GDF-8 y GDF-11 purificadas se usarán principalmente para ensayar las actividades biológicas. Con en fin de identificar células diana potenciales para la acción de GDF-8 y GDF-11 se investigarán células que expresan sus receptores. Para este propósito, la proteína purificada se radio-yodará usando el procedimiento de cloramina T, que se ha usado exitosamente para marcar otros miembros de esta superfamilia, como TGF- β (Cheifetz et al., supra, 1987), activinas (Sugino et al., J. Biol. Chem. 263:15249-15252, 1988), y BMP (Paralkar et al., Proc. Natl. Acad.-Sci., USA 88: 3397 - 3401, 1991), para estudios de unión al receptor. Las formas procesadas maduras de GDF-8 y GDF-11 cada una de ellas contenía múltiples restos de tirosina. Se pueden coger dos planteamientos diferentes para identificar receptores para estas proteínas.

Un planteamiento determinará el número, afinidad, y distribución de receptores. O bien células enteras desarrolladas en cultivo, secciones congeladas de embriones o tejidos adultos, o fracciones de membrana total preparadas a partir de tejidos o células cultivadas se incubarán con la proteína marcada, y se determinará la cantidad o distribución de proteína unida. Para experimentos que implican líneas celulares o membranas, la cantidad de unión se determinará midiendo o bien la cantidad de radioactividad unida a las células en el disco después de varios lavados o, en el caso de las membranas, la cantidad de radioactividad sedimentada con las membranas después de centrifugación o retenidas con las membranas sobre un filtro. Para experimentos que implican cultivos primarios, donde el número de células puede estar más limitado, se visualizarán los sitios de unión directamente mediante superposición con emulsión fotográfica. Para los experimentos que implican secciones

congeladas, se visualizarán los sitios de unión a ligando directamente mediante exposición de las secciones a hiperpelícula Beta-max de alta resolución; si se requiere una localización más fina, las secciones se sumergirán en emulsión fotográfica. Para todos estos experimentos, la unión específica se determinará mediante la adición de exceso de proteína no marcada como competidor (por ejemplo, véase Lee and Nathans, supra, 1988).

- 5 Un segundo planteamiento será caracterizar el receptor bioquímicamente. Preparaciones de membrana o células diana potenciales desarrolladas en cultivo se incubaron con ligando marcado, y complejos receptor/ligando se reticularon covalentemente usando suberato de disuccinimidilo, que se ha usado comúnmente para identificar receptores para una diversidad de ligandos, incluyendo miembros de la superfamilia TGF- β (Massague and Like, J. Biol. Chem. 260:2636 - 2645, 1985). Los complejos reticulados se separan mediante electroforesis sobre geles de poliacrilamida SDS para buscar las bandas marcadas en la ausencia, pero no en la presencia de presencia, de exceso de proteína no marcada. El peso molecular del receptor supuesto se estimará restando el peso molecular del ligando. Una cuestión importante es que estos experimentos dirigirán si la señal GDF-8 y GDF-11 a través de los receptores de tipo I y tipo II como muchos otros miembros de la superfamilia TGF- β (Massague and Weis-Garcia, supra, 1996).
- 10
- 15 Una vez se ha logrado un procedimiento para detectar receptores para estas moléculas, se llevará a cabo un análisis más detallado para determinar las afinidades y especialidades de unión. Se usará un análisis Scatchard para determinar el número de sitios de unión y constantes de disociación. Llevando a cabo análisis de competición cruzada entre GDF-8 y GDF-11, será posible determinar si serán capaces de unirse al mismo receptor y sus afinidades relativas. Estos estudios proporcionarán una indicación con respecto a si las moléculas se comunican por señalan a través de los mismos o diferentes receptores. Los experimentos de competición que usan otros miembros de la familia TGF- β se realizarán para determinar la especificidad. Algunos de estos ligandos están disponibles comercialmente, y algunos otros están disponibles de Genetics Institute, Inc.
- 20

- Para estos experimentos, se ensayarán una diversidad de tejidos embrionarios y adultos y líneas celulares. Basándose en la expresión específica GDF-8 en músculo esquelético y el fenotipo de GDF-8 ratones genéticamente deficientes, los estudios iniciales se localizan en tejido muscular embrionario y adulto para la preparación de membrana y para estudios de receptor usando secciones congeladas. Además, se aislarán mioblastos y se cultivarán a partir de embriones en diversos días de gestación de células satélite de músculo de adultos como se ha descrito (Vivarelli and Cossu, Devel. Biol. 117: 319 - 325, 1986; Cossu et al., Cell Diff. 9: 357 - 368, 1980). Los estudios de unión de estas células de adulto después de diversos días en cultivo se realizarán y se localizarán los sitios de unión mediante autorradiografía de manera que los sitios de unión se puedan localizar conjuntamente con diversos marcadores miogénicos, tales como miosina de músculo (Vivarelli et al., J. célula Biol. 107: 2191 - 2197, 1988), y la unión se correlaciona con el estado de diferenciación de las células, tal como formación de miotubos multinucleados. Además de usar células primarias, líneas celulares se utilizarán para buscar receptores. En particular, el foco inicial estará sobre tres líneas celulares, C2C12, L6, y P 19. Mioblastos C2C12 y L6 se diferencian espontáneamente en cultivo y forman miotubos dependiendo de las condiciones de crecimiento particulares (Yaffe y Saxel, supra, 1977; Yaffe, supra, 1968). Se pueden introducir carcinoma células de carcinoma embrionarias P19 para diferenciarse en en diversos tipos de células, incluyendo células del músculo esquelético en la presencia de DMSO (Rudnicki and McBurney, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A practical approach (E.J. Robertson, IRL Press, Cambridge 1987). Estudios de unión a receptor se llevarán a cabo sobre estas líneas celulares en diversas condiciones de crecimiento y en diversas fases de diferenciación. Aunque los estudios iniciales se enfocarán sobre células musculares, otros tipos de tejidos y células se examinarán para determinar la presencia de receptores de GDF-8 y GDF-11.
- 25
 - 30
 - 35
 - 40

- En estos estudios de unión se usará homodímero de GDF-8 (rhGDF-8) humano recombinante. RhGDF-8 se expresó usando células CHO y se purificarán hasta aproximadamente 90% de pureza. El rhGDF-8 el peso molecular esperado de 25 kDa a 27 kDa y, tras reducción, se redujo hasta el monómero de 12 kDa. Usando GDF-8 marcado con I-¹²⁵ en un ensayo de unión de receptor-ligando, dos líneas celulares de mioblastos, L6 y G-8, unidos a GDF-8. La unión era específica ya que GDF-8 no marcado competía eficazmente con la unión del ligando marcado. La constante de disociación (Kd) era 370 pM, y mioblastos L6 tenían un alto número (5.000 receptores/célula) de proteínas de unión de superficie celular. GDF-11 (BMP-11) es altamente homólogo (>90%) con GDF-8. Los estudios de unión al receptor revelaron que GDF-8 y GDF-11 unidos a las mismas proteínas de unión sobre mioblastos L6. Es importante establecer si o no GDF-8 se une al receptor de TGF- β conocido. TGF- β no compitió con la unión GDF-8, indicando que el receptor de GDF-8 es distinto del receptor TGF- β . El receptor GDF-8 no se expresó sobre todas las líneas celulares de mioblasto, incluyendo cuatro líneas celulares de mioblasto, C2C12, G7, MLB13MYC c14 y BC3H1, que no se unen a GDF-8.
- 45
 - 50

- 55 Se pueden obtener el gen o genes que codifican receptores para GDF-8 y GDF-11. Como una primera etapa hacia el entendimiento del mecanismo mediante el que GDF-8 y GDF-11 ejercen sus efectos biológicos, es importante clonar los genes que codifican sus receptores. A partir de los experimentos anteriores, es más evidente con respecto a si GDF-8 y GDF-11 se unen al mismo receptor o a diferentes receptores: También será información

considerable la distribución al tipo de tejido y célula de estos receptores. Usando esta información, se tomarán dos diferentes planteamientos para clonar los genes del receptor.

El primer planteamiento será clonar una estrategia de clonación de expresión. De hecho, esta fue la estrategia que se usó originalmente por Mathews y Vale (Cell 65: 973 - 982, 1991) y Lin et al. (Cell 68 :775 - 785,1992) para clonar los primeros receptores de activina y de TGF- β . Se obtendrá ARN de seleccionado de Poli A del tipo de tejido o de célula que expresa el más alto número relativo de sitios de unión de alta afinidad, y se usará para preparar una genoteca de ADNc en el vector de expresión pADNc-1 de mamífero, que contiene un promotor de CMV y un origen de SV40 de replicación. La genoteca se sembrará, y las células de cada placa se combinarán en el caldo y se congelarán. Se desarrollarán alícuotas de cada combinación para la preparación de ADN. Cada combinación individual se transfectará de manera transitoria a células COS en portaobjetos de cámara, y las células transfectadas se incubarán con GDF-8 o GDF-11 yodados. Después de separar por lavado la proteína no unida, los sitios de unión a ligando se visualizarán por autorradiografía. Una vez se identifica una combinación positiva, las células de esa combinación se volverá a sembrar a menor densidad, y se repitió el procedimiento. Las combinaciones positivas después se siembran, y las colonias individuales se recogen en mallas y se volvió a analizar como se describe (Wong et al., Science 228: 810 - 815, 1985).

Inicialmente, se seleccionarán usando tamaños de combinación de 1500 colonias. Con el fin de asegurarse de identificar un clon positivo en una mezcla de esta complejidad, se realizará un experimento de control usando receptor de tipo II de TGF- β y uno clonado. La secuencia de codificación para el receptor de tipo II de TGF- β se clonará en el vector pADNc-1, y bacterias transformadas con esta construcción se mezclarán con bacterias de nuestra genoteca a diversas relaciones, incluyendo 1:1500. El ADN preparado a partir de esta mezcla después se transfectará en células COS, incubadas con TGF- β yodado, y se visualizó por autorradiografía. Si se observan señales positivas a una relación de 1:1500, se seleccionarán las combinaciones de 1500 clones. De otra manera, se usarán tamaños de combinaciones más pequeñas que corresponden a las relaciones a las que el procedimiento es lo suficiente sensible para identificar una señal positiva experimentos de control.

También se usará una segunda estrategia paralela para intentar clonar los receptores de GDF-8 y de GDF-11, aprovechándose del hecho que la mayoría de los receptores para los miembros de la superfamilia de TGF- β que se han identificado pertenece a la familia de la serina/treonina quinasa que se extiende sobre membrana (Massague y Weis- Garcia, supra, 1996). Debido a que los dominios citoplasmáticos de estos están relacionados en secuencia, se usarán sondas de PCR degeneradas para clonar miembros de esta familia de receptores que se expresan en tejidos que contienen sitios de unión para GDF-8 y GDF-11. De hecho, este es el planteamiento que se ha usado para identificar la mayoría de los miembros de esta familia de receptores. La estrategia general será diseñar cebadores degenerados que corresponden a regiones conservadas de los receptores conocidos, para usar estos cebadores para PCR sobre ADNc preparados a partir de muestras de ARN apropiadas (la mayoría probablemente a partir de músculo esquelético), para subclonar los productos de PCR, y finalmente secuenciar subclones individuales. A medida que se identifican las secuencias, se usarán como sondas de hibridación para eliminar clones duplicados de análisis duplicados. Los receptores que se identifica se ensayarán después por su capacidad para unirse a GDF-8 y GDF-11 purificados. Debido a que esta selección producirá solamente pequeños productos de PCR, clones de ADNc de longitud completa se obtendrán para cada receptor de genotecas de ADNc preparadas a partir de tejido apropiado, se insertaron en el vector pADNc-1, se transfectaron en células COS, y las células transfectadas se ensayarán para determinar su capacidad de unirse a GDF-8 o GDF-11 yodados. De manera ideal, cada receptor que se identifica en esta selección de ensayará para determinar la capacidad de unirse a estos ligandos. Sin embargo, el número de receptores que se identifican puede ser grande, y aislarse todos los ADNc de longitud completa y los ensayos de ellos pueden requerir considerable esfuerzo. La mayoría de ciertamente algunos de los receptores que se identifican corresponderán a receptores conocidos, y para éstos, o bien obtener clones de ADNc de longitud completa a partir de estos investigadores o amplificar las secuencias de codificación por PCR basándose en las secuencias publicadas se deben ser sencillos. Para las secuencias novedosas, la distribución de tejido se determinará mediante análisis de transferencia de northern y la más alta prioridad se dirigirá a los receptores cuyo patrón de expresión se parezca lo más estrechamente a la distribución de los sitios de unión de GDF-8 y / o GDF-11 como se ha determinado anteriormente.

En particular, se sabe que estos receptores caen en dos clases, tipo I y tipo II, que se pueden distinguir basándose en la secuencia y que ambos se requieren para mayor actividad. Ciertos ligandos no se pueden unir a los receptores de tipo I en la ausencia de receptores de tipo II mientras otros son capaces de unirse a ambos tipos de receptor (Massague y Weis-Garcia, supra, 1996). Los experimentos de reticulación indicados anteriormente deben proporcionar alguna indicación con respecto a si ambos receptores tipo I y tipo II también están implicados en la señalización GDF-8 y GDF-11. Si es así, será importante clonar ambos de estos subtipos de receptores con el fin de entender completamente cómo GDF-8 y GDF-11 transmiten sus señales. Debido a que no se puede predecir de si el receptor de tipo I es capaz de interactuar con GDF-8 y GDF-11 en la ausencia del receptor de tipo II, se clonarán primero receptor(es) de tipo II. Solamente después que se ha identificado al menos un receptor de tipo II para estos ligandos, se realizará un intento para identificar los receptores de tipo I para GDF-8 y GDF-11. La

estrategia general será cotransfectar el receptor de tipo II con cada uno de los receptores de tipo I que se han identificado en la selección por PCR, después del ensayo de las células transfectadas por reticulación. Si el receptor de tipo I es parte del complejo del receptor para GDF-8 o GDF-11, dos especies de receptores reticulados se deben detectar en las células transfectadas, una correspondiente al receptor de tipo I y la otra correspondiente al receptor de tipo II.

La investigación para el receptor de GDF-8 y GDF-11 además está complicada por el hecho de al menos un miembro de la superfamilia TGF- β , a saber, GDNF, es capaz de señalizar de un tipo completamente diferente de complejo de receptor que implica un componente ligado a GPI- (GDNFR- α) y una tirosina quinasa receptora (c-ret; Trupp et al., Nature 381: 785 - 789, 1996; Durbec et al., Nature 381: 789 - 793, 1996; Treanor et al., Nature 382: 80 - 83, 1996; Jing et al., Cell 85: 1113 - 1124, 1996). Aunque GDNF es el miembro relacionado más distante de la superfamilia TGF- β , es ciertamente posible que otros miembros de la familia de TGF- β también pueden señalar a través de un sistema de receptor análogo. Si GDF-8 y GDF-11 hacen la señal a través de un complejo de receptor similar, el planteamiento de selección de expresión debe ser capaz de identificar al menos el componente ligado a GPI (de hecho GDNFR- α se identificó usando un planteamiento de selección de expresión) de este complejo. En el caso de GDNF, los fenotipos similares de ratones deficientes en GDNF- y c-ret sugirieron c-ret como un receptor potencial para GDNF.

Ejemplo 14

Preparación y caracterización de ratones genéticamente deficientes en gdf-11

El fenotipo de ratones genéticamente deficientes en GDF-11 en varias consideraciones se parece al fenotipo de ratones que llevan una supresión de un receptor para algunos miembros de la superfamilia TGF- β , incluyendo the receptor de activina de tipo IIB (Act RIIIB). Para determinar la función biológica de GDF-11, el gen GDF-11 se reemplazó mediante dirección homóloga en células del tronco embrionario.

Se preparó una genoteca genómica 129 SvJ en lambda FIXII de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por Stratagene (La Jolla, CA). La estructura del gen GDF-11 se dedujo a partir del mapeo de restricción y secuenciación parcial de clones de fago aislados de la genoteca. Vectores para preparar la construcción diana fueron proporcionado amablemente por Philip Soriano y Kirk Thomas. Para asegurar que los ratones resultantes estaban sin función de GDF-11, se suprimió la región C-terminal madura y se reemplazó por un neo módulo. Células RI ES se transfectaron con la construcción de dirección, se seleccionaron con gancyclovir (2 TM) y G418 (250 Tg/ml), y se analizaron mediante análisis de transferencia de Southern.

La dirección homóloga del gen GDF-11 se observó en clones de células ES doblemente resistentes a 8/155 gancyclovir/G418. Después de la inyección de varios clones dirigidos en blastocitos C57BL/6J, se obtuvieron quimeras de un clon ES que produjo cachorros heterocigóticos cuando se cruzaron con hembras tanto C57BL6J como 129/SvJ. Cruces de heterocigotos híbridos F1 C57BL/6J/ 129/SvJ producían una descendencia de adultos 49 tipo natural (34%), 94 heterocigóticos (66%), y no homocigóticos mutantes. De manera similar, no existían animales adultos no homocigóticos observados en los antecedentes de 129/SvJ (32 animales de tipo natural (36%) y 56 heterocigóticos mutantes (64%)).

Para determinar la edad a la que los homocigóticos mutantes morían, compañeros de camada embriones aislados a diversas edades de gestación de hembras heterocigóticas que se habían cruzado con machos heterocigóticos se determinó el genotipo. A todas las fases embrionarias examinadas, embriones homocigóticos mutantes estaban presentes a aproximadamente la frecuencia predicha de 25%. Entre los ratones recién nacidos híbridos, los diferentes genotipos se representaron también en la relación Mendeliana esperada de 1:2:1 (34 +/+ (28%), 61 +/- (50%), y 28 -/ (23%)). Ratones homocigóticos mutantes nacieron vivos y eran capaces de respirar y alimentarse. Todos los homocigóticos mutantes murieron, sin embargo, dentro de las primeras 24 horas después del nacimiento. La causa precisa de la muerte era desconocida, pero la letalidad puede haber estado relacionada con el hecho de que los riñones homocigóticos mutantes estaban o bien gravemente hipoplásicos o completamente ausentes.

Los animales homocigóticos mutantes eran fácilmente reconocibles por sus colas gravemente acortadas o ausentes. Para caracterizar adicionalmente los defectos en la cola en estos animales homocigóticos mutantes, se examinaron sus esqueletos para determinar el grado de ruptura de las vértebras caudales. Una comparación de preparaciones de esqueleto de tipo natural y de mutantes de embriones en fase tardía y ratones recién nacidos, sin embargo, las diferencias reveladas no solamente en la región caudal de los animales sino en muchas regiones también. En casi cualquier caso cuando se anotaron las diferencias, las anomalías parecían representar transformaciones homeóticas de segmentos vertebrales en los que los segmentos particulares parecían tener una morfología típica de más otros segmentos. Estas transformaciones eran evidentes a través del esqueleto axial que se extiende desde la región cervical de la región caudal. Excepto para los defectos observados en el esqueleto axial, el resto del esqueleto, tales como los huesos del cráneo y limbo, parecían normales.

Las transformaciones anteriores de las vértebras en animales recién nacidos mutantes eran muy fácilmente evidentes en la región torácica, mientras existía un incremento notable en el número de segmentos torácicos (T). Todos los ratones de tipo natural examinados mostraban el patrón típico de 13 vértebras torácicas cada una con su par asociado de costillas. Por el contrario, ratones homocigóticos mutantes mostraban un incremento sorprendente en el número de vértebras torácicas. Todos los homocigóticos mutantes examinados tenían 4 a 5 pares extra de costillas para un total de 17 a 18, aunque en más de 1/3 de estos animales, la costilla 18 parecía ser rudimentaria. Por lo tanto, segmentos que normalmente corresponderían a los segmentos lumbares (L) L1 a L4 o L5 parecían haberse transformado en segmentos torácicos en animales mutantes.

Además, transformaciones dentro de la región torácica en las que una vértebra torácica tenía una morfología característica de otra vértebra torácica eran también evidentes. Por ejemplo, en ratones de tipo natural, los primeros siete 7 pares de costillas se unen al esternón, y los 6 remanentes están sin unir o libres. En homocigóticos mutantes, había un incremento en el número de tanto pares unidos como libres de costillas a 10 - 11 y 7 - 8, respectivamente. Por lo tanto los, segmentos torácicos T8, T9, T10, y el algunos casos incluso T11, que tienen todos costillas libres en los animales de tipo natural, se transfirieron en animales mutantes que tenían una característica típica de más segmentos torácicos anteriores, a saber, la presencia de costillas unidas al esternón. Consistente con este hallazgo, el proceso espinoso de transición y los procesos articulares de transición que se encuentran normalmente en T10 en animales de tipo natural se encontraron en cambio en T13 en homocigóticos mutantes. Las transformaciones adicionales dentro de la región torácica también se observarán en ciertos animales mutantes. Por ejemplo, en ratones de tipo natural, las costillas derivadas de T1 normalmente tocan la parte superior del esternón. Sin embargo, en ratones 2/23 híbridos y 2/3 129/SvJ homocigóticos mutantes examinados, T2 parecía que se hubieran transformado para tener una morfología que parecía a la de T1; esto es, en estos animales, las costillas derivadas de T2 se extendían para tocar la parte superior del esternón. En estos casos, las costillas derivadas de T1 parecían fusionarse al segundo par de costillas. Finalmente, en el 82% de homocigóticos mutantes, el largo proceso espinoso normalmente presente en T2 se cambió a la posición de T3. En ciertos otros homocigóticos mutantes, la fusión asimétrica de un par de costillas vertebroexternales se observó en otros niveles.

Las transformaciones anteriores no estaban restringidas a la región torácica. La transformación más anterior que los investigadores observaron estaba al mismo nivel que la 6ª vértebra cervical (C6). En ratones de tipo natural, C6 es fácilmente identificable por la presencia de dos tubérculos anteriores sobre el lado ventral. En varios ratones homocigóticos mutantes, aunque uno de estos dos tubérculos anteriores estaba presente en C6, el otro en cambio estaba presente en la posición de C7. Por lo tanto, en estos ratones, C7 parecía haberse transformado parcialmente tenían una morfología que parecía a la de C6. Otro homocigótico mutante tiene dos tubérculos 2 anteriores sobre C7 pero retenían uno sobre C6 para una completa transformación de C7 a C6 excepto una transformación parcial C6 a C5.

Las transformaciones del esqueleto axial también se extendían en la región lumbar. Mientras que los animales de tipo natural normalmente tienen solamente 6 vértebras lumbares, homocigóticos mutantes tenían 8 a 9. Al menos 6 de las vértebras lumbares en los mutantes deben haber derivado de los segmentos que normalmente habrían dado lugar a vértebras sacras y caudales como los datos anteriormente sugieren que 4 a 5 segmentos lumbares se transformaron en segmentos torácicos. Por lo tanto, ratones homocigóticos mutantes tenían un total de 33 - 34 vértebras presacras comparado con las 26 vértebras presacras normalmente presentes en ratones de tipo natural. Los patrones de vértebras presacras más comunes eran C7/T18/L8 y C7/T18/L9 para ratones mutantes comparados con C7/T13/L6 para ratones de tipo natural. La presencia de vértebras presacras adicionales en animales mutantes era obvia incluso sin examen detallado de los esqueletos ya que la posición de los miembros exteriores con relación a los miembros anteriores estaba desplazada posteriormente en 7 a 8 segmentos.

Aunque las vértebras sacras y caudales también estaban afectadas en ratones homocigóticos mutantes, la naturaleza exacta de cada transformación no era fácilmente identificable. En ratones de tipo natural, los segmentos sacros S1 y S2 típicamente tenían amplios procesos transversales comparados con S3 y S4. En los mutantes, no parecían tener una vértebra identificable S1 o S2. En cambio, los animales mutantes tenían varias vértebras que parecían tener morfología similar a S3. Además, los procesos transversales de las 4 vértebras sacras están normalmente fusionados entre sí aunque en recién nacidos a menudo solamente se observan las fusiones de las 3 primeras vértebras. En homocigóticos mutantes, sin embargo, los procesos transversales de las vértebras sacras estaban inusualmente no fusionadas. En la región más caudal, todos los animales mutantes también tenían vértebras gravemente malformadas con fusiones extensivas de cartílago. Aunque la gravedad de las fusiones dificulta contra el número total de vértebras en la región caudal, hasta 15 procesos transversales se contaron en varios animales. No se puede determinar si éstas representaban vértebras sacras o caudales en los mutantes debido a los criterios morfológicos para distinguir S4 de vértebras caudales incluso en animales recién nacidos de tipo natural pueden no estar establecidas. Independientemente de sus identidades, el número total de vértebras en esta región estaba significativamente reducido del número normal de aproximadamente 30. Por lo tanto, aunque los mutantes tenían significativamente más vértebras torácicas y lumbares que los ratones de tipo natural, el número total de segmentos estaba reducido en los mutantes debido al truncamiento de las colas.

Ratones heterocigóticos también pueden mostrar anomalías en el esqueleto axial el fenotipo era mucho más suave que en ratones homocigóticos. La anomalía más obvia en ratones heterocigóticos era la presencia de un segmento torácico adicional con un par de costillas asociado. Esta transformación estaba presente en cada animal heterocigótico examinado, y en cada caso, el par de costillas adicional estaba unido al esternón. Por lo tanto, T8, cuya costilla asociada normalmente no toca el esternón, parecía haberse transformado en una característica de morfología de una vértebra torácica más anterior, y L1 parecía haberse transformado a una característica de morfología de una vértebra torácica posterior. Otras anomalías indicativas de transformaciones anteriores también se observaron hasta grados variables en ratones heterocigóticos. Éstas incluían un desplazamiento de la característica del proceso espinoso largo de T2 por un segmento a T3, un desplazamiento de los procesos articular y espinoso de T10 a T11, un desplazamiento del tubérculo anterior en C6 a C7, y transformación de T2 a T1 donde la costilla asociada a T2 tocaba la parte superior del esternón.

Con el fin de entender la base de las anomalías en el patrón axial observado en GDF-11 se examinaron ratones mutantes, embriones mutantes aislados a diversas fases de desarrollo, y se compararon con embriones de tipo natural. Mediante examen morfológico básico, embriones homocigóticos mutantes aislados hasta el día 9,5 de gestación no eran fácilmente distinguibles de los embriones de tipo natural. En particular, el número de somitas presentes a cualquier edad de desarrollo dada era idéntico entre embriones mutantes y de tipo natural, sugiriendo que la tasa de formación de somita no estaba alterada en los mutantes. El día 10,5 - 11,5 p.c., los embriones mutantes eran fácilmente distinguibles de los embriones de tipo natural por el desplazamiento posterior del miembro posterior por 7 - 8 somitas. Las anomalías en el desarrollo de la cola eran también fácilmente evidentes en esta fase. Tomados conjuntamente, estos datos sugieren que las anomalías observadas en los esqueletos mutantes representaban transformaciones verdaderas de las identidades de segmento en lugar de la inserción de segmentos adicionales, por ejemplo, por una tasa potenciada de somitogénesis.

Las alteraciones en la expresión de los genes que contienen homeobox se sabe que provocan transformaciones en *Drosophila* y en vertebrados. Para ver si los patrones de expresión de los genes Hox (los genes que contienen la homeobox de vertebrado) se alteraron en mutantes sin GDF-11, el patrón de expresión de los 3 genes Hox representativos, Hoxc-6, Hoxc-8 y Hoxc-11, se determinó el día 12,5 p.c. en embriones de tipo natural, heterocigóticos y homocigóticos mutantes por hibridación de montaje global *in situ*. El patrón de expresión de Hoxc-6 en embriones de tipo natural prevértebras 8 -15 extendidas que corresponden a segmentos torácicos T1-T8. En homocigóticos mutantes, sin embargo, el patrón de expresión de Hoxc-6 se desplazó posteriormente y se expandió a las prevértebras 9 -18 (T2 - T11). Se observó un desplazamiento similar con la sonda de Hoxc-8. En embriones de tipo natural, Hoxc-8 se expresó en prevértebras 13 - 18 (T6 -T11) pero, en embriones homocigóticos mutantes, Hoxc-8 se expresó en prevértebras 14 - 22 (T7 - T15). Finalmente, la expresión de Hoxc-11 también se desplazó posteriormente en el límite anterior de la expresión cambiada de las prevértebras 28 en embriones de tipo natural a las prevértebras 36 en v mutantes. (Hay que indicar que debido a la posición del miembro posterior también se desplaza posteriormente en embriones mutantes, los patrones de expresión de Hoxc-11 el el tipo natural y mutante parecían similares con relación a los miembros posteriores). Estos datos proporcionan evidencia adicional de que las anomalías esqueléticas observadas en animales mutantes representan transformaciones homeóticas.

El fenotipo de ratones GDF-11 sugería que GDF-11 actúa de manera temprana durante la embriogénesis como un regulador global de formación de patrón axial. Para comenzar a examinar el mecanismo por el cual GDF-11 ejerce sus efectos, el patrón de expresión GDF-11 en embriones de ratones tempranos se examinó mediante hibridación de montaje global *in situ*. En estas fases, los sitios primarios de la expresión de GDF-11 se correlacionaban precisamente con los sitios conocidos en los que se generan las células mesodérmicas. Expresión de GDF-11 se detectó primero el día 8,25 - 8,5 p.c. (8 - 10 somitas) en la región de raya primitiva, que es el sitio en el que las células de ingreso forman el mesodermo del embrión en desarrollo. La expresión se mantuvo en la raya primitiva el día 8,75, pero el día 9,5 p.c., cuando el brote de la cola reemplaza la raya primitiva como la fuente de nuevas células mesodérmicas, la expresión de GDF-11 se desplaza al brote de la cola. Por lo tanto, en estas fases tempranas, GDF-11 parece sintetizarse en la región del embrión en desarrollo donde nuevas células mesodérmicas surgen y presumiblemente adquieren su identidad de posición.

El fenotipo de ratones genéticamente deficientes en GDF-11 en varios aspectos se parecen al fenotipo de ratones que llevan una supresión de receptor para algunos miembros de la superfamilia de TGF- β □□, el receptor de activina tipo IIB (Act RIIB). Como en el caso de ratones genéticamente deficientes en GDF-11, los ratones genéticamente deficientes en Act RIIB tienen pares extra de costillas y un espectro de defectos de riñón que varían entre riñones hipoplásicos a ausencia completa de riñones. La similitud en los fenotipos de estos ratones realza la posibilidad de que Act RIIB puede ser un receptor para GDF-11. Sin embargo, Act RIIB no puede ser el único receptor para GDF-11 debido a que el fenotipo de ratones genéticamente deficientes en GDF-11 es más grave que el fenotipo de ratones Act RIIB. Por ejemplo, mientras que los animales genéticamente deficientes en GDF-11 tienen 4 - 5 pares extra de costillas y muestran transformaciones a lo largo de todo el esqueleto axial, los animales genéticamente deficientes en Act RIIB tenían solamente 3 pares extra de costillas y no muestran transformaciones en otros niveles axiales. Además, los datos indican que los defectos en los riñones en los ratones genéticamente

deficientes en GDF-11 son también más graves que los de los ratones genéticamente deficientes en Act RIIIB. Los ratones genéticamente deficientes en Act RIIIB muestran defectos en la formación del eje izquierdo/derecho, tal como isomerismo pulmonar y una serie de defectos cardíacos que los investigadores no observaron todavía en los ratones genéticamente deficientes en GDF-11. Act RIIIB puede unir las activinas y ciertos BMP, aunque ninguno de los ratones genéticamente deficientes generados por estos ligandos muestran defectos en la formación del eje izquierdo/derecho.

Si GDF-11 no actúa directamente sobre las células mesodérmicas para establecer una identidad de posición, los datos presentados en el presente documento serían consistentes con o bien intervalo corto o modelos morfogénicos para la acción de GDF-11. Esto es, GDF-11 puede actuar sobre precursores mesodérmicos para establecer patrones de la expresión génica de Hox y estas células se están generando en el sitio de expresión de GDF-11, o de manera alternativa, GDF-11 producido en el extremo posterior del embrión puede difundirse para formar un gradiente morfogénico. Cualquier mecanismo de acción de GDF-11 puede ser de hecho, que la formación del patrón anterior/posterior grueso aún se produce en animales genéticamente deficientes en GDF-11 sugiere que GDF-11 puede no ser el único regulador de especificación anterior/posterior. No obstante, es evidente que GDF-11 juega un papel importante como un regulador global de formación de patrón axial y que el estudio adicional de esta molécula conducirá a importantes nuevos entendimientos de cómo la identidad de posición junto con el eje anterior/posterior se expone en el embrión vertebrado.

Se esperan fenotipos similares en animales deficientes en GDF-8. Por ejemplo, animales deficientes en GDF-8 se espera que tengan un incremento en el número de costillas, defectos en los riñones y diferencias anatómicas cuando se comparan con los de tipo natural.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a los ejemplos anteriores, se entenderá que modificaciones y variaciones están abarcadas dentro del espíritu y alcance de la invención. De acuerdo con lo anterior, la invención está limitada solamente por las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Lee, Se-Jin McPherron, Alexandra C.

<120> RECEPTORES DEL FACTOR DE DIFERENCIACIÓN DE CRECIMIENTO, SUS AGONISTAS Y ANTAGONISTAS, Y PROCEDIMIENTOS DE USO DEL MISMO

<130> JHU1470-2

<150> 09/485,046

<151> 2000-01-31

<150> PCT/US98/15598

<151> 1998-07-28

<150> 60/054,461

<151> 1997-08-01

<160> 29

<170> FastSEQ para la versión de Windows 4.0

<210> 1

<211> 2743

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (59)...(1183)

<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	
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	
tta ccc aaa gct cct cca ctc cgg gaa ctg att gat cag tat gat gtc	346
Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val	
85 90 95	

cag agg gat gac agc agc gat ggc tct ttg gaa gat gac gat tat cac	394
Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His	
100 105 110	
gct aca acg gaa aca atc att acc atg cct aca gag tct gat ttt cta	442
Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu	
115 120 125	
atg caa gtg gat gga aaa ccc aaa tgt tgc ttc ttt aaa ttt agc tct	490
Met Gln Val Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser	
130 135 140	
aaa ata caa tac aat aaa gta gta aag gcc caa cta tgg ata tat ttg	538
Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu	
145 150 155 160	
aga ccc gtc gag act cct aca aca gtg ttt gtg caa atc ctg aga ctc	586
Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu	
165 170 175	
atc aaa cct atg aaa gac ggt aca agg tat act gga atc cga tct ctg	634
Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu	
180 185 190	
aaa ctt gac atg aac cca ggc act ggt att tgg cag agc att gat gtg	682
Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val	
195 200 205	
aag aca gtg ttg caa aat tgg ctc aaa caa cct gaa tcc aac tta ggc	730
Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly	
210 215 220	
att gaa ata aaa gct tta gat gag aat ggt cat gat ctt gct gta acc	778
Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr	
225 230 235 240	
ttc cca gga cca gga gaa gat ggg ctg aat ccg ttt tta gag gtc aag	826
Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys	
245 250 255	
gta aca gac aca cca aaa aga tcc aga agg gat ttt ggt ctt gac tgt	874
Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys	
260 265 270	
gat gag cac tca aca gaa tca cga tgc tgt cgt tac cct cta act gtg	922
Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val	
275 280 285	
gat ttt gaa gct ttt gga tgg gat tgg att atc gct cct aaa aga tat	970
Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr	
290 295 300	
aag gcc aat tac tgc tct gga gag tgt gaa ttt gta ttt tta caa aaa	1018
Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys	
305 310 315 320	
tat cct cat act cat ctg gta cac caa gca aac ccc aga ggt tca gca	1066
Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala	
325 330 335	

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

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

gta gac cgc tgt ggg tgc tca tgagatttat attaacgcgtt cataacttcc 1213
Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
370 375

taaaacatgg	aaggttttcc	cctcaacaat	tttgaagctg	tgaaatgaag	taccacaggc	1273
tataggccta	gagtatgcta	cagtcactta	agcataagct	acagtatgta	aactaaaagg	1333
gggaatatat	gcaatgggtg	gcattttaacc	atccaaacaa	atcatagaag	aaagtttttat	1393
gatttccaga	gtttttgagc	tagaaggaga	tcaaattaca	tttatgttcc	tatatattac	1453
aacatcggcg	aggaaatgaa	agcgattctc	cttgagttct	gatgaattaa	aggagtatgc	1513
tttaaaagtct	atttctttta	agttttgttt	aatattttaca	gaaaaatcca	catcacagtat	1573
tggtaaaatg	caggattggt	atataccatc	attcgaatca	tccttaaaca	cttgaattta	1633
tattgtatgg	tagtatactt	ggtaagataa	aattccacaa	aaatagggat	ggtgcagcat	1693
atgcaatttc	cattcctatt	ataattgaca	cagtacatta	acaatccatg	ccaacgggtgc	1753
taatacgata	ggctgaatgt	ctgaggctac	caggttttatc	acataaaaaa	cattcagtaa	1813
aatagtaagt	ttctcttttc	ttcaggtgca	ttttcctaca	cctccaaatg	aggaatggat	1873
tttctttaa	gtaagaagaa	tcatttttct	agaggttggc	tttcaattct	gtagcatact	1933
tggagaaaact	gcattatctt	aaaaggcagt	caaatgggtg	ttgtttttat	caaaatgtca	1993
aaataacata	cttgggagaag	tatgtaattt	tgtcttttga	aaattacaac	actgcctttg	2053
caacactgca	gttttttatgg	taaaataata	gaaatgatcg	actctatcaa	tattgtataa	2113
aaagactgaa	acaatgcatt	tatataatat	gtatacaata	ttgttttgta	aataagtgtc	2173
tcctttttta	tttactttgg	tatattttta	cactaaggac	atttcaaatt	aagtactaag	2233
gcacaaagac	atgtcatgca	tcacagaaaa	gcaactactt	atatttcaga	gcaaattagc	2293
agattaaata	gtggtcttaa	aactccatat	gttaatgatt	agatgggtat	attacaatca	2353
ttttatatatt	ttttacatga	ttaacattca	cttatggatt	catgatggct	gtataaagtg	2413
aatttgaaat	ttcaatgggt	tactgtcatt	gtgttttaaat	ctcaacggtc	cattatttta	2473
atacttgcaa	aaacattact	aagtatacca	aaataattga	ctctattatc	tgaaatgaag	2533
aataaactga	tgctattctca	acaataactg	ttacttttat	tttataattt	gataatgaat	2593
ataatttctgc	atttattttac	ttctgttttg	taaattggga	ttttgttaat	caaattttatt	2653
gtactatgac	taaatagaat	tatttcttac	atctaatttg	tagaaacagt	ataagttata	2713
ttaaagtgtt	ttcacatttt	tttgaaagac				2743

<210> 2

<211> 375

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile
 1 5 10 15
 Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn
 20 25 30
 Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr
 35 40 45
 Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu
 50 55 60
 Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu
 65 70 75 80
 Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg 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
 Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu

115 120 125
 Met Gln Val Asp 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
 Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu
 165 170 175
 Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu
 180 185 190
 Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val
 195 200 205
 Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly
 210 215 220
 Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr
 225 230 235 240
 Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys
 245 250 255
 Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys
 260 265 270
 Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val
 275 280 285
 Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr
 290 295 300
 Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys
 305 310 315 320
 Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala
 325 330 335
 Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr
 340 345 350
 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> 2676

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

5 <221> CDS

<222> (104)...(1231)

<400> 3

```

gtctctcgga cggtagatgc actaatattt cacttggcat tactcaaaag caaaaagaag      60
aaataagaac aagggaaaaa aaaagattgt gctgattttt aaa atg atg caa aaa      115
                                     Met Met Gln Lys
                                     1

ctg caa atg tat gtt tat att tac ctg ttc atg ctg att gct gct ggc      163
Leu Gln Met Tyr Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile Ala Ala Gly
 5                10                15                20

cca gtg gat cta aat gag ggc agt gag aga gaa gaa aat gtg gaa aaa      211
Pro Val Asp Leu Asn Glu Gly Ser Glu Arg Glu Glu Asn Val Glu Lys
                25                30                35

gag ggg ctg tgt aat gca tgt gcg tgg aga caa aac acg agg tac tcc      259
Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Ala Trp Arg Gln Asn Thr Arg Tyr Ser
                40                45                50

```

aga ata gaa gcc ata aaa att caa atc ctc agt aag ctg cgc ctg gaa Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu 55 60 65	307
aca gct cct aac atc agc aaa gat gct ata aga caa ctt ctg cca aga Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Ala Ile Arg Gln Leu Leu Pro Arg 70 75 80	355
gcg cct cca ctc cgg gaa ctg atc gat cag tac gac gtc cag agg gat Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp 85 90 95 100	403
gac agc agt gat ggc tct ttg gaa gat gac gat tat cac gct acc acg Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr 105 110 115	451
gaa aca atc att acc atg cct aca gag tct gac ttt cta atg caa gcg Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu Met Gln Ala 120 125 130	499
gat ggc aag ccc aaa tgt tgc ttt ttt aaa ttt agc tct aaa ata cag Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln 135 140 145	547
tac aac aaa gta gta aaa gcc caa ctg tgg ata tat ctc aga ccc gtc Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu Arg Pro Val 150 155 160	595
aag act cct aca aca gtg ttt gtg caa atc ctg aga ctc atc aaa ccc Lys Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro 165 170 175 180	643
atg aaa gac ggt aca agg tat act gga atc cga tct ctg aaa ctt gac Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu Lys Leu Asp 185 190 195	691
atg agc cca ggc act ggt att tgg cag agt att gat gtg aag aca gtg Met Ser Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Thr Val 200 205 210	739
ttg caa aat tgg ctc aaa cag cct gaa tcc aac tta ggc att gaa atc Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile 215 220 225	787
aaa gct ttg gat gag aat ggc cat gat ctt gct gta acc ttc cca gga Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly 230 235 240	835
cca gga gaa gat ggg ctg aat ccc ttt tta gaa gtc aag gtg aca gac Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp 245 250 255 260	883
aca ccc aag agg tcc cgg aga gac ttt ggg ctt gac tgc gat gag cac Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His 265 270 275	931
tcc acg gaa tcc cgg tgc tgc cgc tac ccc ctc acg gtc gat ttt gaa Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu 280 285 290	979

gcc ttt gga tgg gac tgg att atc gca ccc aaa aga tat aag gcc aat 1027
Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn
295 300 305

tac	tgc	tca	gga	gag	tgt	gaa	ttt	gtg	ttt	tta	caa	aaa	tat	ccg	cat	1075
Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys	Tyr	Pro	His	
	310					315					320					

act cat ctt gtg cac caa gca aac ccc aga ggc tca gca ggc cct tgc 1123
Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys
325 330 335 340

tgc act ccg aca aaa atg tct ccc att aat atg cta tat ttt aat ggc 1171
 Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly
 345 350 355

aaa gaa caa ata ata tat ggg aaa att cca gcc atg gta gta gac cgc 1219
Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg
360 365 370

tgt ggg tgc tca tgagctttgc attaggttag aaacttccca agtcatggaa 1271
Cys Gly Cys Ser
375

ggcttcccc	tcaatttcga	aactgtgaat	tcaagcacca	caggctgtag	gccttgagta	1331
tgctctagta	acgtaagcac	aagctacagt	gtatgaacta	aaagagagaa	tagatgcaat	1391
ggttggcatt	caaccaccaa	aataaaccat	actataggat	gttgtatgat	ttccagagtt	1451
tttgaaatag	atggagatca	aattacattt	atgtccatat	atgtatatta	caactacaat	1511
ctaggcaagg	aagtgagagc	acatcttgtg	gtctgctgag	ttaggagggt	atgattaaaa	1571
ggtaaagtct	tatttcctaa	cagtttcact	taatat ttac	agaagaatct	atatgtagcc	1631
tttgtaaagt	gtaggattgt	tatcatttaa	aaacatcatg	tacacttata	tttgatttgt	1691
atacttggt	agataaaaatt	ccacaaagta	ggaatggggc	ctcacatata	cattgccatt	1751
cctattataa	ttggacaatc	caccacggtg	cta atgcagt	gctgaatggc	tcctactgga	1811
cctctcgata	gaacactcta	caaagtacga	gtctctctct	cccttccagg	tgcatctcca	1871
cacacacagc	actaagtgtt	caatgcattt	tctttaagga	aagaagaatc	tttttttcta	1931
gaggtcaact	ttcagtcaac	tctagcacag	cgggagtgc	tgctgcatct	taaaaggcag	1991
ccaaacagta	ttcattttttt	aatctaaatt	tcaaaatcac	tgtctgcctt	tatcacatgg	2051
caattttgtg	gtaaaataat	ggaaatgact	ggttctatca	atattgtata	aaagactctg	2111
aaacaattac	at ttatataa	tatgtataca	atattgtttt	gtaaataagt	gtctcctttt	2171
atattttact	tggtataattt	ttacactaat	gaaatttcaa	atcattaaag	tacaaagaca	2231
tgtcatgtat	cacaaaaaag	gtgactgctt	ctatttcaga	gtgaattagc	agattcaata	2291
gtggctctaa	aactctgtat	gttaagaatta	gaaggttata	ttacaatcaa	tttatgtatt	2351
tttttcatatta	tcaactttatg	gtttcatggt	ggctgtatct	atgaatgtgg	ctcccagtca	2411
aattttcaatg	cccaccatt	ttaaaaatta	caagctattac	taaacatacc	aacatgtatc	2471
taaagaaata	caa atatggt	atctcaataa	gcgtactttt	ttttttttat	aatttgacaa	2531
tgaatacatt	tctttttattt	acttcagttt	tataaattgg	aactttgttt	atcaa atgta	2591
ttgtactcat	agctaaatga	aattattttct	tacataaaaa	tgtgtagaaa	ctataaatta	2651
aagtgttttc	acatttttga	aaggc				2676

<210> 4

<211> 376

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 4

Met	Met	Gln	Lys	Leu	Gln	Met	Tyr	Val	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Phe	Met	Leu
1				5					10					15	
Ile	Ala	Ala	Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Asn	Glu	Gly	Ser	Glu	Arg	Glu	Glu
			20					25					30		
Asn	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Leu	Cys	Asn	Ala	Cys	Ala	Trp	Arg	Gln	Asn
		35					40					45			
Thr	Arg	Tyr	Ser	Arg	Ile	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys
	50					55					60				
Leu	Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Arg	Gln
65					70					75					80
Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Pro	Pro	Leu	Arg	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp
				85					90					95	
Val	Gln	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr
			100					105					110		
His	Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Ile	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Phe
		115						120				125			
Leu	Met	Gln	Ala	Asp	Gly	Lys	Pro	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser
	130					135					140				
Ser	Lys	Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys	Val	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr
145					150					155					160
Leu	Arg	Pro	Val	Lys	Thr	Pro	Thr	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg
				165					170					175	
Leu	Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser
			180					185					190		
Leu	Lys	Leu	Asp	Met	Ser	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp
		195					200					205			
Val	Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu
		210				215					220				
Gly	Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Asp	Glu	Asn	Gly	His	Asp	Leu	Ala	Val
225					230					235					240
Thr	Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Gly	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Glu	Val
				245					250					255	
Lys	Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp
			260					265					270		
Cys	Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr
		275					280					285			
Val	Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg
	290					295					300				
Tyr	Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln
305					310					315					320
Lys	Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser
				325					330					335	
Ala	Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu
			340					345					350		
Tyr	Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Ala	Met
		355					360					365			
Val	Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser								
	370					375									

<210> 5

<211> 1131

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)...(1128)

<400> 5

atg att caa aaa ccg caa atg tat gtt tat att tac ctg ttt gtg ctg	48
Met Ile Gln Lys Pro Gln Met Tyr Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Val Leu	
1 5 10 15	
att gct gct ggc cca gtg gat cta aat gag gac agt gag aga gag gcg	96

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

Lys	Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp		
			260					265					270				
tgc	gat	gaa	cac	tcc	acg	gaa	tcg	cgg	tgc	tgt	cgc	tac	ccc	ctc	acg		864
Cys	Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr		
		275					280					285					
gtc	gat	ttc	gaa	gcc	ttt	gga	tgg	gac	tgg	att	att	gca	ccc	aaa	aga		912
Val	Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg		
	290					295					300						
tat	aag	gct	aat	tac	tgc	tct	gga	gag	tgt	gaa	ttt	gtg	ttc	tta	caa		960
Tyr	Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln		
305					310					315					320		
aaa	tat	ccg	cat	act	cat	ctt	gtg	cac	caa	gca	aac	ccc	aga	ggc	tcg		1008
Lys	Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser		
				325					330					335			
gca	ggc	cct	tgc	tgc	acg	cca	aca	aaa	atg	tct	ccc	att	aat	atg	cta		1056
Ala	Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu		
			340					345					350				
tat	ttt	aat	ggc	aaa	gaa	caa	ata	ata	tat	ggg	aaa	att	cca	gcc	atg		1104
Tyr	Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Ala	Met		
		355					360					365					
gta	gta	gac	cgg	tgt	ggg	tgc	tcg	tga									1131
Val	Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser										
	370					375											

<210> 6

<211> 376

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 6

Met	Ile	Gln	Lys	Pro	Gln	Met	Tyr	Val	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Phe	Val	Leu
1				5				10					15		
Ile	Ala	Ala	Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Asn	Glu	Asp	Ser	Glu	Arg	Glu	Ala
			20					25					30		
Asn	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Leu	Cys	Asn	Ala	Cys	Ala	Trp	Arg	Gln	Asn
		35				40						45			
Thr	Arg	Tyr	Ser	Arg	Ile	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys
	50				55					60					
Leu	Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Arg	Gln
65					70					75					80
Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Pro	Pro	Leu	Arg	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp
				85					90				95		
Val	Gln	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr
			100					105					110		
His	Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Ile	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Phe
	115					120						125			
Leu	Met	Gln	Ala	Asp	Gly	Lys	Pro	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser
	130				135					140					
Ser	Lys	Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys	Val	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr
145				150					155						160
Leu	Arg	Ala	Val	Lys	Thr	Pro	Thr	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg
			165					170					175		
Leu	Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser
		180					185					190			
Leu	Lys	Leu	Asp	Met	Ser	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp
		195					200					205			
Val	Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu
	210				215						220				
Gly	Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Asp	Glu	Asn	Gly	His	Asp	Leu	Ala	Val
225				230						235					240
Thr	Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Gly	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Glu	Val
			245					250						255	
Lys	Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp
		260						265				270			
Cys	Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr
	275					280					285				
Val	Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg
	290				295					300					
Tyr	Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln
305				310						315					320
Lys	Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser
			325					330						335	
Ala	Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu
		340						345				350			
Tyr	Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	G									

<210> 7

<211> 1128

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)...(1125)

<400> 7

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	
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	
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	
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	
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	
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	

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

ggc cct tgc tgc aca ccc acc aag atg tcc cct ata aac atg ctg tat	1056
Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr	
340 345 350	

ttc aat gga aaa gaa caa ata ata tat gga aag ata cca gcc atg gtt	1104
Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val	
355 360 365	

gta gat cgt tgc ggg tgc tca tga	1128
Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser	
370 375	

<210> 8

<211> 374

<212> PRT

5 <213> Gallus gallus

<400> 8

Gln	Lys	Leu	Ala	Val	Tyr	Val	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Phe	Met	Gln	Ile	Ala	1	5	10	15
Val	Asp	Pro	Val	Ala	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Gln	Pro	Thr	Glu	Asn	Ala	20	25	30	
Glu	Lys	Asp	Gly	Leu	Cys	Asn	Ala	Cys	Thr	Trp	Arg	Gln	Asn	Thr	Lys	35	40	45	
Ser	Ser	Arg	Ile	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	50	55	60	
Leu	Glu	Gln	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Arg	Asp	Val	Ile	Lys	Gln	Leu	Leu	65	70	75	80
Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Gln	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp	Val	Gln	85	90	95	
Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	His	Ala	100	105	110	
Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Ile	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Phe	Leu	Val	115	120	125	
Gln	Met	Glu	Gly	Lys	Pro	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser	Ser	Lys	130	135	140	
Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys	Val	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr	Leu	Arg	145	150	155	160
Gln	Val	Gln	Lys	Pro	Thr	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu	Ile	165	170	175	
Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu	Lys	180	185	190	
Leu	Asp	Met	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val	Lys	195	200	205	
Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly	Ile	210	215	220	
Glu	Ile	Lys	Ala	Phe	Asp	Glu	Thr	Gly	Arg	Asp	Leu	Ala	Val	Thr	Phe	225	230	235	240
Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Gly	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Glu	Val	Arg	Val	245	250	255	
Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp	260	265	270	
Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val	Asp	275	280	285	
Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr	Lys	290	295	300	
Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys	Tyr	305	310	315	320
Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala	Gly	325	330	335	
Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr	Phe	340	345	350	
Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Ala	Met	Val	Val	355	360	365	
Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser											370			

<210> 9

<211> 1128

<212> ADN

<213> Babuino

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)...(1125)

<400> 9

atg caa aaa ctg caa ctc tgt gtt tat att tac ctg ttt atg ctg att	48
Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile	
1 5 10 15	
ggt gct ggt cca gtg gat cta aat gag aac agt gag caa aaa gaa aat	96
Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn	
20 25 30	
gtg gaa aaa gag ggg ctg tgt aat gca tgt act tgg aga caa aac act	144
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 aaa ata caa atc ctc agt aaa ctt	192
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 gct ata aga caa ctt	240
Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Ala Ile Arg Gln Leu	
65 70 75 80	
tta ccc aaa gcg cct cca ctc cgg gaa ctg att gat cag tat gat gtc	288
Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val	
85 90 95	
cag agg gat gac agc agc gat ggc tct ttg gaa gat gac gat tat cac	336
Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His	
100 105 110	
gct aca acg gaa aca atc att acc atg cct aca gag tct gat ttt tta	384
Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu	
115 120 125	
atg caa gtg gat gga aaa ccc aaa tgt tgc ttc ttt aaa ttt agc tct	432
Met Gln Val Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser	
130 135 140	
aaa ata caa tac aat aaa gtg gta aag gcc caa cta tgg ata tat ttg	480
Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu	
145 150 155 160	
aga ccc gtc gag act cct aca aca gtg ttt gtg caa atc ctg aga ctc	528

Arg	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Thr	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu		
				165					170					175			
atc	aaa	cct	atg	aaa	gac	ggc	aca	agg	tat	act	gga	atc	cga	tct	ctg	576	
Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu		
			180					185					190				
aaa	ctt	gac	atg	aac	cca	ggc	act	ggc	att	tgg	cag	agc	att	gat	gtg	624	
Lys	Leu	Asp	Met	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val		
			195				200					205					
aag	aca	gtg	ttg	caa	aat	tgg	ctc	aaa	caa	cct	gaa	tcc	aac	tta	ggc	672	
Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly		
	210					215					220						
att	gaa	ata	aaa	gct	tta	gat	gag	aat	ggc	cat	gat	ctt	gct	gta	acc	720	
Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Asp	Glu	Asn	Gly	His	Asp	Leu	Ala	Val	Thr		
225					230				235					240			
ttc	cca	gga	cca	gga	gaa	gat	ggg	ctg	aat	ccc	ttt	tta	gag	gtc	aag	768	
Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Gly	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Glu	Val	Lys		
				245				250						255			
gta	aca	gac	aca	ccc	aaa	aga	tcc	aga	agg	gat	ttt	ggc	ctt	gac	tgt	816	
Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys		
			260					265					270				
gat	gag	cac	tca	aca	gaa	tcg	cga	tgc	tgt	cgt	tac	cct	cta	act	gtg	864	
Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val		
		275					280					285					
gat	ttt	gaa	gct	ctt	gga	tgg	gat	tgg	att	atc	gct	cct	aaa	aga	tat	912	
Asp	Phe	Glu	Ala	Leu	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr		
	290					295					300						
aag	gcc	aat	tac	tgc	tct	gga	gag	tgt	gaa	ttt	gta	ttt	tta	caa	aaa	960	
Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys		
305					310				315						320		
tat	cct	cat	act	cat	ctg	gta	cac	caa	gca	aac	ccc	aga	ggc	tca	gca	1008	
Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala		
				325				330					335				
ggc	cct	tgc	tgt	act	ccc	aca	aag	atg	tct	cca	att	aat	atg	cta	tat	1056	
Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr		
			340					345					350				
ttt	aat	ggc	aaa	gaa	caa	ata	ata	tat	ggg	aaa	att	cca	gcc	atg	gta	1104	
Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Ala	Met	Val		
		355				360						365					
gta	gac	cgc	tgc	ggg	tgc	tca	tga									1128	
Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser											
	370					375											

<210> 10

<211> 375

<212> PRT

<213> Babuino

<400> 10

Met	Gln	Lys	Leu	Gln	Leu	Cys	Val	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Phe	Met	Leu	Ile
1				5					10					15	
Val	Ala	Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Asn	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Glu	Asn
			20					25					30		
Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Leu	Cys	Asn	Ala	Cys	Thr	Trp	Arg	Gln	Asn	Thr
		35					40					45			
Lys	Ser	Ser	Arg	Ile	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu
	50					55					60				
Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Arg	Gln	Leu
65					70					75					80
Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Arg	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		
Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Ile	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Phe	Leu
			115				120						125		
Met	Gln	Val	Asp	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
Arg	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Thr	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu
				165					170					175	
Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu
		180					185						190		
Lys	Leu	Asp	Met	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val
	195						200					205			
Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly
	210					215					220				
Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Asp	Glu	Asn	Gly	His	Asp	Leu	Ala	Val	Thr
225					230					235					240
Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Gly	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Glu	Val	Lys
				245					250					255	
Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys
			260					265					270		
Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val
	275						280					285			
Asp	Phe	Glu	Ala	Leu	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr
	290					295					300				
Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys
305					310					315					320
Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala
				325					330					335	
Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr
			340					345				350			
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> 11

<211> 1128

<212> ADN

<213> Bovino

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)...(1125)

<400> 11

atg	caa	aaa	ctg	caa	atc	tct	gtt	tat	att	tac	cta	ttt	atg	ctg	att	48
Met	Gln	Lys	Leu	Gln	Ile	Ser	Val	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Phe	Met	Leu	Ile	
1				5					10					15		
gtt	gct	ggc	cca	gtg	gat	ctg	aat	gag	aac	agc	gag	cag	aag	gaa	aat	96
Val	Ala	Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Asn	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Glu	Asn	
			20					25					30			
gtg	gaa	aaa	gag	ggg	ctg	tgt	aat	gca	tgt	ttg	tgg	agg	gaa	aac	act	144
Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Leu	Cys	Asn	Ala	Cys	Leu	Trp	Arg	Glu	Asn	Thr	
		35					40					45				
aca	tcg	tca	aga	cta	gaa	gcc	ata	aaa	atc	caa	atc	ctc	agt	aaa	ctt	192
Thr	Ser	Ser	Arg	Leu	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	
	50						55					60				
cgc	ctg	gaa	aca	gct	cct	aac	atc	agc	aaa	gat	gct	atc	aga	caa	ctt	240
Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Arg	Gln	Leu	
65					70					75					80	
ttg	ccc	aag	gct	cct	cca	ctc	ctg	gaa	ctg	att	gat	cag	ttc	gat	gtc	288
Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Leu	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Phe	Asp	Val	
				85					90					95		
cag	aga	gat	gcc	agc	agt	gac	ggc	tcc	ttg	gaa	gac	gat	gac	tac	cac	336
Gln	Arg	Asp	Ala	Ser	Ser	Asp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	His	
			100					105						110		
gcc	agg	acg	gaa	acg	gtc	att	acc	atg	ccc	acg	gag	tct	gat	ctt	cta	384
Ala	Arg	Thr	Glu	Thr	Val	Ile	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Leu	Leu	
		115					120					125				
acg	caa	gtg	gaa	gga	aaa	ccc	aaa	tgt	tgc	ttc	ttt	aaa	ttt	agc	tct	432
Thr	Gln	Val	Glu	Gly	Lys	Pro	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser	Ser	
	130					135					140					
aag	ata	caa	tac	aat	aaa	cta	gta	aag	gcc	caa	ctg	tgg	ata	tat	ctg	480
Lys	Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys	Leu	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr	Leu	
145					150					155					160	
agg	cct	gtc	aag	act	cct	gcg	aca	gtg	ttt	gtg	caa	atc	ctg	aga	ctc	528
Arg	Pro	Val	Lys	Thr	Pro	Ala	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu	
				165					170					175		
atc	aaa	ccc	atg	aaa	gac	ggt	aca	agg	tat	act	gga	atc	cga	tct	ctg	576
Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu	
			180					185					190			
aaa	ctt	gac	atg	aac	cca	ggc	act	ggt	att	tgg	cag	agc	att	gat	gtg	624
Lys	Leu	Asp	Met	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val	
		195				200						205				
aag	aca	gtg	ttg	cag	aac	tgg	ctc	aaa	caa	cct	gaa	tcc	aac	tta	ggc	672
Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly	
	210					215					220					
att	gaa	atc	aaa	gct	tta	gat	gag	aat	ggc	cat	gat	ctt	gct	gta	acc	720
Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Asp	Glu	Asn	Gly	His	Asp	Leu	Ala	Val	Thr	
225					230					235					240	

ttc cca gaa cca gga gaa gat gga ctg act ccc ttt tta gaa gtc aag	768
Phe Pro Glu Pro Gly Glu Asp Gly Leu Thr Pro Phe Leu Glu Val Lys	
245 250 255	
gta aca gac aca cca aaa aga tct agg aga gat ttt ggg ctt gat tgt	816
Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys	
260 265 270	
gat gaa cac tcc aca gaa tct cga tgc tgt cgt tac cct cta act gtg	864
Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val	
275 280 285	
gat ttt gaa gct ttt gga tgg gat tgg att att gca cct aaa aga tat	912
Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr	
290 295 300	
aag gcc aat tac tgc tct gga gaa tgt gaa ttt gta ttt ttg caa aag	960
Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys	
305 310 315 320	
tat cct cat acc cat ctt gtg cac caa gca aac ccc aga ggt tca gcc	1008
Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala	
325 330 335	
ggc ccc tgc tgt act cct aca aag atg tct cca att aat atg cta tat	1056
Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr	
340 345 350	
ttt aat ggc gaa gga caa ata ata tac ggg aag att cca gcc atg gta	1104
Phe Asn Gly Glu Gly Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val	
355 360 365	
gta gat cgc tgt ggg tgt tca tga	1128
Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser	
370 375	

<210> 12

<211> 375

<212> PRT

5 <213> Bovino

<400> 12

Met Gln Lys Leu Gln Ile Ser Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile
 1 5 10 15
 Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn
 20 25 30
 Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Leu Trp Arg Glu Asn Thr
 35 40 45
 Thr Ser Ser Arg Leu Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu
 50 55 60
 Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Ala Ile Arg Gln Leu
 65 70 75 80
 Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Leu Glu Leu Ile Asp Gln Phe Asp Val
 85 90 95
 Gln Arg Asp Ala Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His
 100 105 110
 Ala Arg Thr Glu Thr Val Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Leu Leu
 115 120 125

Thr Gln Val Glu Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Leu Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu
 145 150 155 160
 Arg Pro Val Lys Thr Pro Ala Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu
 165 170 175
 Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu
 180 185 190
 Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val
 195 200 205
 Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly
 210 215 220
 Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr
 225 230 235 240
 Phe Pro Glu Pro Gly Glu Asp Gly Leu Thr Pro Phe Leu Glu Val Lys
 245 250 255
 Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys
 260 265 270
 Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val
 275 280 285
 Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr
 290 295 300
 Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys
 305 310 315 320
 Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala
 325 330 335
 Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr
 340 345 350
 Phe Asn Gly Glu Gly Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val
 355 360 365
 Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 370 375

<210> 13

<211> 1128

<212> ADN

<213> Porcino

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)...(1125)

<400> 13

atg	caa	aaa	ctg	caa	atc	tat	gtt	tat	att	tac	ctg	ttt	atg	ctg	att	48
Met	Gln	Lys	Leu	Gln	Ile	Tyr	Val	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Phe	Met	Leu	Ile	
1				5					10					15		
gtt	gct	ggc	ccc	gtg	gat	ctg	aat	gag	aac	agc	gag	caa	aag	gaa	aat	96
Val	Ala	Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Asn	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Glu	Asn	
			20					25					30			
gtg	gaa	aaa	gag	ggg	ctg	tgt	aat	gca	tgt	atg	tgg	aga	caa	aac	act	144
Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Leu	Cys	Asn	Ala	Cys	Met	Trp	Arg	Gln	Asn	Thr	
		35					40					45				
aaa	tct	tca	aga	cta	gaa	gcc	ata	aaa	att	caa	atc	ctc	agt	aaa	ctt	192
Lys	Ser	Ser	Arg	Leu	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	
	50					55					60					
cgc	ctg	gaa	aca	gct	cct	aac	att	agc	aaa	gat	gct	ata	aga	caa	ctt	240

Arg 65	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro 70	Asn	Ile	Ser	Lys	Asp 75	Ala	Ile	Arg	Gln	Leu 80	
ttg	ccc	aaa	gct	cct	cca	ctc	cgg	gaa	ctg	att	gat	cag	tac	gat	gtc	288
Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Arg	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp	Val	
				85					90					95		
cag	aga	gat	gac	agc	agt	gat	ggc	tcc	ttg	gaa	gat	gat	gat	tat	cac	336
Gln	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	His	
			100					105						110		
gct	acg	acg	gaa	acg	atc	att	acc	atg	cct	aca	gag	tct	gat	ctt	cta	384
Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Ile	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Leu	Leu	
		115					120					125				
atg	caa	gtg	gaa	gga	aaa	ccc	aaa	tgc	tgc	ttc	ttt	aaa	ttt	agc	tct	432
Met	Gln	Val	Glu	Gly	Lys	Pro	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser	Ser	
	130					135					140					
aaa	ata	caa	tac	aat	aaa	gta	gta	aag	gcc	caa	ctg	tgg	ata	tat	ctg	480
Lys	Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys	Val	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr	Leu	
	145				150					155					160	
aga	ccc	gtc	aag	act	cct	aca	aca	gtg	ttt	gtg	caa	atc	ctg	aga	ctc	528
Arg	Pro	Val	Lys	Thr	Pro	Thr	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu	
				165					170					175		
atc	aaa	ccc	atg	aaa	gac	ggc	aca	agg	tat	act	gga	atc	cga	tct	ctg	576
Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu	
			180					185					190			
aaa	ctt	gac	atg	aac	cca	ggc	act	ggc	att	tgg	cag	agc	att	gat	gtg	624
Lys	Leu	Asp	Met	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val	
		195					200					205				
aag	aca	gtg	ttg	caa	aat	tgg	ctc	aaa	caa	cct	gaa	tcc	aac	tta	ggc	672
Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly	
	210					215						220				
att	gaa	atc	aaa	gct	tta	gat	gag	aat	ggc	cat	gat	ctt	gct	gta	acc	720
Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Asp	Glu	Asn	Gly	His	Asp	Leu	Ala	Val	Thr	
	225				230				235					240		
ttc	cca	gga	cca	gga	gaa	gat	ggg	ctg	aat	ccc	ttt	tta	gaa	gtc	aag	768
Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Gly	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Glu	Val	Lys	
				245					250					255		
gta	aca	gac	aca	cca	aaa	aga	tcc	agg	aga	gat	ttt	gga	ctc	gac	tgt	816
Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys	
			260					265					270			
gat	gag	cac	tca	aca	gaa	tct	cga	tgc	tgt	cgt	tac	cct	cta	act	gtg	864
Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val	
		275					280					285				
gat	ttt	gaa	gct	ttt	gga	tgg	gac	tgg	att	att	gca	ccc	aaa	aga	tat	912
Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr	
	290					295					300					
aag	gcc	aat	tac	tgc	tct	gga	gag	tgt	gaa	ttt	gta	ttt	tta	caa	aaa	960

Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys		
305					310					315					320		
tac	cct	cac	act	cat	ctt	gtg	cac	caa	gca	aac	ccc	aga	ggg	tca	gca		1008
Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala		
				325					330					335			
ggc	ccc	tgc	tgt	act	ccc	aca	aag	atg	tct	cca	atc	aat	atg	cta	tat		1056
Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr		
				340				345					350				
ttt	aat	ggc	aaa	gaa	caa	ata	ata	tat	ggg	aaa	att	cca	gcc	atg	gta		1104
Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Ala	Met	Val		
		355				360						365					
gta	gat	cgc	tgt	ggg	tgc	tca	tga										1128
Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser											
	370				375												

<210> 14

<211> 375

<212> PRT

5 <213> Porcino

<400> 14

Met	Gln	Lys	Leu	Gln	Ile	Tyr	Val	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Phe	Met	Leu	Ile
1				5					10					15	
Val	Ala	Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Asn	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Glu	Asn
			20					25					30		
Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Leu	Cys	Asn	Ala	Cys	Met	Trp	Arg	Gln	Asn	Thr
		35					40					45			
Lys	Ser	Ser	Arg	Leu	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu
	50					55					60				
Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Arg	Gln	Leu
65					70					75					80
Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Arg	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		
Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Ile	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Leu	Leu
		115					120					125			
Met	Gln	Val	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
Arg	Pro	Val	Lys	Thr	Pro	Thr	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu
			165					170						175	
Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu
			180					185					190		
Lys	Leu	Asp	Met	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val
		195				200						205			
Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly
	210					215					220				
Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Asp	Glu	Asn	Gly	His	Asp	Leu	Ala	Val	Thr
225				230						235					240
Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Gly	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Glu	Val	Lys
				245					250					255	
Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys
			260					265					270		

Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val
		275					280					285			
Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr
	290					295					300				
Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys
305					310					315					320
Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala
				325					330					335	
Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr
			340					345					350		
Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Aia	Met	Val
		355					360					365			
Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser									
	370					375									

<210> 15

<211> 1128

<212> ADN

<213> Ovino

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)...(1125)

<400> 15

atg	caa	aaa	ctg	caa	atc	ttt	gtt	tat	att	tac	cta	ttt	atg	ctg	ctt	48
Met	Gln	Lys	Leu	Gln	Ile	Phe	Val	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Phe	Met	Leu	Leu	
1				5					10					15		
gtt	gct	ggc	cca	gtg	gat	ctg	aat	gag	aac	agc	gag	cag	aag	gaa	aat	96
Val	Ala	Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Asn	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Glu	Asn	
			20					25					30			
gtg	gaa	aaa	aag	ggg	ctg	tgt	aat	gca	tgc	ttg	tgg	aga	caa	aac	aat	144
Val	Glu	Lys	Lys	Gly	Leu	Cys	Asn	Ala	Cys	Leu	Trp	Arg	Gln	Asn	Asn	
		35					40					45				
aaa	tcc	tca	aga	cta	gaa	gcc	ata	aaa	atc	caa	atc	ctc	agt	aag	ctt	192
Lys	Ser	Ser	Arg	Leu	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	
	50					55				60						
cgc	ctg	gaa	aca	gct	cct	aac	atc	agc	aaa	gat	gct	ata	aga	caa	ctt	240
Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Arg	Gln	Leu	
65					70				75						80	
ttg	ccc	aag	gct	cct	cca	ctc	cgg	gaa	ctg	att	gat	cag	tac	gat	gtc	288
Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Arg	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp	Val	
				85					90					95		
cag	aga	gat	gac	agc	agc	gac	ggc	tcc	ttg	gaa	gac	gat	gac	tac	cac	336
Gln	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	His	
			100					105					110			
gtt	acg	acg	gaa	acg	gtc	att	acc	atg	ccc	acg	gag	tct	gat	ctt	cta	384
Val	Thr	Thr	Glu	Thr	Val	Ile	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Leu	Leu	
		115					120					125				
gca	gaa	gtg	caa	gaa	aaa	ccc	aaa	tgt	tgc	ttc	ttt	aaa	ttt	agc	tct	432
Ala	Glu	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser	Ser	
	130					135					140					

aag ata caa cac aat aaa gta gta aag gcc caa ctg tgg ata tat ctg Lys Ile Gln His Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu 145 150 155 160	480
aga cct gtc aag act cct aca aca gtg ttt gtg caa atc ctg aga ctc Arg Pro Val Lys Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu 165 170 175	528
atc aaa ccc 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	576
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	624
aag aca gtg ttg caa aac 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	672
att gaa atc 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	720
ttc cca gaa cca gga gaa gaa gga ctg aat cct ttt tta gaa gtc aag Phe Pro Glu Pro Gly Glu Glu Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys 245 250 255	768
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
gat gag 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
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
aag gcc aat tac tgc tct gga gaa tgt gaa ttt tta ttt ttg caa aag Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Leu Phe Leu Gln Lys 305 310 315 320	960
tat cct cat acc cat ctt gtg cac caa gca aac ccc aaa ggt tca gcc Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Lys Gly Ser Ala 325 330 335	1008
ggc cct 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
ttt aat ggc aaa gaa caa ata ata tat ggg aag att cca ggc atg gta Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met Val 355 360 365	1104
gta gat cgc tgt ggg tgc tca tga Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser 370 375	1128

<211> 375

<212> PRT

<213> Ovino

<400> 16

Met	Gln	Lys	Leu	Gln	Ile	Phe	Val	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Phe	Met	Leu	Leu
1				5					10					15	
Val	Ala	Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Asn	Glu	Asn	Ser	Glu	Gln	Lys	Glu	Asn
			20					25					30		
Val	Glu	Lys	Lys	Gly	Leu	Cys	Asn	Ala	Cys	Leu	Trp	Arg	Gln	Asn	Asn
		35					40					45			
Lys	Ser	Ser	Arg	Leu	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu
	50					55					60				
Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Arg	Gln	Leu
65					70					75					80
Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Arg	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		
Val	Thr	Thr	Glu	Thr	Val	Ile	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Leu	Leu
		115					120						125		
Ala	Glu	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser	Ser
	130					135				140					
Lys	Ile	Gln	His	Asn	Lys	Val	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr	Leu
145					150					155					160
Arg	Pro	Val	Lys	Thr	Pro	Thr	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu
				165					170					175	
Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu
			180					185					190		
Lys	Leu	Asp	Met	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val
		195					200					205			
Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly
	210					215					220				
Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Asp	Glu	Asn	Gly	His	Asp	Leu	Ala	Val	Thr
225					230					235					240
Phe	Pro	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Glu	Val	Lys
				245					250					255	
Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys
			260					265					270		
Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val
		275					280					285			
Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr
	290					295					300				
Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Leu	Phe	Leu	Gln	Lys
305					310					315					320
Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Lys	Gly	Ser	Ala
				325					330					335	
Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr
			340					345					350		
Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Gly	Met	Val
		355					360						365		
Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser									
	370					375									

<210> 17

<211> 1128

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1125)

5 <400> 17

atg	caa	aag	cta	gca	gtc	tat	gtt	tat	att	tac	ctg	ttc	atg	cag	att	48
Met	Gln	Lys	Leu	Ala	Val	Tyr	Val	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Phe	Met	Gln	Ile	
1				5					10					15		
tta	gtt	cat	ccg	gtg	gct	ctt	gat	ggc	agt	agt	cag	ccc	aca	gag	aac	96
Leu	Val	His	Pro	Val	Ala	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Gln	Pro	Thr	Glu	Asn	
			20					25					30			
gct	gaa	aaa	gac	gga	ctg	tgc	aat	gct	tgc	acg	tgg	aga	cag	aat	act	144
Ala	Glu	Lys	Asp	Gly	Leu	Cys	Asn	Ala	Cys	Thr	Trp	Arg	Gln	Asn	Thr	
		35					40					45				
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					
cgc	ctg	gaa	caa	gca	cct	aac	att	agc	agg	gac	gtt	att	aaa	caa	ctt	240
Arg	Leu	Glu	Gln	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Arg	Asp	Val	Ile	Lys	Gln	Leu	
65					70					75					80	
tta	ccc	aaa	gct	cct	ccg	ctg	cag	gaa	ctg	att	gat	cag	tat	gac	gtc	288
Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Gln	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp	Val	
				85					90					95		
cag	aga	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			
gcc	aca	acc	gaa	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				
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	
	130					135					140					
aaa	ata	caa	tat	aac	aaa	gta	gta	aag	gca	caa	tta	tgg	ata	tac	ttg	480
Lys	Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys	Val	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr	Leu	
145					150					155					160	
agg	caa	gtc	caa	aaa	cct	aca	acg	gtg	ttt	gtg	cag	atc	ctg	aga	ctc	528
Arg	Gln	Val	Gln	Lys	Pro	Thr	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu	
				165					170				175			
att	aaa	ccc	atg	aaa	gac	ggg	aca	aga	tat	act	gga	att	cga	tct	ttg	576
Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu	
			180					185					190			
aaa	ctt	gac	atg	aac	cca	ggc	act	ggg	atc	tgg	cag	agt	att	gat	gtg	624
Lys	Leu	Asp	Met	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val	
		195					200					205				
aag	aca	gtg	ttg	caa	aat	tgg	ctc	aaa	cag	cct	gaa	tcc	aat	tta	ggc	672

Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly	
210 215 220	
atc gaa ata aaa gct ttt gat gag aat gga cga gat ctt gct gta aca	720
Ile Glu Ile Lys Ala Phe Asp Glu Asn Gly Arg Asp Leu Ala Val Thr	
225 230 235 240	
ttc cca gga cca ggt gaa gat gga ctg aac cca ttt tta gag gtc aga	768
Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Arg	
245 250 255	
gtt aca gac aca cca aaa cgg tcc cgc aga gat ttt ggc ctt gac tgc	816
Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys	
260 265 270	
gac gag cac tca acg gaa tct cga tgt tgt cgc tac ccg ctg aca gtg	864
Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val	
275 280 285	
gat ttt gaa gct ttt gga tgg gac tgg att ata gca cct aaa aga tac	912
Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr	
290 295 300	
aaa gcc aat tac tgc tct gga gaa tgt gaa ttc gta ttt cta cag aaa	960
Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys	
305 310 315 320	
tac ccg cac act cac ctg gta cac caa gca aat cca aga ggc tca gca	1008
Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala	
325 330 335	
ggc cct tgc tgc aca ccc acc aag atg tcc cct ata aac atg ctg tat	1056
Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr	
340 345 350	
ttc aat gga aaa gaa caa ata ata tat gga aag ata cca gcc atg gtt	1104
Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val	
355 360 365	
gta gat cgt tgc ggg tgc tca tga	1128
Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser	
370 375	

<210> 18

<211> 375

<212> PRT

5 <213> Meleagris gallopavo

<400> 18

Met 1	Gln	Lys	Leu	Ala 5	Val	Tyr	Val	Tyr	Ile 10	Tyr	Leu	Phe	Met	Gln	Ile 15
Leu	Val	His	Pro	Val	Ala	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Gln	Pro	Thr	Glu	Asn
Ala	Glu	Lys	Asp	Gly	Leu	Cys	Asn	Ala	Cys	Thr	Trp	Arg	Gln	Asn	Thr
Lys	Ser	Ser	Arg	Ile	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu
Arg	Leu	Glu	Gln	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Arg	Asp	Val	Ile	Lys	Gln	Leu
65					70					75					80
Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Gln	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp	Val
Gln	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	His
Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Ile	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Phe	Leu
Val	Gln	Met	Glu	Gly	Lys	Pro	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser	Ser
Lys	Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys	Val	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr	Leu
Arg	Gln	Val	Gln	Lys	Pro	Thr	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu
Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu
Lys	Leu	Asp	Met	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val
Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly
Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Phe	Asp	Glu	Asn	Gly	Arg	Asp	Leu	Ala	Val	Thr
Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Gly	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Glu	Val	Arg
Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys
Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val
Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr
Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys
Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala
Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr
Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Ala	Met	Val
Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser									

<210> 19

<211> 1125

<212> ADN

<213> Danio rerio

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)...(1122)

<400> 19

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	
20 25 30	
gcc acg gag gaa agc gag ctg tgt tcc aca tgt gag ttc aga caa cac	144
Ala Thr Glu Glu Ser Glu Leu Cys Ser Thr Cys Glu Phe Arg Gln His	
35 40 45	

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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
tca gag ggc cca aaa cga atc ccg 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
gag aat tcc tca gag tct cgc tgc tgc agg tac cct ctc act gtg gac Glu Asn Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp 275 280 285	864

ttc gag gac ttt ggc tgg gac tgg att att gct cca aaa cgc tat aag	912
Phe Glu Asp Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys	
290 295 300	
gcg aat tac tgt tca gga gaa tgc gac tac atg tac ctg cag aag tat	960
Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Asp Tyr Met Tyr Leu Gln Lys Tyr	
305 310 315 320	
ccc cac acc cat ctg gtg aac aag gcc agt ccg aga gga acg gct ggg	1008
Pro His Thr His Leu Val Asn Lys Ala Ser Pro Arg Gly Thr Ala Gly	
325 330 335	
ccc tgc tgc act ccc acc aag atg tct ccc atc aac atg ctt tac ttt	1056
Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe	
340 345 350	
aac ggc aaa gag cag atc atc tac ggc aag atc cct tcg atg gta gta	1104
Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ser Met Val Val	
355 360 365	
gac cgc tgt ggc tgc tca tga	1125
Asp Arg Cys Gly Cys Ser	
370	

<210> 20

<211> 374

<212> PRT

5 <213> Danio rerio

<400> 20

Met	His	Phe	Thr	Gln	Val	Leu	Ile	Ser	Leu	Ser	Val	Leu	Ile	Ala	Cys
1				5					10					15	
Gly	Pro	Val	Gly	Tyr	Gly	Asp	Ile	Thr	Ala	His	Gln	Gln	Pro	Ser	Thr
			20					25					30		
Ala	Thr	Glu	Glu	Ser	Glu	Leu	Cys	Ser	Thr	Cys	Glu	Phe	Arg	Gln	His
		35					40					45			
Ser	Lys	Leu	Met	Arg	Leu	His	Ala	Ile	Lys	Ser	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys
	50					55					60				
Leu	Arg	Leu	Lys	Gln	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Arg	Asp	Val	Val	Lys	Gln
65					70					75					80
Leu	Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Gln	Gln	Leu	Leu	Asp	Gln	Tyr	Asp
				85					90					95	
Val	Leu	Gly	Asp	Asp	Ser	Lys	Asp	Gly	Ala	Val	Glu	Glu	Asp	Asp	Glu
			100					105						110	
His	Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Met	Thr	Met	Ala	Thr	Glu	Pro	Asp	Pro
		115					120					125			
Ile	Val	Gln	Val	Asp	Arg	Lys	Pro	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Ser	Phe	Ser
	130					135					140				
Pro	Lys	Ile	Gln	Ala	Asn	Arg	Ile	Val	Arg	Ala	Gln	Leu	Trp	Val	His
145					150					155					160
Leu	Arg	Pro	Ala	Glu	Ala	Thr	Thr	Val	Phe	Leu	Gln	Ile	Ser	Arg	
				165				170						175	
Leu	Met	Pro	Val	Lys	Asp	Gly	Gly	Arg	His	Arg	Ile	Arg	Ser	Leu	Lys
		180						185					190		
Ile	Asp	Val	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Ser	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val	Lys
	195						200					205			
Gln	Val	Leu	Thr	Val	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Thr	Asn	Arg	Gly	Ile
	210					215						220			
Glu	Ile	Asn	Ala	Tyr	Asp	Ala	Lys	Gly	Asn	Asp	Leu	Ala	Val	Thr	Ser
225					230					235					240
Thr	Glu	Thr	Gly	Glu	Asp	Gly	Leu	Leu	Pro	Phe	Met	Glu	Val	Lys	Ile
			245						250					255	
Ser	Glu	Gly	Pro	Lys	Arg	Ile	Arg	Arg	Asp	Ser	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp
			260					265					270		
Glu	Asn	Ser	Ser	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val	Asp
		275					280					285			
Phe	Glu	Asp	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr	Lys
	290					295				300					
Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Asp	Tyr	Met	Tyr	Leu	Gln	Lys	Tyr
305					310					315					320
Pro	His	Thr	His	Leu	Val	Asn	Lys	Ala	Ser	Pro	Arg	Gly	Thr	Ala	Gly
				325					330					335	
Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr	Phe
			340					345					350		
Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Ser	Met	Val	Val
		355					360					365			
Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser										
															370

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sitio de escisión proteolítica

5 <221> variante

<222> (0) ... (0)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 21

Arg Xaa Xaa Arg
1

10 <210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Eucariotas

<220>

15 <221> SITIO

<222> (0) ... (0)

<223> Sitio de escisión proteolítica

<400> 22

Arg Ser Arg Arg
1

20 <210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Eucariotas

<220>

25 <221> SITE

<222> (0) ... (0)

<223> Sitio de escisión proteolítica

<400> 23

Arg Ile Arg Arg
1

30 <210> 24

<211> 1393

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (54) ... (1274)

<223> GDF-11

5 <400> 24

```

ccgcgggact ccggcggtccc cgccccccag tctctccctcc cctcccccctc agc atg      56
                                     Met
                                     1

gtg ctc gcg gcc ccg ctg ctg ctg ggc ttc ctg ctc ctc gcc ctg gag      104
Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Leu Gly Phe Leu Leu Leu Ala Leu Glu
      5                      10                      15

ctg cgg ccc cgg ggg gag gcg gcc gag ggc ccc gcg gcg gcg gcg gcg      152
Leu Arg Pro Arg Gly Glu Ala Ala Glu Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala
      20                      25                      30

gcg gcg gcg gcg gcg gca gcg gcg ggg gtc ggg ggg gag cgc tcc agc      200
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Val Gly Gly Glu Arg Ser Ser
      35                      40                      45

cgg cca gcc ccg tcc gtg gcg ccc gag ccg gac ggc tgc ccc gtg tgc      248
Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala Pro Glu Pro Asp Gly Cys Pro Val Cys
      50                      55                      60                      65

gtt tgg cgg cag cac agc cgc gag ctg cgc cta gag agc atc aag tcg      296
Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu Glu Ser Ile Lys Ser
      70                      75                      80

cag atc ttg agc aaa ctg cgg ctc aag gag gcg ccc aac atc agc cgc      344
Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Glu Ala Pro Asn Ile Ser Arg
      85                      90                      95

gag gtg gtg aag cag ctg ctg ccc aag gcg ccg ccg ctg cag cag atc      392
Glu Val Val Lys Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Gln Gln Ile
      100                      105                      110

ctg gac cta cac gac ttc cag ggc gac gcg ctg cag ccc gag gac ttc      440
Leu Asp Leu His Asp Phe Gln Gly Asp Ala Leu Gln Pro Glu Asp Phe
      115                      120                      125

ctg gag gag gac gag tac cac gcc acc acc gag acc gtc att agc atg      488
Leu Glu Glu Asp Glu Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Val Ile Ser Met
      130                      135                      140                      145

gcc cag gag acg gac cca gca gta cag aca gat ggc agc cct ctc tgc      536
Ala Gln Glu Thr Asp Pro Ala Val Gln Thr Asp Gly Ser Pro Leu Cys
      150                      155                      160

```

tgc cat ttt cac ttc agc ccc aag gtg atg ttc aca aag gta ctg aag Cys His Phe His Phe Ser Pro Lys Val Met Phe Thr Lys Val Leu Lys 165 170 175	584
gcc cag ctg tgg gtg tac cta cgg cct gta ccc cgc cca gcc aca gtc Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu Arg Pro Val Pro Arg Pro Ala Thr Val 180 185 190	632
tac ctg cag atc ttg cga cta aaa ccc cta act ggg gaa ggg acc gca Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu Lys Pro Leu Thr Gly Glu Gly Thr Ala 195 200 205	680
ggg gga ggg ggc gga ggc cgg cgt cac atc cgt atc cgc tca ctg aag Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg His Ile Arg Ile Arg Ser Leu Lys 210 215 220 225	728
att gag ctg cac tca cgc tca ggc cat tgg cag agc atc gac ttc aag Ile Glu Leu His Ser Arg Ser Gly His Trp Gln Ser Ile Asp Phe Lys 230 235 240	776
caa gtg cta cac agc tgg ttc cgc cag cca cag agc aac tgg ggc atc Gln Val Leu His Ser Trp Phe Arg Gln Pro Gln Ser Asn Trp Gly Ile 245 250 255	824
gag atc aac gcc ttt gat ccc agt ggc aca gac ctg gct gtc acc tcc Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro Ser Gly Thr Asp Leu Ala Val Thr Ser 260 265 270	872
ctg ggg ccg gga gcc gag ggg ctg cat cca ttc atg gag ctt cga gtc Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly Leu His Pro Phe Met Glu Leu Arg Val 275 280 285	920
cta gag aac aca aaa cgt tcc cgg cgg aac ctg ggt ctg gac tgc gac Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp 290 295 300 305	968
gag cac tca agc gag tcc cgc tgc tgc cga tat ccc ctc aca gtg gac Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp 310 315 320	1016
ttt gag gct ttc ggc tgg gac tgg atc atc gca cct aag cgc tac aag Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys 325 330 335	1064
gcc aac tac tgc tcc ggc cag tgc gag tac atg ttc atg caa aaa tat Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr 340 345 350	1112
ccg cat acc cat ttg gtg cag cag gcc aat cca aga ggc tct gct ggg Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly 355 360 365	1160
ccc tgt tgt acc ccc acc aag atg tcc cca atc aac atg ctc tac ttc Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe 370 375 380 385	1208
aat gac aag cag cag att atc tac ggc aag atc cct ggc atg gtg gtg Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met Val Val 390 395 400	1256

gat cgc tgt ggc tgc tct taagtgggtc actacaagct gctggagcaa 1304
 Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 405

agacttggtg ggtgggtaac ttaacctctt cacagaggat aaaaaatgct tgtgagtatg 1364
 acagaaggga ataaacaggc ttaaagggt 1393

<210> 25

<211> 407

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 25

Met	Val	Leu	Ala	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu
1				5					10					15	
Glu	Leu	Arg	Pro	Arg	Gly	Glu	Ala	Ala	Glu	Gly	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala
			20					25					30		
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Gly	Gly	Glu	Arg	Ser
		35				40						45			
Ser	Arg	Pro	Ala	Pro	Ser	Val	Ala	Pro	Glu	Pro	Asp	Gly	Cys	Pro	Val
	50					55					60				
Cys	Val	Trp	Arg	Gln	His	Ser	Arg	Glu	Leu	Arg	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys
65					70					75					80
Ser	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	Leu	Lys	Glu	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser
				85					90					95	
Arg	Glu	Val	Val	Lys	Gln	Leu	Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Gln	Gln
			100					105					110		
Ile	Leu	Asp	Leu	His	Asp	Phe	Gln	Gly	Asp	Ala	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp
		115					120					125			
Phe	Leu	Glu	Glu	Asp	Glu	Tyr	His	Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Val	Ile	Ser
	130					135					140				
Met	Ala	Gln	Glu	Thr	Asp	Pro	Ala	Val	Gln	Thr	Asp	Gly	Ser	Pro	Leu
145					150					155					160
Cys	Cys	His	Phe	His	Phe	Ser	Pro	Lys	Val	Met	Phe	Thr	Lys	Val	Leu
				165					170					175	
Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Val	Tyr	Leu	Arg	Pro	Val	Pro	Arg	Pro	Ala	Thr
			180					185					190		
Val	Tyr	Leu	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu	Lys	Pro	Leu	Thr	Gly	Glu	Gly	Thr
		195					200					205			
Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Arg	His	Ile	Arg	Ile	Arg	Ser	Leu
	210					215					220				
Lys	Ile	Glu	Leu	His	Ser	Arg	Ser	Gly	His	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Phe
225					230					235				240	
Lys	Gln	Val	Leu	His	Ser	Trp	Phe	Arg	Gln	Pro	Gln	Ser	Asn	Trp	Gly
				245					250					255	
Ile	Glu	Ile	Asn	Ala	Phe	Asp	Pro	Ser	Gly	Thr	Asp	Leu	Ala	Val	Thr
			260					265					270		
Ser	Leu	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Gly	Leu	His	Pro	Phe	Met	Glu	Leu	Arg
		275					280					285			
Val	Leu	Glu	Asn	Thr	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asn	Leu	Gly	Leu	Asp	Cys
	290					295					300				
Asp	Glu	His	Ser	Ser	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val
305					310					315					320
Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr
				325					330					335	
Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	G									

<210> 26

<211> 476

<212> ADN

<213> Salmón-1

5 <220>

<221> CDS

<222> (3) ... (473)

<400> 26

gg cag ccg gag acg aat tgg ggg atc gag att aat gcg ttc gac tcg	47
Gln Pro Glu Thr Asn Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Ser	
1 5 10 15	
aag gga aat gat ctg gcc gtt acc tca gca gaa gcg gga gaa gga ctg	95
Lys Gly Asn Asp Leu Ala Val Thr Ser Ala Glu Ala Gly Glu Gly Leu	
20 25 30	
caa ccc ttc atg gag gtg acg att tca gag ggc ccg aag cgc tcc agg	143
Gln Pro Phe Met Glu Val Thr Ile Ser Glu Gly Pro Lys Arg Ser Arg	
35 40 45	
aga gac tcg ggc ctg gac tgt gac gag aac tcc ccc gag tcc cgc tgt	191
Arg Asp Ser Gly Leu Asp Cys Asp Glu Asn Ser Pro Glu Ser Arg Cys	
50 55 60	
tgc cgc tac ccc ctc acg gta gac ttt gaa gac ttt ggc tgg gac tgg	239
Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Asp Phe Gly Trp Asp Trp	
65 70 75	
att att gcc ccc aag cgc tac aag gcc aac tac tgc tct ggt gag tgt	287
Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys	
80 85 90 95	
gag tac atg cac ctg cag aag tac ccc cac acc cac ctg gtg aac aag	335
Glu Tyr Met His Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Asn Lys	
100 105 110	
gct aac cct cgc ggc acc gca ggg ccc tgc tgc acc ccc acc aag atg	383
Ala Asn Pro Arg Gly Thr Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met	
115 120 125	
tcc ccc atc aac atg ctc tac ttc aac cgc aaa gag cag atc atc tac	431
Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Arg Lys Glu Gln Ile Ile Tyr	
130 135 140	
ggc aag atc ccc tcc atg gtg gtg gac cgt tgc gga tgc tcg	473
Gly Lys Ile Pro Ser Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser	
145 150 155	
tga	476

10 <210> 27

<211> 157

<212> PRT

<213> Salmón-1

<400> 27

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

<210> 28

5 <211> 412

<212> ADN

<213> Salmón-2

<220>

<221> CDS

10 <222> (2) ... (409)

<400> 28

```

g gtt acc tca act gaa gcc gga gaa gga ctg caa ccc ttc atg gag gtg      49
Val Thr Ser Thr Glu Ala Gly Glu Gly Leu Gln Pro Phe Met Glu Val
  1              5              10              15

aag att tcg gag ggc ccg aag cgc tcc agg aga gat tcg ggc ctg gac      97
Lys Ile Ser Glu Gly Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Ser Gly Leu Asp
              20              25              30

tgt gat gag aac tcc ccc gag tcc cgc tgc tgc cgg tac ccc ctc acg      145
Cys Asp Glu Asn Ser Pro Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr
              35              40              45

gtg gac ttt gaa gac ttt ggc tgg gac tgg att att gcc ccc aag cgc      193
Val Asp Phe Glu Asp Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg
              50              55              60

tac aag gcc aac tac tgc tct ggt gag tgc gag tac atg cac ctg cag      241
Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Tyr Met His Leu Gln
              65              70              75              80

aag tac ccc cac acc cac ctg gtg aac aag gct aac cct cgc ggc acc      289
Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Asn Lys Ala Asn Pro Arg Gly Thr
              85              90              95

gcg ggg ccc tgc tgc acc ccc acc aag atg tcc ccc atc aac atg ctc      337

Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu
              100              105              110

tac ttc aac cgc aaa gag cag atc atc tac ggc aag atc ccc tcc atg      385
Tyr Phe Asn Arg Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ser Met
              115              120              125

gtg gtg gac cgc tgc ggc tgc tcg tga      412
Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
              130              135

```

<210> 29

<211> 136

5 <212> PRT

<213> Salmón-2

<400> 29

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* de reducción o inhibición del efecto de miostatina sobre una célula, que comprende poner en contacto la célula con un prodominio de miostatina que afecta a la transducción de la señal de miostatina en la célula mediante alteración de una interacción específica de miostatina con un receptor de miostatina expresado por la célula, en el que el prodominio de miostatina
 - (a) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 10;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 12;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 18;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 14; y
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 16, o
 - (b) consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:
 - restos de aminoácidos 20 a 263 como se expone en la SEC ID N°: 4;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 2;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 8;
 - restos de aminoácidos 20 a 263 como se expone en la SEC ID N°: 6; y
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 20.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el receptor de miostatina es un receptor de activina.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el receptor de activina es un receptor de activina de tipo IIB.
4. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la célula está comprendida en tejido muscular.
5. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la célula es una célula de un organismo eucariótico.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el organismo eucariótico es un organismo vertebrado.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el organismo vertebrado se selecciona entre el grupo constituido por un organismo bovino, ovino, porcino, canino, felino, murino, e ictícola.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el organismo eucariótico es un organismo invertebrado.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el organismo invertebrado es un molusco.
10. Un agente constituido por un prodominio de miostatina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:
 - restos de aminoácidos 20 a 263 como se expone en la SEC ID N°: 4;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 2;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 10;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 12;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 8;
 - restos de aminoácidos 20 a 263 como se expone en la SEC ID N°: 6;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 18;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 14;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 16; y
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 20 para incrementar el crecimiento de tejido muscular en un sujeto,
 inhibiendo o reduciendo el agente la transducción de la señal de miostatina en una célula muscular, y en el que el agente para mejorar la gravedad de una afección patológica **caracterizada**, al menos en parte, por una cantidad, desarrollo o actividad metabólica anormal de músculo o tejido adiposo en un sujeto y seleccionada entre el grupo constituido por caquexia, anorexia, distrofia muscular y una enfermedad neuromuscular.
11. El uso de un agente constituido por un prodominio de miostatina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:
 - restos de aminoácidos 20 a 263 como se expone en la SEC ID N°: 4;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 2;
 - restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 10;

- restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 12;
 restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 8;
 restos de aminoácidos 20 a 263 como se expone en la SEC ID N°: 6;
 restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 18;
 5 restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 14;
 restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 16; y
 restos de aminoácidos 20 a 262 como se expone en la SEC ID N°: 20 en la fabricación de un medicamento para
 inhibir o reducir el crecimiento de tejido muscular en un sujeto,
 en el que el agente inhibe o reduce la transducción de la señal de miostatina en una célula muscular, y
 10 en el que el agente es para mejorar la gravedad de una afección patológica **caracterizada**, al menos en parte, por
 una cantidad, desarrollo o actividad metabólica anormal de músculo o tejido adiposo en un sujeto y seleccionada
 entre el grupo constituido por caquexia, anorexia, distrofia muscular y una enfermedad neuromuscular.

15

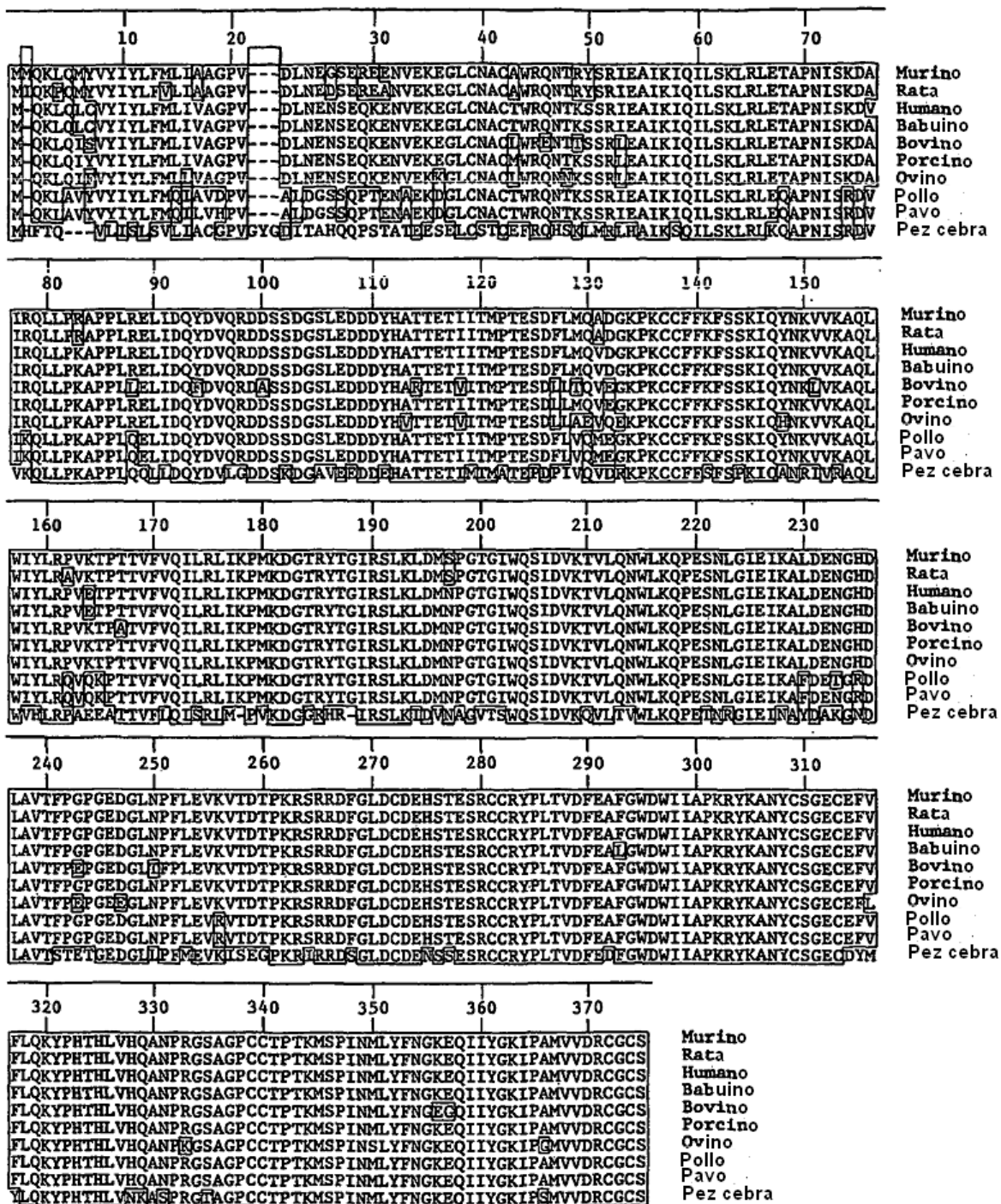


FIG. 1

	10	20	30	
	M M Q K L Q M Y V Y I Y L F M L I A A G P V D L N E G S E R			murino.
	M H F T Q - - - V L I S L S V L I A C G P V G Y G D I T A H			pez cebra
	- -			salmon1
	- -			salmon2
	40	50	60	
31	E E - - - N V E K E G L C N A C A W R Q N T R Y S R I E A I			murino.
28	Q Q P S T A T E E E S E L C S T C E F R Q H S K L M R L H A I			pez cebra
1	- -			salmon1
1	- -			salmon2
	70	80	90	
58	K I Q I L S K L R L E T A P N I S K D A I R Q L L P R A P P			murino.
58	K S Q I L S K L R L K Q A P N I S R D V V K Q L L P K A P P			pez cebra
1	- -			salmon1
1	- -			salmon2
	100	110	120	
88	L R E L I D Q Y D V Q R D D S S D G S L E D D D Y H A T T E			murino.
88	L Q Q L L D Q Y D V L G D D S K D G A V E E D D E H A T T E			pez cebra
1	- -			salmon1
1	- -			salmon2
	130	140	150	
118	T I I T M P T E S D F L M Q A D G K P K C C F F K F S S K I			murino.
118	T I M T M A T E P D P I V Q V D R K P K C C F F S F S P K I			pez cebra
1	- -			salmon1
1	- -			salmon2
	160	170	180	
148	Q Y N K V V K A Q L W I Y L R P V K T P T T V F V Q I L R L			murino.
148	Q A N R I V R A Q L W V H L R P A E E A T T V F L Q I S R L			pez cebra
1	- -			salmon1
1	- -			salmon2
	190	200	210	
178	I K P M K D G T R Y T G I R S L K L D M S P G T G I W Q S I			murino.
178	M - P V K D G G R H R - I R S L K I D V N A G V T S W Q S I			pez cebra
1	- -			salmon1
1	- -			salmon2
	220	230	240	
208	D V K T V L Q N W L K Q P E S N L G I E I K A L D E N G H D			murino.
206	D V K Q V L T V W L K Q P E T N R G I E I N A Y D A K G N D			pez cebra
1	- -			salmon1
1	- -			salmon2

FIG. 2

		250	260	270	
238	L A V T F P G P G E D G L N P F L E V K V T D T P K R S R R				murino.
236	L A V T S T E T G E D G L L F F M E V K I S E G P K R I R R				pez cebra
20	L A V T S A E A G E - G L Q P F M E V T I S E G P K R S R R				salmon1
1	- - V T S T E A G E - G L Q P F M E V K I S E G P K R S R R				salmon2
		280	290	300	
268	D F G L D C D E H S T E S R C C R Y P L T V D F E A F G W D				murino.
266	D S G L D C D E N S S E S R C C R Y P L T V D F E D F G W D				pez cebra
49	D S G L D C D E N S P E S R C C R Y P L T V D F E D F G W D				salmon1
28	D S G L D C D E N S P E S R C C R Y P L T V D F E D F G W D				salmon2
		310	320	330	
298	W I I A P K R Y K A N Y C S G E C E F V F L Q K Y P H T H L				murino.
296	W I I A P K R Y K A N Y C S G E C D Y M Y L Q K Y P H T H L				pez cebra
79	W I I A P K R Y K A N Y C S G E C E Y M H L Q K Y P H T H L				salmon1
58	W I I A P K R Y K A N Y C S G E C E Y M H L Q K Y P H T H L				salmon2
		340	350	360	
328	V H Q A N P R G S A G P C C T P T K M S P I N M L Y F N G K				murino.
326	V N K A S P R G T A G P C C T P T K M S P I N M L Y F N G K				pez cebra
109	V N K A N P R G T A G P C C T P T K M S P I N M L Y F N R K				salmon1
88	V N K A N P R G T A G P C C T P T K M S P I N M L Y F N R K				salmon2
		370			
358	E Q I I Y G K I P A M V V D R C G C S				murino.
356	E Q I I Y G K I P S M V V D R C G C S				pez cebra
139	E Q I I Y G K I P S M V V D R C G C S				salmon1
118	E Q I I Y G K I P S M V V D R C G C S				salmon2

FIG. 2 (cont.)