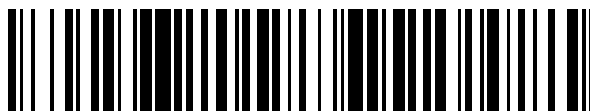


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 410**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.1999** **E 08018446 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014** **EP 2018871**

54 Título: **Inmunoconjugados de miostatina para el tratamiento de atrofia muscular progresiva**

30 Prioridad:

19.02.1998 US 75213 P

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

23.01.2015

73 Titular/es:

SCIDERA, INC. (100.0%)

P.O. Box 36000

Canton, OH 44735, US

72 Inventor/es:

BARKER, CHRISTOPHER A. y

MORSEY, MOHAMAD

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 527 410 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoconjugados de miostatina para el tratamiento de atrofia muscular progresiva

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere en general a composiciones para aumentar la síntesis de músculo y tratar una enfermedad en sujetos vertebrados. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones inmunológicas para reducir la actividad de miostatina en sujetos vertebrados.

10

Antecedentes de la invención

Los ganaderos han usado tradicionalmente programas de cría para seleccionar los animales que producen cantidades máximas de proteína con rendimiento aceptable según se mide mediante la eficiencia alimenticia, función reproductora y salud general. Se ha observado ganado que presenta un aumento de la masa muscular debido tanto a hipertrofia como a hiperplasia de células musculares en varias razas. La incidencia más pronunciada de este estado, que se denomina doble musculatura, se da en el ganado belga azul. La masa muscular aumenta en aproximadamente el 20% con una disminución en la masa ósea y adiposa en estos animales (Shahin y Berg, Can. J. Anim. Sci. (1985) 65:279-293). El ganado belga azul también utiliza el pienso de manera eficiente y da lugar a un mayor porcentaje de cortes de carne deseables (Casas *et al.*, J. Anim. Sci. (1997) 75 (Supp 1) :149). La doble musculación en el ganado belga azul se hereda y se cree que es recesiva puesto que los heterocigotos pueden ser normales o tener sólo un aumento moderado de la masa muscular.

20

A pesar de las ventajas de este estado, el ganado con doble musculación tiene a menudo rasgos no deseables. Por ejemplo, debido a que los terneros son generalmente un 10-38% más pesados de lo normal, son prevalentes las distocias, requiriendo partos por cesárea. Los animales también presentan una reproducción anómala debido a los aparatos reproductores escasamente desarrollados y tienen otras anomalías anatómicas tales como macroglosia. Otras razas de ganado, tales como la piamontesa del norte de Italia, tienen grados variables de doble musculatura y también muestran muchos de estos rasgos no deseables.

30

La característica de doble musculatura identificada en algunas razas de ganado se ha asociado ahora con mutaciones en el gen de la miostatina (Grobet *et al.*, Nature Genetics (1997) 17:71-74; Kambadur *et al.*, Genome Research (1997) 7:910-915; McPherron y Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:12457-12461). Esta mutación parece dar como resultado principalmente un aumento del número de células musculares (hiperplasia) más que un aumento del tamaño de de las fibras musculares individuales (hipertrofia). También se ha identificado un estado denominado hipertrofia muscular en la raza porcina Pietrain. Este estado no está relacionado con el gen de la miostatina y se ha identificado como mutación en un gen responsable del transporte de calcio.

35

McPherron *et al.*, Nature (1997) 387:83-90, han identificado un miembro de la superfamilia de proteínas del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) en ratones, denominado factor de crecimiento/diferenciación-8 (GDF-8). GDF-8 actúa como regulador negativo para el crecimiento de músculo esquelético y se expresa en músculos esqueléticos en desarrollo y de adultos. Los experimentos de desactivación génica en ratones han dado como resultado mutantes homocigotos que son un 30% más grandes que los ratones de tipo natural. Este aumento de tamaño se debe principalmente a un aumento de la masa muscular, pesando los músculos individuales de los mutantes 2-3 veces más que los de los ratones de tipo natural (McPherron *et al.*, Nature (1997) 387:83-90). McPherron y Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:12457-12461 y Grobet *et al.*, Nature Genetics (1997) 17:71-74 evaluaron secuencias genómicas similares en varias especies, incluyendo ganado, y notificaron que el ganado con doble musculación tenía defectos en el gen que codifica para una proteína sumamente homóloga a GDF-8. Esta proteína se denomina ahora miostatina.

45

50

Por tanto, parece que la miostatina la producen las células musculares y regula la proliferación y diferenciación de mioblastos. En el ganado belga azul y piamontés, se cree que defectos naturales en el gen dan como resultado o bien la producción de una proteína anómala o bien una cantidad reducida de miostatina, teniendo cualquiera de ellas el efecto de aumentar el crecimiento de músculo.

55

Se ha identificado el gen de la miostatina de varias especies de vertebrados, incluyendo ratón, rata, ser humano, babuino, ganado, cerdo, oveja, pollo, pavo y pez cebra y se secuenciaron las proteínas (McPherron y Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:12457-12461). La secuencia de la proteína miostatina está sumamente conservada a través de todas estas especies. De manera similar, se ha determinado la secuencia de nucleótidos para la miostatina de ratón, rata, ser humano, babuino, ganado, cerdo, oveja, pollo y pavo. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.827.733 para las secuencias de nucleótidos de miostatina murina y humana; la publicación internacional n.º WO 99/02667 para la secuencia de nucleótidos de miostatina bovina; la publicación internacional n.º WO 98/33887, para las secuencias de nucleótidos de miostatina de rata, de ser humano, de babuino, bovina, porcina, ovina, de pollo y de pavo.

60

65

La secuencia de nucleótidos del gen de la miostatina predice una proteína de aproximadamente 376 aminoácidos

con un peso molecular de aproximadamente 43 kDa. Esta proteína contiene una secuencia líder de secreción y un sitio de procesamiento proteolítico que libera un péptido de 13 kDa, que contiene 9 residuos de cisteína. La miostatina clonada expresada en células de ovario de hámster chino produce dos proteínas. La primera tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 52 kDa y la segunda de aproximadamente 15 kDa. En condiciones no reductoras, estas proteínas parecen ser dímeros con pesos moleculares de aproximadamente 101 kDa y 25 kDa (McPherron *et al.*, Nature (1997) 387:83-90).

Los investigadores han propuesto la inserción de genes de la miostatina mutados en sujetos animales para la producción de especies transgénicas que tienen un aumento del tejido muscular. Véase, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 98/33887. Sin embargo, tales enfoques plantean varios inconvenientes. Por ejemplo, debido a que el gen de la miostatina se vuelve activo durante la fase embrionaria, la producción reducida de miostatina provoca un desarrollo excesivo de músculo en el útero. Por tanto, los animales transgénicos que incluyen genes mutados requerirán probablemente un parto por cesárea, una pesada carga para los ganaderos. Adicionalmente, existe una oposición pública a los animales modificados mediante ingeniería genética para el consumo humano y serán deseables otros métodos de producción de tales animales.

Divulgación de la invención

La presente invención se refiere al uso de un inmunoconjugado de miostatina multimérico para la preparación de un medicamento para tratar atrofia muscular progresiva en un mamífero, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Debido a la naturaleza ubicua de la miostatina, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento encuentran un uso en una amplia variedad de sujetos vertebrados, tal como se describe adicionalmente a continuación.

De manera sorprendente, la invención logra estos resultados mediante técnicas inmunológicas. Es bien sabido en la técnica que la inmunización frente a moléculas endógenas, tales como miostatina, es problemática debido a que el sistema inmunitario no reconoce tales moléculas "propias". Por tanto, la presente invención proporciona una solución a un problema con el que se encontraría uno normalmente cuando se inmuniza frente a una sustancia endógena.

Se da a conocer en el presente documento un péptido de miostatina que consiste en de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 aminoácidos. El péptido comprende al menos un epítipo de miostatina. El péptido de miostatina puede derivarse de la región de miostatina que abarca los aminoácidos 45 a 376, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36) o los aminoácidos 235 a 376, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36).

El péptido de miostatina puede tener una identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente el 75% con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 3-18, inclusive, de SEQ ID NO: 4; los aminoácidos 3-15, inclusive, de SEQ ID NO: 6; los aminoácidos 3-17, inclusive, de SEQ ID NO: 8; los aminoácidos 3-16, inclusive, de SEQ ID NO: 10; los aminoácidos 3-22, inclusive, de SEQ ID NO: 12; los aminoácidos 3-25, inclusive, de SEQ ID NO: 14; los aminoácidos 3-22, inclusive, de SEQ ID NO: 16; los aminoácidos 3-18, inclusive, de SEQ ID NO: 20; y aminoácidos 3-18, inclusive, de SEQ ID NO: 22.

Se da a conocer en el presente documento un péptido de miostatina que consiste en de aproximadamente 3 a aproximadamente 200 aminoácidos. El péptido comprende al menos un epítipo de miostatina y se deriva de una región de miostatina seleccionada del grupo que consiste en la región de miostatina que abarca los aminoácidos 1 a 350, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36); la región de miostatina que abarca los aminoácidos 1 a 275, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36); la región de miostatina que abarca los aminoácidos 25 a 300, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36); la región de miostatina que abarca los aminoácidos 50 a 325, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36); y la región de miostatina que abarca los aminoácidos 75 a 350, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36).

El péptido de miostatina puede comprender la secuencia de aminoácidos Lys-Arg-Ser-Arg-Arg-Asp (SEQ ID NO: 37), la secuencia de aminoácidos Lys-Glu-Asn-Val-Glu-Lys-Glu (SEQ ID NO: 38) o la secuencia de aminoácidos Ser-Leu-Lys-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 39).

Se da a conocer en el presente documento un multímero de miostatina que comprende dos o más inmunógenos de miostatina seleccionados, en el que cada uno de los inmunógenos comprende independientemente al menos 3 aminoácidos que definen al menos un epítipo de miostatina. Cada uno de los inmunógenos de miostatina seleccionados, puede comprender al menos un epítipo de miostatina y consiste independientemente en de aproximadamente 3 a aproximadamente 200 aminoácidos, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 aminoácidos, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 30 aminoácidos, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 aminoácidos.

Cada uno de los inmunógenos de miostatina seleccionados en el multímero puede comprender independientemente un péptido de miostatina seleccionado tal como se describió anteriormente. El multímero puede comprender una molécula con unidades de repetición según la fórmula general (MP-X-MP)_y, en la que MP es un péptido de miostatina, X se selecciona del grupo que consiste en: una unión peptídica; un grupo espaciador de aminoácidos; un

polipéptido de leucotoxina; y $[MP]_n$ en la que n es mayor que o igual a 1; y en la que y es mayor que o igual a 1.

Se da a conocer en el presente documento un inmunoconjugado de miostatina que comprende al menos un péptido o multímero de miostatina, tal como se describió anteriormente, unido a un transportador inmunológico.

5 Se da a conocer en el presente documento una composición de vacuna que comprende el péptido de miostatina, el multímero de miostatina y/o el inmunoconjugado de miostatina, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Se da a conocer en el presente documento un polinucleótido que codifica para los péptidos de miostatina, los multímeros de miostatina y los inmunoconjugados de miostatina anteriores, así como vectores recombinantes que comprenden los polinucleótidos, células huésped transformadas con los vectores recombinantes, y métodos de producción de manera recombinante de los péptidos de miostatina, los multímeros de miostatina y los inmunoconjugados de miostatina.

15 Se da a conocer en el presente documento un método para provocar una respuesta inmunitaria frente a un inmunógeno de miostatina en un sujeto vertebrado que comprende administrar las composiciones de vacuna o los polinucleótidos anteriores al sujeto vertebrado. La respuesta inmunitaria provocada puede reducir la actividad de miostatina endógena en el sujeto vertebrado y dar como resultado al menos uno de los siguientes efectos biológicos:

- 20 (a) un aumento del peso corporal;
- (b) un aumento de la masa muscular;
- (c) un aumento del número de células musculares;
- 25 (d) un aumento del tamaño de las células musculares;
- (e) una reducción del contenido de grasa corporal;
- 30 (f) un aumento de la resistencia muscular;
- (g) un aumento del tejido de las glándulas mamarias;
- (h) un aumento de la lactancia;
- 35 (i) un aumento del apetito o ingestión de alimento;
- o
- 40 (j) un aumento de la duración de vida del sujeto vertebrado.

Se da a conocer en el presente documento un método de tratamiento de un trastorno que comprende degeneración o atrofia progresiva del músculo en un sujeto vertebrado, comprendiendo el método administrar las composiciones de vacuna o los polinucleótidos anteriores al sujeto. Se da a conocer en el presente documento un método de modulación de la actividad de GDF11 en un sujeto vertebrado que comprende administrar las composiciones de vacuna anteriores.

Breve descripción de las figuras

50 Las figuras 1A-1D muestran una comparación de miostatina derivada de diversas especies tal como sigue: ratón (SEQ ID NO: 27); rata (SEQ ID NO: 28); ser humano (SEQ ID NO: 29); babuino (SEQ ID NO: 30); bovino (SEQ ID NO: 31); porcino (SEQ ID NO: 32); ovino (SEQ ID NO: 33); pollo (SEQ ID NO: 34); pavo (SEQ ID NO: 35); y pez cebra (SEQ ID NO: 36). Se numeran los aminoácidos a la derecha y a la izquierda de las secuencias.

55 La figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 4) del péptido MYOS 1. MYOS 1 incluye el sitio de escisión proteolítica, Arg-Ser-Arg-Arg y el extremo N-terminal de la proteína activa.

60 La figura 3 representa la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 5) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 6) del péptido MYOS 3.

La figura 4 representa la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 7) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 8) del péptido MYOS 5.

65 La figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 10) del péptido MYOS 7.

La figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 11) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 12) del péptido MYOS 9.

5 La figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 13) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 14) del péptido MYOS 11.

La figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 15) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 16) del péptido MYOS 13.

10 La figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 17) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 18) del péptido MYOS 15.

15 La figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 19) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 20) del péptido MYOS 17.

La figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 21) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 22) del péptido MYOS 19. MYOS 19 incluye el sitio de escisión proteolítica, Arg-Ser-Arg-Arg.

20 La figura 12 muestra la posición aproximada de los péptidos MYOS 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 dentro de la secuencia de miostatina.

La figura 13 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 23) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 24) para una región activa de miostatina reconstruida que contiene tres conjuntos de ligadores de dos aminoácidos (Arg-Ser) insertados en la secuencia en las posiciones de nucleótido 55-60, 139-144 y 241-246 y en el extremo C-terminal.

La figura 14 es un diagrama del plásmido pCB150, que codifica para un transportador polipeptídico de leucotoxina y usado para crear vectores de expresión de miostatina tal como se describe en los ejemplos.

30 Las figuras 15A-15D muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 25) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 26) del transportador polipeptídico de leucotoxina presente en el plásmido pCB150. Se insertan repeticiones de oligonucleótido de miostatina en el sitio *Bam*H1 presente en la posición de nucleótido 3334.

35 La figura 16A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) y la figura 16B muestra la secuencia de aminoácidos predicha (SEQ ID NO: 2) de una miostatina representativa para su uso con la presente invención. El sitio de escisión proteolítica se encuentra en las posiciones 263-266 de la figura 16B. La región activa de miostatina del polipéptido abarca los aminoácidos 264-375.

40 La figura 17 muestra un perfil de hidrofiliidad de la proteína miostatina. Se calculó el perfil usando una longitud de grupo promedio de seis aminoácidos. Los tres mayores puntos de hidrofiliidad se encuentran en las posiciones de aminoácido 263-268, que abarcan el sitio de escisión proteolítica; las posiciones 31-37; y las posiciones 106-111.

45 La figura 18 muestra la cantidad de aumento de peso en animales tratados con inmunógenos peptídicos de miostatina, tal como se describe en los ejemplos.

Descripción detallada

50 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, virología, tecnología de ADN recombinante e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; DNA Cloning, vols. I y II (D.N. Glover ed.); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed.); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.); B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*; the series, *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); y *Handbook of Experimental Immunology*, vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publication).

60 A. Definiciones

En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan tal como se indica a continuación.

65 Por "inmunógeno de miostatina" quiere decirse un polipéptido derivado de una molécula de miostatina que provoca una respuesta inmunológica tal como se define a continuación. El término incluye moléculas que provocan una respuesta inmunológica sin un transportador inmunológico, adyuvante o inmunoestimulante asociado, así como

polipéptidos de miostatina que pueden volverse inmunogénicos, o más inmunogénicos, por medio de asociación con una molécula transportadora, adyuvante o inmunoestimulante, o mediante mutación de una secuencia nativa, y/o mediante incorporación en una molécula que contiene múltiples unidades de repetición de al menos un epítipo de una molécula de miostatina. El término puede usarse para referirse a una macromolécula individual o a una población homogénea o heterogénea de macromoléculas antigénicas derivadas de miostatina.

Para fines de la presente invención, un inmunógeno de miostatina puede derivarse de cualquiera de las diversas secuencias de miostatina conocidas, incluyendo sin limitación, polipéptidos de miostatina derivados de ratón, rata, ser humano, babuino, ganado, cerdo, oveja, pollo, pavo y pez cebra (véanse, McPherron y Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:12457-12461). La secuencia de la proteína miostatina está sumamente conservada a lo largo de todas estas especies (véanse las figuras 1A-1D).

Adicionalmente, el término "inmunógeno de miostatina" incluye una molécula de polipéptido de miostatina que difiere de la secuencia de referencia porque tiene una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácido y que tiene una identidad de aminoácido de al menos aproximadamente el 50% con respecto a la molécula de referencia, más preferiblemente una identidad de aproximadamente el 75-85% y lo más preferiblemente una identidad de aproximadamente el 90-95% o más, con respecto a la parte relevante de la secuencia de péptido nativa en cuestión. La secuencia de aminoácidos no tendrá más de aproximadamente 10-20 sustituciones de aminoácido, o no más de aproximadamente 5-10 sustituciones de aminoácido, o incluso sólo 1, 2, 3 o hasta 5 sustituciones. Las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. A este respecto, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos -- aspartato y glutamato; (2) básicos -- lisina, arginina, histidina; (3) no polares -- alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados -- glicina, asparagina, glutamina, cistina, serina, treonina, tirosina. Fenilalanina, triptófano y tirosina en ocasiones se clasifican como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, puede predecirse de manera razonable que un remplazo aislado de leucina por isoleucina o valina, o viceversa; un aspartato por un glutamato o viceversa; una treonina por una serina o viceversa; o un remplazo conservativo similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un gran efecto sobre la actividad. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero que presentan sustituciones de aminoácido menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína, están por tanto dentro de la definición de un inmunógeno de miostatina.

Tal como se usa en el presente documento un "inmunógeno de miostatina" también incluye una molécula derivada de una secuencia de miostatina nativa, así como polipéptidos de miostatina producidos de manera recombinante o sintetizados químicamente incluyendo la secuencia de referencia de miostatina de longitud completa, así como péptidos de miostatina que siguen siendo inmunogénicos, tal como se describe a continuación. Por tanto, un "inmunógeno de miostatina" incluye moléculas que tienen la secuencia nativa, moléculas con adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácido individuales o múltiples, así como fragmentos de péptido de la molécula de miostatina de referencia, siempre que la molécula conserve la capacidad para provocar la formación de anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con la miostatina que se produce de manera natural de la especie de vertebrado a la que se le administra un inmunógeno de este tipo. También se encuentran dentro de la definición epítopos de miostatina.

Un "péptido de miostatina" es un inmunógeno de miostatina, tal como se describe en el presente documento, que incluye menos de la longitud completa de la molécula de miostatina de referencia en cuestión y que incluye al menos un epítipo tal como se define a continuación. Por tanto, una composición de vacuna que comprende un péptido de miostatina incluirá una parte de la molécula de longitud completa pero no la molécula de miostatina completa en cuestión.

Por "multímero de miostatina" quiere decirse una molécula que tiene más de una copia de un inmunógeno de miostatina, péptido de miostatina o epítipo seleccionado, o múltiples repeticiones en tándem de un inmunógeno de miostatina, péptido de miostatina o epítipo seleccionado. El multímero de miostatina puede corresponder a una molécula con unidades de repetición de la fórmula general (MP-X-MP)_y en la que MP es un péptido de miostatina, X se selecciona del grupo que consiste en: una unión peptídica; un grupo espaciador de aminoácidos; y [MP]_n, en la que n es mayor que o igual a 1, y en la que y es mayor que o igual a 1, y además en la que "MP" puede comprender cualquier péptido MP. Por tanto Y puede definir 1-40 o más unidades de repetición, más preferiblemente 1-30 unidades de repetición y lo más preferiblemente 1-20 unidades de repetición. Además, las secuencias de péptido de miostatina seleccionadas pueden ser todas iguales, o pueden corresponder a diferentes derivados, análogos, variantes o epítopos de miostatina siempre que conserven la capacidad para provocar una respuesta inmunitaria. Adicionalmente, si los péptidos de miostatina se unen o bien químicamente o bien recombinantemente a un transportador, los péptidos de miostatina pueden unirse a cualquiera del extremo 5', el extremo 3', o puede flanquear al transportador en cuestión. Además, el multímero de miostatina puede estar ubicado en sitios internos al transportador. Los multímeros de miostatina se comentan en más detalle a continuación.

"Homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos restos de polinucleótido o dos restos de polipéptido. Dos secuencias de ADN o dos secuencias de polipéptido son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las

secuencias presentan una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 75%-85%, preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%-98% a lo largo de una longitud definida de las moléculas. Tal como se usa en el presente documento, sustancialmente homólogo también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con respecto a la secuencia de ADN o de polipéptido especificada.

El porcentaje de "identidad" entre dos secuencias de aminoácidos o de polinucleótido puede determinarse mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo entre la longitud de la secuencia más corta y multiplicando el resultado por 100. Pueden usarse programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 sup. 3:353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Advances in Appl. Math. 2:482-489 para el análisis de péptidos. Programas para determinar la identidad de la secuencia de nucleótidos están disponibles en el paquete de análisis de secuencias Wisconsin, versión 8 (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se utilizan fácilmente con los parámetros por defecto recomendados por el fabricante y descritos en el paquete de análisis de secuencias Wisconsin al que se ha hecho referencia anteriormente. Por ejemplo, puede determinarse el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos particular con respecto a una secuencia de referencia usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización de hueco de seis posiciones de nucleótidos.

Alternativamente, puede determinarse la identidad mediante hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasa(s) específica(s) monocatenaria(s) y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Pueden identificarse secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas en un experimento de hibridación de tipo Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas, tal como se define para ese sistema particular. La definición de condiciones de hibridación apropiadas se encuentra dentro del conocimiento de la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente; *DNA Cloning*, citado anteriormente; *Nucleic Acid Hybridization*, citado anteriormente.

Por el término "variante degenerada" quiere decirse un polinucleótido que contiene cambios en la secuencia de ácido nucleico del mismo, que codifica para un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido codificado por el polinucleótido a partir del cual se deriva la variante degenerada.

Una "respuesta inmunológica" frente a un inmunógeno o una vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos frente al inmunógeno o la vacuna de interés. Habitualmente, una respuesta de este tipo incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos; la producción de anticuerpos, células B, células T cooperadoras, células T supresoras, y/o células T citotóxicas y/o células T $\gamma\delta$, dirigidos específicamente frente a un inmunógeno o inmunógenos incluidos en una composición o vacuna de interés. Una respuesta inmunológica puede detectarse usando cualquiera de varios ensayos bien conocidos en la técnica, tales como inmunoensayos y ensayos de neutralización habituales, incluyendo inmunotransferencias de tipo Western, transferencias de puntos y ensayos de inmunoafinidad. La presencia de respuestas inmunológicas mediadas por células puede determinarse usando ensayos de célula citotóxica CTL, bien conocidos en la técnica, tales como el ensayo descrito en Erickson *et al.* J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; y Doe *et al.* Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376.

Un "epítipo" se refiere a cualquier parte o región de una molécula con la capacidad o el potencial para provocar, y combinarse con, un anticuerpo específico frente a miostatina. Para el fin de la presente invención, un epítipo de polipéptido incluirá habitualmente al menos aproximadamente 3 aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente 5 aminoácidos y lo más preferiblemente al menos aproximadamente de 10-15 aminoácidos a 20-30 o más aminoácidos, de la molécula de referencia. No existe un límite superior crítico para la longitud del fragmento, que puede comprender prácticamente la longitud completa de una secuencia proteica, o incluso una proteína de fusión que comprende dos o más epítipos de una proteína en cuestión.

Pueden identificarse epítipos en moléculas de polipéptido usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítipos, bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, pueden determinarse epítipos lineales, por ejemplo, sintetizando simultáneamente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a partes de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos todavía están unidos a los soportes. En la técnica se conocen tales técnicas y se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4.708.871; Geysen *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen *et al.* (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. De manera similar, los epítipos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, citado anteriormente. También pueden usarse programas informáticos que formulan escalas de hidropatía a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína, utilizando las propiedades hidrófobas e

hidrófilas de cada uno de los 20 aminoácidos, tal como se describe, por ejemplo, en Kyte *et al.*, J. Mol. Biol. (1982) 157:105-132; y Hopp y Woods, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78:3824-3828, para determinar partes antigénicas de una molécula dada. Por ejemplo, la técnica de Hopp y Woods asigna a cada aminoácido un valor numérico de hidrofilia y entonces calcula repetidamente el promedio de estos valores a lo largo de la cadena peptídica. Los puntos de mayor hidrofilia promedio locales indican partes antigénicas de la molécula.

Por "transportador inmunológico" quiere decirse cualquier molécula que, cuando se asocia con un inmunógeno de miostatina de interés, confiere inmunogenicidad a esa molécula, o potencia la inmunogenicidad de la molécula. Los ejemplos de transportadores adecuados incluyen macromoléculas grandes, que se metabolizan lentamente, tales como: proteínas; polisacáridos, tales como Sepharose, agarosa, celulosa, perlas de celulosa y similares; aminoácidos poliméricos tales como poli(ácido glutámico), polilisina, y similares; copolímeros de aminoácido; partículas de virus inactivos; toxinas bacterianas tales como toxoide de difteria, tétanos, cólera, moléculas de leucotoxina, y similares. Los transportadores se describen en más detalle a continuación.

Un inmunógeno de miostatina está "unido" a una molécula transportadora especificada cuando el inmunógeno está acoplado químicamente a, o está asociado con, el transportador, o cuando el inmunógeno se expresa a partir de una molécula de ADN quimérico que codifica para el inmunógeno y el transportador de interés.

Un "inmunoconjugado" es un inmunógeno de miostatina tal como un péptido o multímero de miostatina que está unido a una molécula transportadora, tal como se definió anteriormente.

El término "polipéptido de leucotoxina" o "polipéptido de LKT" quiere decir un polipéptido que se deriva de una proteína que pertenece a la familia de moléculas caracterizadas por la secuencia de aminoácidos consenso del extremo carboxilo-terminal Gly-Gly-X-Gly-X-Asp (Highlander *et al.* (1989) DNA 8:15-28), en la que X es Lys, Asp, Val o Asn. Tales proteínas incluyen, entre otras, leucotoxinas derivadas de *P. haemolytica* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, así como alfa hemolisina de *E. coli* (Strathdee *et al.* (1987) Infect. Immun. 55:3233-3236; Lo (1990) Can. J. Vet. Res. 54:S33-S35; Welch (1991) Mol. Microbiol. 5:521-528). Esta familia de toxinas se conoce como la familia de toxinas "RTX" (Lo (1990) Can. J. Vet. Res. 54:S33-S35). Además, el término "polipéptido de leucotoxina" se refiere a un polipéptido de leucotoxina que se sintetiza químicamente, se aísla a partir de un organismo que expresa el mismo o se produce de manera recombinante. Además, el término quiere decir una proteína inmunogénica que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a una secuencia de aminoácidos contigua encontrada en la molécula de leucotoxina nativa particular. Por tanto, el término incluye secuencias tanto de longitud completa como parciales, así como análogos. Aunque las leucotoxinas de longitud completa nativas muestran actividad citotóxica, el término "leucotoxina" también quiere decir moléculas que siguen siendo inmunogénicas aunque carecen del carácter citotóxico de leucotoxinas nativas. Se conocen las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos correspondientes para varias leucotoxinas. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.957.739 y 5.055.400; Lo *et al.* (1985) Infect. Immun. 50:667-67; Lo *et al.* (1987) Infect. Immun. 55:1987-1996; Strathdee *et al.* (1987) Infect. Immun. 55:3233-3236; Highlander *et al.* (1989) DNA 8:15-28; y Welch (1991) Mol. Microbiol. 5:521-528. En el presente documento se dan a conocer quimeras de leucotoxina que tienen una secuencia de polipéptido de leucotoxina seleccionada que confiere inmunogenicidad potenciada a uno o más multímeros de miostatina fusionados en la misma.

Ejemplos particulares de polipéptidos de leucotoxina inmunogénica son moléculas de leucotoxina truncadas descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 5.476.657 y 5.837.268. Estas moléculas truncadas incluyen LKT 352, LKT 111 y LKT 114. LKT 352 se deriva del gen *lktA* presente en el plásmido pAA352 (n.º de registro de ATCC 68283). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de este gen se describen en la patente estadounidense 5.476.657. El gen codifica para una leucotoxina truncada, que tiene 914 aminoácidos y un peso molecular estimado de alrededor de 99 kDa. LKT 111 es un polipéptido de leucotoxina derivado del gen *lktA* presente en el plásmido pCB111 (n.º de registro de ATCC 69748). La secuencia de nucleótidos de este gen y la secuencia de aminoácidos correspondiente se dan a conocer en la patente estadounidense n.º 5.837.268. El gen codifica para una versión acortada de leucotoxina que se desarrolló a partir del gen de leucotoxina recombinante presente en el plásmido pAA352 (n.º de registro de ATCC 68283) mediante eliminación de un fragmento de ADN interno de aproximadamente 1300 pb de longitud. El polipéptido LKT 111 tiene un peso molecular estimado de 52 kDa (en comparación con el LKT 352 de 99 kDa), pero conserva partes del extremo N-terminal de LKT 352 que contienen epítopos de célula T que son necesarios para la inmunogenicidad de célula T suficiente, y partes del extremo C-terminal de LKT 352 que contienen sitios de restricción convenientes para su uso en la producción de proteínas de fusión. LKT 114 se deriva del gen presente en el plásmido pAA114 (descrito en la patente estadounidense n.º 5.837.268) y se muestra en las figuras 15A-15D en el presente documento. LKT 114 difiere de LKT 111 en virtud de una delección de aminoácido adicional de la parte interna de la molécula.

"Adyuvantes" se refiere a agentes que actúan de manera no específica para aumentar una respuesta inmunitaria frente a un antígeno particular, reduciendo por tanto la cantidad de antígeno necesaria en cualquier vacuna administrada, y/o la frecuencia de inyección necesaria con el fin de generar una respuesta inmunitaria adecuada frente al antígeno de interés. Véase, por ejemplo, A.C. Allison J. Reticuloendothel. Soc. (1979) 26:619-630.

Proteínas, polipéptidos o péptidos "nativos" son proteínas, polipéptidos o péptidos aislados de la fuente en la que las

proteínas se producen de manera natural. Polipéptidos “recombinantes” se refieren a polipéptidos producidos mediante técnicas de ADN recombinante; es decir, producidos a partir de células transformadas mediante un constructo de ADN exógeno que codifica para el polipéptido deseado. Polipéptidos “sintéticos” son aquéllos preparados mediante síntesis química.

Por “polinucleótido” quiere decirse una secuencia de nucleótidos que incluye, pero no se limita a, ARN tal como secuencias de ARNm, ADNc, ADN genómico e incluso secuencias de ADN sintético. El término también incluye secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN.

Un “vector” es un replicón, tal como a plásmido, fago o cósmido, al que puede unirse otro segmento de ADN para provocar la replicación del segmento unido.

Una “secuencia de ADN codificante” o una “secuencia de ADN que codifica para” una proteína particular, es una secuencia de ADN que se transcribe y traduce para dar un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de elementos reguladores apropiados. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante un codón de inicio en el extremo 5'-terminal y un codón de parada de la traducción en el extremo 3'-terminal. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ADNc a partir de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico a partir de ADN eucariota (por ejemplo, de mamífero) e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción habitualmente se ubicará en 3' con respecto a la secuencia codificante.

El término “elementos de control” de ADN se refiere de manera colectiva a promotores, sitios de unión a ribosomas, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en el sentido de 5', potenciadores, y similares, que de manera colectiva proporcionan la transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula huésped. No es necesario que todas de estas secuencias de control estén siempre presentes en un vector recombinante siempre que pueda transcribirse y traducirse el gen deseado.

“Unido operativamente” se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados para realizar su función habitual. Por tanto, elementos de control unidos operativamente a una secuencia codificante pueden efectuar la expresión de la secuencia codificante. No es necesario que los elementos de control estén contiguos a la secuencia codificante, siempre que funcionen dirigiendo la expresión de la misma. Por tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias no traducidas pero transcritas entre un promotor y la secuencia codificante y el promotor todavía puede considerarse “operativamente unido” a la secuencia codificante.

Un elemento de control, tal como un promotor, “dirige la transcripción” de una secuencia codificante en una célula cuando la ARN polimerasa se unirá al promotor y transcribe la secuencia codificante para dar ARNm, que entonces se traduce para dar el polipéptido codificado por la secuencia codificante.

Una “célula huésped” es una célula que se ha transformado, o puede transformarse, mediante una molécula de ácido nucleico exógeno.

Una célula se ha “transformado” mediante ADN exógeno cuando tal ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. ADN exógeno puede estar o no estar integrado (unido covalentemente) en un ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula. En procariotas y levaduras, por ejemplo, el ADN exógeno puede mantenerse en un elemento episómico, tal como un plásmido. Con respecto a células eucariotas, una célula transformada de manera estable es una en la que el ADN exógeno se ha integrado en el cromosoma de manera que se hereda por las células hijas a través de la replicación del cromosoma. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones compuestos por una población de células hijas que contienen el ADN exógeno.

El término “derivado de”, tal como se usa en el presente documento, indica una fuente o un origen real o teórico de la molécula o inmunógeno objeto. Por ejemplo, un inmunógeno que se “deriva de” una molécula de miostatina particular portará similitud de secuencia estrecha con una parte relevante de la molécula de referencia. Por tanto, un inmunógeno que se “deriva de” una molécula de miostatina particular puede incluir toda la secuencia de miostatina de tipo natural, o puede alterarse mediante inserción, delección o sustitución de residuos de aminoácido, siempre que la secuencia derivada proporcione un inmunógeno que corresponde a la molécula de miostatina objetivo. Los inmunógenos derivados de una molécula indicada contendrán al menos un epítipo específico para la molécula indicada.

Por “sujeto vertebrado” quiere decirse cualquier miembro del subfilo cordata, incluyendo, sin limitación, mamíferos tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras, caballos y seres humanos; animales domésticos tales como perros y gatos; y aves, incluyendo aves domésticas, salvajes y de caza tales como gallos y gallinas incluyendo pollos, pavos y otras aves gallináceas; y peces. El término no indica una edad o un sexo particular. Por tanto, se pretende abarcar animales tanto machos como hembras, tanto adultos como recién nacidos, así como fetos y huevos.

Las composiciones y los métodos dados a conocer en el presente documento servirán para “reducir la actividad de miostatina”. Esta reducción de la actividad puede ser una reducción de los niveles circulantes de miostatina encontrados normalmente en un sujeto vertebrado, o una reducción de los niveles circulantes de miostatina en sujetos con trastornos que dan como resultado niveles circulantes de miostatina elevados. Una reducción de la actividad de miostatina generalmente resulta de la inactivación de miostatina circulante mediante anticuerpos generados frente al inmunógeno peptídico de miostatina administrado al sujeto en cuestión. Sin embargo, la reducción de la actividad no se limita a un modo de inactivación particular, sino que puede ser el resultado de la disminución de la producción o la secreción de miostatina en la circulación. Sin querer limitarse a ninguna teoría particular, los inmunógenos peptídicos de miostatina puede provocar la producción de anticuerpos que impiden que la miostatina se escinda para liberar la parte activa de la proteína, o impiden que la proteína se una a su receptor. Alternativamente, los anticuerpos pueden eliminar la miostatina secretada de la circulación u otros líquidos corporales antes de que alcance el sitio activo.

La reducción de la actividad de miostatina puede manifestarse de una variedad de maneras. Por ejemplo, la reducción de la actividad de miostatina puede dar como resultado un aumento del peso corporal, potenciación de la masa muscular, aumento de la resistencia muscular, una alteración en la razón de músculo con respecto a grasa, un aumento de masa muscular libre de grasa, un aumento del tamaño y/o el número de células musculares, una reducción del contenido de grasa corporal, un aumento de la duración de vida en un vertebrado normal o enfermo, un aumento del apetito o la ingestión de alimento, una mejora de la calidad de vida, y en mamíferos, un aumento de tejido de las glándulas mamarias y la lactancia.

Por “potenciar la masa muscular” quiere decirse que el animal al que se le ha administrado una composición de la presente invención muestra un aumento del tamaño de células musculares (hipertrofia) o del número de células musculares (hiperplasia). El aumento puede ser en fibras musculares de tipo 1 y/o tipo 2. Se pretende que el término “músculo” tal como se usa en el presente documento incluya tipos de tejido análogos en peces. En la técnica se conocen bien métodos para determinar “la potenciación de la masa muscular”. Por ejemplo, el contenido muscular puede medirse antes y después de la administración de un péptido de miostatina de la invención usando técnicas convencionales, tales como mediante pesaje bajo el agua (véase, por ejemplo, Bhasin *et al.* New Eng. J. Med. (1996) 335:1-7) y absorciometría de rayos X de doble energía (véase, por ejemplo, Bhasin *et al.* Mol. Endocrinol. (1998) 83:3155-3162). Puede demostrarse un aumento del tamaño muscular mediante aumento de peso de al menos aproximadamente el 5-10%, preferiblemente al menos aproximadamente el 10-20% o más.

B. Métodos generales

Para la presente invención es fundamental para el desarrollo de composiciones inmunológicas y métodos para modular la producción de miostatina endógena en un sujeto vertebrado. Aunque la miostatina se reconoce generalmente como “propia” y por tanto no inmunogénica, las composiciones descritas en el presente documento proporcionan sorprendentemente medios para producir una respuesta inmunológica en un sujeto inmunizado con las mismas.

En el presente documento se dan a conocer multímeros de miostatina e inmunoconjugados de miostatina para su uso en la generación de una respuesta inmunitaria en un sujeto vertebrado. Puesto que se secreta la proteína miostatina, la inmunización activa o pasiva de animales jóvenes sirve para aumentar la masa muscular pero evita los problemas asociados con otras anomalías que surgen de cambios inducidos durante el periodo embrionario. Por tanto, por ejemplo, pueden iniciarse calendarios de vacunación poco después del nacimiento para lograr hipertrofia y/o hiperplasia. Alternativamente, la inmunización puede realizarse en un fase de desarrollo más tardío, (por ejemplo, a ganado en corrales de engorde) para mejorar el rendimiento de proteína muscular. Adicionalmente, la inmunización puede realizarse de manera prenatal o a animales en el útero, para lograr los resultados deseados.

Las composiciones y técnicas descritas en el presente documento pueden aplicarse igualmente a vertebrados ponedores de huevos, tales como aves y peces. A este respecto, McPherron y Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:12457-12461, han identificado genes de miostatina en aves y peces que son altamente homólogos a los genes de miostatina de mamífero. Por tanto, el gen está conservado entre especies y se cree que sirve para una función similar en todas las especies. Por tanto, por ejemplo, se inmunizan aves y peces ponedores de huevos para crear altos títulos de anticuerpo en el plasma materno. Puesto que los anticuerpos se transfieren al saco vitelino del huevo, estos anticuerpos pueden reducir la miostatina durante el periodo embrionario y provocan el aumento deseado de tamaño y/o números de células musculares. Alternativamente, la inmunización puede realizarse *in ovo*.

Además, las vacunas y los métodos descritos en el presente documento encontrarán un uso para el tratamiento de diversos trastornos en seres humanos y otros animales. Por ejemplo, la modulación de la producción de miostatina es útil para el tratamiento de individuos con trastornos que provocan de manera o bien primaria o bien secundaria atrofia muscular progresiva tal como para el tratamiento de parapléjicos y tetrapléjicos, en los que la atrofia muscular es un problema grave. Los sujetos ancianos también pueden beneficiarse de las vacunas y los métodos descritos en el presente documento en los que la carencia de resistencia muscular es a menudo una limitación grave para un estilo de vida activo, saludable. Adicionalmente, las composiciones dadas a conocer en el presente documento pueden usarse para tratar o prevenir atrofia muscular progresiva debida a diversos cánceres, anorexia, caquexia,

SIDA y trastornos similares.

Las vacunas y los métodos dados a conocer en el presente documento encontrarán un uso para tratar diversas distrofias, tales como distrofias musculares pseudohipertróficas, distrofias facioescapulohumerales, distrofias musculares de cintura y extremidades, distrofias musculares distales, miopatías oculares y distrofias miotónicas. Estas enfermedades incluyen los trastornos conocidos como distrofia muscular de tipo Becker, distrofia muscular de Dejerine-Landouzy, distrofia muscular de tipo Duchenne, distrofia muscular de Landouzy, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular de Erb, distrofia muscular de tipo Fukuyama, distrofia muscular de Gowers, distrofia muscular neuroaxonal infantil, distrofia muscular de Leyden-Möblus, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular pelvifemoral, distrofia muscular progresiva, distrofia muscular escapulohumeral y distrofia muscular de Simmerlin.

Adicionalmente, puesto que la miostatina es altamente homóloga con GDF11, los péptidos de miostatina dados a conocer en el presente documento también encontrarán un uso en la modulación de la actividad de GDF11. Véase, por ejemplo, el n.º de registro de NCBI AF092734 para la secuencia de GDF11.

La inmunización puede lograrse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, el uso de inmunización con ADN o vacunas peptídicas. Tales métodos se describen en detalle a continuación.

1. Péptidos de miostatina

Los péptidos de miostatina dados a conocer en el presente documento incluirán generalmente de al menos aproximadamente 3 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos, preferiblemente de al menos aproximadamente 3 aminoácidos a aproximadamente 100 aminoácidos, más preferiblemente de al menos aproximadamente 3 a aproximadamente 50 aminoácidos, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 3 aminoácidos a aproximadamente 30 aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 aminoácidos, y lo más preferiblemente de al menos aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos o de 5 a aproximadamente 15 aminoácidos, de una proteína de miostatina seleccionada.

Las proteínas de miostatina representativas de 10 especies a partir de las que pueden derivarse los péptidos de miostatina dados a conocer en el presente documento se muestran en las figuras 1A-1D. La secuencia de aminoácidos de miostatina bovina también se muestra en la figura 16B. El péptido incluirá al menos un epítipo que confiere inmunogenicidad a la molécula de miostatina.

El péptido de miostatina puede derivarse de la región de miostatina incluyendo pero sin limitarse a la región que abarca los aminoácidos 1 a 350, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36); la región de miostatina que abarca los aminoácidos 1 a 275, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36); la región de miostatina que abarca los aminoácidos 25 a 300, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36); la región de miostatina que abarca los aminoácidos 50 a 325, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36); la región de miostatina que abarca los aminoácidos 75 a 350, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36); la región de miostatina que abarca los aminoácidos 45 a 376, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36); 100 a 376, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36); la región de miostatina que abarca los aminoácidos 235 a 376, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 27-36); o de cualquier región que se cree que incluye un epítipo de miostatina que pueda provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto al que se le administra el péptido.

Los péptidos de miostatina pueden derivarse de una de las tres regiones de miostatina que muestran los mayores puntos de hidrofiliicidad en el perfil de hidrofiliicidad mostrado en la figura 17. Los tres mayores puntos de hidrofiliicidad se encuentran en las posiciones de aminoácido 263-268, que abarcan el sitio de escisión proteolítica; las posiciones 31-37; y las posiciones 106-111. Por tanto, el péptido de miostatina puede comprender la secuencia de aminoácidos Lys-Arg-Ser-Arg-Arg-Asp (SEQ ID NO: 37) que abarca el sitio de escisión proteolítica; la secuencia de aminoácidos Lys-Glu-Asn-Val-Glu-Lys-Glu (SEQ ID NO: 38) que corresponde a los aminoácidos 31-37 de miostatina; o la secuencia de aminoácidos Ser-Leu-Lys-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 39) que corresponde a los aminoácidos 106 a 111 de miostatina.

El péptido de miostatina puede tener una identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente el 75% con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de aminoácidos 3-18, inclusive, de SEQ ID NO: 4 (MYOS 1, mostrado en la figura 2); los aminoácidos 3-15, inclusive, de SEQ ID NO: 6 (MYOS 3, mostrado en la figura 3); los aminoácidos 3-17, inclusive, de SEQ ID NO: 8 (MYOS 5, mostrado en la figura 4); los aminoácidos 3-16, inclusive, de SEQ ID NO: 10 (MYOS 7, mostrado en la figura 5); los aminoácidos 3-22, inclusive, de SEQ ID NO: 12 (MYOS 9, mostrado en la figura 6); los aminoácidos 3-25, inclusive, de SEQ ID NO: 14 (MYOS 11, mostrado en la figura 7); los aminoácidos 3-22, inclusive, de SEQ ID NO: 16 (MYOS 13, mostrado en la figura 8); los aminoácidos 3-19, inclusive, de SEQ ID NO: 18 (MYOS 15, mostrado en la figura 9); los aminoácidos 3-18, inclusive, de SEQ ID NO: 20 (MYOS 17, mostrado en la figura 10); o los aminoácidos 3-18, inclusive, de SEQ ID NO: 22 (MYOS 19, mostrado en la figura 11). Las posiciones de los diversos péptidos MYOS anteriores con respecto a la miostatina de longitud completa se

muestran en la figura 12.

El péptido de miostatina está unido opcionalmente a una molécula transportadora inmunológica con el fin de formar un inmunoconjugado de miostatina, tal como se describe adicionalmente a continuación.

2. Inmunoconjugados de miostatina

Tal como se explicó anteriormente, la miostatina es una molécula endógena y, como tal, puede ser deseable aumentar adicionalmente la inmunogenicidad del péptido de miostatina (o multímeros descritos anteriormente) uniéndolo a un transportador para formar un inmunoconjugado de miostatina. Esto es especialmente necesario si el inmunógeno de miostatina se administrará a la misma especie de la que se deriva.

Transportadores adecuados son generalmente polipéptidos que incluyen regiones antigénicas de una proteína derivada de un material infeccioso tal como una proteína de superficie viral, o una secuencia de péptido transportador. Estos transportadores sirven para estimular de manera no específica la actividad de células T cooperadoras y para ayudar a dirigir un inmunógeno de interés a células presentadoras de antígeno (APC) para el procesamiento y la presentación en la superficie celular en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

Se han desarrollado varios sistemas transportadores para este fin. Por ejemplo, a menudo se acoplan haptenos peptídicos pequeños a transportadores proteicos tales como hemocianina de lapa californiana (Bittle *et al.* (1982) Nature 298:30-33), toxinas bacterianas tales como toxoide tetánico (Muller *et al.* (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:569-573), ovoalbúmina, polipéptidos de leucotoxina y mioglobina de esperma de ballena, para producir una respuesta inmunitaria. Estas reacciones de acoplamiento normalmente dan como resultado la incorporación de varios moles de hapteno peptídico por mol de proteína transportadora.

Otros transportadores adecuados para su uso con la presente invención incluyen polipéptidos VP6 de rotavirus, o fragmentos funcionales de los mismos, tal como se da a conocer en la patente estadounidense número 5.071.651. También es útil un producto de fusión de una proteína viral y uno o más epítopos de miostatina, productos de fusión que se preparan mediante los métodos dados a conocer en la patente estadounidense n.º 4.722.840. Todavía otros transportadores adecuados incluyen células, tales como linfocitos, puesto que la presentación en esta forma imita el modo de presentación natural en el sujeto, que da lugar al estado inmunizado. Alternativamente, los inmunógenos de miostatina pueden estar acoplados a eritrocitos, preferiblemente los propios eritrocitos del sujeto. Los expertos en la técnica conocen métodos de acoplamiento de péptidos a proteínas o células.

Sistemas de administración útiles en la práctica de la presente invención también pueden utilizar transportadores particulados. Por ejemplo, se han usado partículas preformadas como plataformas sobre las que pueden acoplarse e incorporarse inmunógenos. En la técnica también se conocen sistemas basados en proteosomas (Lowell *et al.* (1988) Science 240:800-802) y complejos estimuladores inmunitarios (Morein *et al.* (1984) Nature 308:457-460).

También pueden usarse con la presente invención sistemas transportadores que usan proteínas quiméricas producidas de manera recombinante que se autoensamblan en partículas. Por ejemplo, el retrotransposón de levadura, Ty, codifica para una serie de proteínas que se ensamblan en partículas pseudovirales (Ty-VLP; Kingsman *et al.* (1988) Vaccines 6:304-306). Por tanto, puede insertarse un gen, o fragmento del mismo, que codifica para el inmunógeno de miostatina de interés en el gen TyA y expresarse en levadura como proteína de fusión. La proteína de fusión conserva la capacidad de autoensamblarse en partículas de tamaño uniforme. Otros sistemas transportadores pseudovirales útiles se basan en HBsAg, (Valenzuela *et al.* (1985) Bio/Technol. 3:323-326; patente estadounidense n.º 4.722.840; Delpeyroux *et al.* (1986) Science 233:472-475), antígeno central de la hepatitis B (Clarke *et al.* (1988) Vaccines 88 (Ed. H. Ginsberg, *et al.*) págs. 127-131), virus de la polio (Burke *et al.* (1988) Nature 332:81-82) y virus del mosaico del tabaco (Haynes *et al.* (1986) Bio/Technol. 4:637-641).

Transportadores especialmente preferidos incluyen albúminas séricas, hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina, mioglobina de esperma de ballena, moléculas de leucotoxina tal como se describió anteriormente, y otras proteínas bien conocidas por los expertos en la técnica. Un polipéptido de leucotoxina particular, para su uso como transportador en el presente documento, se muestra en las figuras 15A-15D. La miostatina se inserta convenientemente en el sitio BamHI presente en la posición de nucleótido 3334, tal como se describe adicionalmente en los ejemplos.

Pueden usarse transportadores proteicos en su forma nativa o puede modificarse su contenido en grupos funcionales, por ejemplo, mediante succinilación de residuos de lisina o reacción con Cys-tiolactona. También puede incorporarse un grupo sulfhidrilo en el transportador (o antígeno), por ejemplo, mediante reacción de funciones amino con 2-iminotiolano o el éster de N-hidroxisuccinimida de propionato de 3-(4-ditiopiridilo). También pueden modificarse transportadores adecuados para incorporar brazos espaciadores (tales como hexametilendiamina u otras moléculas bifuncionales de tamaño similar) para la unión de inmunógenos peptídicos.

Los transportadores pueden conjugarse físicamente con el inmunógeno de miostatina de interés, usando reacciones

de acoplamiento convencionales. Alternativamente, pueden prepararse moléculas quiméricas de manera recombinante para su uso en la presente invención, tal como fusionando un gen que codifica para un polipéptido transportador adecuado a una o más copias de un gen, o fragmento del mismo, que codifica para un inmunógeno de miostatina seleccionado.

Los inmunógenos de miostatina también pueden administrarse mediante un virus transportador que expresa los mismos. Los virus transportadores que encontrarán un uso en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, los virus *Vaccinia* y otros poxvirus, adenovirus y herpesvirus. A modo de ejemplo, pueden construirse recombinantes del virus *Vaccinia* que expresan las proteínas tal como sigue. El primer lugar se inserta el ADN que codifica para una proteína particular en un vector apropiado de manera que está adyacente a un promotor de *Vaccinia* y secuencias de ADN de *Vaccinia* flanqueantes, tales como la secuencia que codifica para timidina cinasa (TK). Este vector se usa entonces para transfectar células que se infectan simultáneamente con *Vaccinia*. La recombinación homóloga sirve para insertar el promotor de *Vaccinia* más el gen que codifica para el inmunógeno deseado en el genoma viral. El recombinante de TK resultante puede seleccionarse cultivando las células en presencia de 5-bromodesoxiuridina y escogiendo placas virales resistentes a la misma.

3. Multímeros de miostatina

La inmunogenicidad de los inmunógenos de miostatina también puede aumentarse significativamente produciendo formas inmunogénicas de las moléculas que comprenden múltiples copias de epítomos seleccionados. De esta manera, la miostatina endógena puede convertirse en un autoantígeno eficaz.

Por consiguiente, en el presente documento se dan a conocer composiciones de vacuna que contienen multímeros de miostatina proporcionados en forma o bien de ácido nucleico o bien de péptido para la administración a un sujeto. El multímero de miostatina tendrá más de una copia de péptidos, epítomos o inmunógenos de miostatina, seleccionados, tal como se describió anteriormente, o múltiples repeticiones en tándem de un péptido, epítomo o inmunógeno de miostatina seleccionado. Por tanto, los multímeros de miostatina pueden comprender cualquiera de repeticiones múltiples o en tándem de secuencias de miostatina seleccionadas, repeticiones múltiples o en tándem de epítomos de miostatina seleccionados, o cualquier combinación imaginable de los mismos. Los epítomos de miostatina pueden identificarse usando técnicas tal como se describió en detalle anteriormente.

Por ejemplo, el multímero de miostatina puede corresponder a una molécula con unidades de repetición de la fórmula general (MP-X-MP) y en la que MP es un péptido de miostatina, X se selecciona del grupo que consiste en una unión peptídica, un grupo espaciador de aminoácidos y $[MP]_n$, en la que n es mayor que o igual a 1, y es mayor que o igual a 1, y además en la que "MP" puede comprender cualquier péptido MP. Por tanto, el multímero de miostatina puede contener desde 2-64 o más péptidos de miostatina, más preferiblemente 2-32 ó 2-16 péptidos de miostatina.

Además, las secuencias de inmunógeno de miostatina seleccionadas pueden ser todas iguales, o pueden corresponder a diferentes derivados, análogos, variantes o epítomos de miostatina siempre que conserven la capacidad para provocar una respuesta inmunitaria. Adicionalmente, si los inmunógenos de miostatina están unidos o bien químicamente o bien de manera recombinante a un transportador, los péptidos de miostatina pueden estar unidos a cualquiera del extremo 5', el extremo 3', o pueden flanquear al transportador en cuestión. Además, el multímero de miostatina puede estar ubicado en sitios internos al transportador.

Un transportador particular para su uso con los presentes multímeros de miostatina es un polipéptido de leucotoxina tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, pueden insertarse convenientemente repeticiones de oligonucleótidos de miostatina en el sitio *Bam*HI presente en la posición de nucleótido 3334 del polipéptido de leucotoxina mostrado en las figuras 15A-15D.

Tal como se explicó anteriormente, pueden estar presentes secuencias espaciadoras entre los restos de miostatina. Por ejemplo, están presentes dímeros de Arg-Ser y Gly-Ser en los péptidos MYOS ejemplificados en el presente documento que proporcionan espaciadores entre secuencias de repetición de los péptidos de miostatina. La colocación estratégica de diversas secuencias espaciadoras entre inmunógenos de miostatina seleccionados puede usarse para conferir un aumento de la inmunogenicidad en los constructos objeto. Por consiguiente, en la invención, una secuencia espaciadora seleccionada puede codificar para una amplia variedad de restos tales como un ligador de aminoácido individual o una secuencia de dos a varios aminoácidos. Los grupos espaciadores seleccionados pueden proporcionar preferiblemente sitios de escisión enzimática de manera que el multímero expresado puede procesarse por enzimas proteolíticas *in vivo* (por APC, o similares) para proporcionar varios péptidos, conteniendo cada uno al menos un epítomo de células T derivado de la parte del transportador, y que preferiblemente están fusionados a una secuencia de péptido de miostatina sustancialmente completa.

Los grupos espaciadores pueden construirse de manera que la región de unión entre restos de miostatina seleccionados comprende una secuencia claramente foránea para el sujeto inmunizado, confiriendo de ese modo una potenciación de la inmunogenicidad para los péptidos de miostatina asociados. Adicionalmente, pueden construirse secuencias espaciadoras para proporcionar antigenicidad de células T, tales como aquellas secuencias

que codifican para secuencias peptídicas anfipáticas y/o de hélice α que se reconocen generalmente en la técnica como que proporcionan epítomos de células T cooperadoras inmunogénicas. La elección de epítomos de células T particulares que va a proporcionarse mediante tales secuencias espaciadoras puede variar dependiendo de la especie de vertebrado particular que vaya a vacunarse. Aunque se ejemplifican partes de miostatina particulares que incluyen secuencias espaciadoras, también es un objeto de la invención proporcionar uno o más multímeros de miostatina que comprenden secuencias de miostatina directamente adyacentes (sin secuencias espaciadoras intermedias).

La secuencia mutimérica de miostatina así producida da lugar a un antígeno de miostatina altamente inmunogénico para su uso en las composiciones de la invención.

Los péptidos, inmunoconjugados y multímeros de miostatina pueden producirse usando los métodos descritos a continuación, y usarse para métodos de inmunización basados en ácidos nucleicos, mediante terapia génica, de inmunización basados en proteínas, y similares.

4. Métodos de inmunización basados en ácidos nucleicos

Generalmente, las vacunas basadas en ácidos nucleicos dadas a conocer en el presente documento incluirán regiones relevantes que codifican para un inmunógeno de miostatina, con secuencias de control adecuadas y, opcionalmente, secuencias de nucleótidos terapéuticas secundarias. Las moléculas de ácido nucleico se preparan en forma de vectores que incluyen los elementos necesarios para dirigir la transcripción y traducción en una célula receptora.

Con el fin de aumentar una respuesta inmunitaria en un sujeto inmunizado, las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse junto con sustancias secundarias, tales como agentes farmacológicos, adyuvantes, o junto con la administración de vectores que codifican para modificadores de la respuesta biológica tales como citocinas y similares. Otras sustancias secundarias incluyen, pero no se limitan a, sustancias para incrementar el aumento de peso, la masa muscular o la resistencia muscular, tales como hormonas de crecimiento, agentes que promueven el crecimiento, beta-antagonistas, agentes de reparto y antibióticos.

Las secuencias de nucleótidos pueden derivarse de fuentes conocidas, por ejemplo, aislando las mismas de células o tejido que contiene una secuencia de nucleótidos o un gen deseado usando técnicas convencionales, o usando técnicas recombinantes o de síntesis.

Una vez que se han preparado o aislado secuencias codificantes para los inmunógenos de miostatina, tales secuencias pueden clonarse en cualquier vector o replicón adecuado. Los expertos en la técnica conocen numerosos vectores de clonación, y la selección de un vector de clonación apropiado es una cuestión optativa. Los ligamientos a otras secuencias, por ejemplo, moléculas secundarias o moléculas transportadoras, se realizan usando procedimientos convencionales, conocidos en la técnica. Una o más partes de inmunógeno de miostatina de la quimera pueden fusionarse en 5' y/o 3' a una secuencia secundaria o molécula transportadora deseada. Alternativamente, una o más partes de inmunógeno de miostatina pueden ubicarse en sitios internos a la molécula transportadora, o tales partes pueden situarse en ubicaciones tanto terminales como internas en la quimera.

Alternativamente, las secuencias de ADN que codifican para los inmunógenos de miostatina de interés, unidas opcionalmente a moléculas transportadoras, pueden prepararse de manera sintética en lugar de clonarse. Las secuencias de ADN pueden diseñarse con codones apropiados para la secuencia particular. La secuencia completa del inmunógeno se ensambla entonces a partir de oligonucleótidos solapantes preparados mediante métodos convencionales y se ensambla para dar una secuencia codificante completa. Véanse, por ejemplo, Edge (1981) *Nature* 292:756; Nambair *et al.* (1984) *Science* 223:1299; y Jay *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* 259:6311.

La secuencia codificante se pone entonces bajo el control de elementos de control adecuados para la expresión en tejido huésped adecuado *in vivo*. La elección de los elementos de control dependerá del sujeto que está tratándose y del tipo de preparación usada. Por tanto, si va a usarse la maquinaria de transcripción y traducción endógena del sujeto para expresar los inmunógenos, se utilizarán elementos de control compatibles con el sujeto particular. A este respecto, en la técnica se conocen varios promotores para su uso en sistemas de mamífero. Por ejemplo, promotores típicos para la expresión en células de mamífero incluyen el promotor de expresión temprana de SV40, un promotor de CMV tal como el promotor de expresión precoz de CMV, el promotor LTR del virus de tumor mamario de ratón, el promotor de expresión tardía principal de adenovirus (Ad MLP) y el promotor del virus del herpes simple, entre otros. Otros promotores no virales, tales como un promotor derivado del gen de la metalotioneína murina, también encontrarán un uso para la expresión en mamíferos.

Normalmente, también estarán presentes secuencias de poliadenilación y terminación de la transcripción, ubicadas en 3' con respecto al codón de parada de la traducción. Preferiblemente, también está presente una secuencia para la optimización del inicio de la traducción, ubicado en 5' con respecto a la secuencia codificante. Los ejemplos de señales de poliadenilación/terminación de la transcripción incluyen aquellas derivadas de SV40, tal como se describe en Sambrook *et al.*, citado anteriormente, así como una secuencia de terminación de la hormona de

crecimiento bovina. También pueden diseñarse en los constructos intrones, que contienen sitios donadores y aceptores de corte y empalme.

También pueden usarse elementos potenciadores en el presente documento para aumentar los niveles de expresión de los constructos. Los ejemplos incluyen el potenciador del gen de expresión temprana de SV40 (Dijkema *et al.* (1985) EMBO J. 4:761), el potenciador/promotor derivado de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Gorman *et al.* (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777) y elementos derivados de CMV humano (Boshart *et al.* (1985) Cell 41:521), tales como elementos incluidos en la secuencia A del intrón de CMV.

Una vez preparadas, las composiciones de vacuna de ácidos nucleicos pueden administrarse al sujeto usando métodos conocidos. A este respecto, se han descrito diversas técnicas para la inmunización con ADN que codifican para antígenos. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.589.466 concedida a Felgner *et al.*; Tang *et al.* (1992) Nature 358:152; Davis *et al.* (1993) Hum. Molec. Genet. 2:1847; Ulmer *et al.* (1993) Science 258:1745; Wang *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4156; Eisenbraun *et al.* (1993) DNA Cell Biol. 12:791; Fynan *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:12476; Fuller *et al.* (1994) AIDS Res. Human Retrovir. 10:1433; y Raz *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9519. También pueden usarse métodos generales para administrar moléculas de ácido nucleico a células *in vitro*, para la posterior reintroducción en el huésped, tales como transferencia génica mediada por liposomas. Véanse, por ejemplo, Hazinski *et al.* (1991) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 4:206-209; Brigham *et al.* (1989) Am. J. Med. Sci. 298:278-281; Canonico *et al.* (1991) Clin. Res. 39:219A; y Nabel *et al.* (1990) Science 249:1285-1288. Por tanto, las composiciones de vacuna de ácidos nucleicos pueden administrarse en forma o bien de líquido o bien particulada usando una variedad de técnicas conocidas. Las composiciones de vacuna típicas se describen más completamente a continuación.

5. Métodos de inmunización basados en proteínas

También pueden producirse composiciones de vacuna basadas en péptidos usando una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. En particular, pueden aislarse inmunógenos de miostatina directamente de fuentes nativas, usando técnicas de purificación convencionales. Alternativamente, los inmunógenos pueden producirse de manera recombinante usando los sistemas de expresión de ácido nucleico descritos anteriormente, y purificarse usando técnicas conocidas. También pueden sintetizarse inmunógenos peptídicos, basándose en secuencias de aminoácidos descritas o secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de ADN de una molécula de interés, usando síntesis de polímeros químicos tales como síntesis de péptidos en fase sólida. Tales métodos los conocen los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, J. M. Stewart y J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) y G. Barany y R. B. Merrifield, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, editores E. Gross y J. Meienhofer, Vol. 2, Academic Press, Nueva York, (1980), págs. 3-254, para técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida; y M. Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlín (1984) y E. Gross y J. Meienhofer, Eds., The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, citado anteriormente, Vol. 1, para la síntesis en disolución clásica.

También pueden producirse inmunógenos peptídicos clonando las secuencias codificantes para los mismos en cualquier vector de expresión o replicón adecuado. Los expertos en la técnica conocen numerosos vectores de clonación, y la selección de un vector de clonación apropiado es una cuestión optativa. Los ejemplos de vectores de ADN recombinante para clonación, y las células huésped que pueden transformar, incluyen el bacteriófago lambda (*E. coli*), pBR322 (*E. coli*), pACYC177 (*E. coli*), pKT230 (bacterias gram-negativas), pGV1106 (bacterias gram-negativas), pLAFR1 (bacterias gram-negativas), pME290 (bacterias gram-negativas distintas a *E. coli*), pHV14 (*E. coli* y *Bacillus subtilis*), pBD9 (*Bacillus*), pIJ61 (*Streptomyces*), pUC6 (*Streptomyces*), Ylp5 (*Saccharomyces*), YCp19 (*Saccharomyces*) y virus del papiloma bovino (células de mamífero). Véanse, generalmente, DNA Cloning: Vols. I & II, citado anteriormente; Sambrook *et al.*, citado anteriormente; B. Perbal, citado anteriormente.

Por ejemplo, se ha determinado la secuencia codificante para la miostatina de varias especies de vertebrados, incluyendo ratón, rata, ser humano, babuino, ganado, cerdo, oveja, pollo y pavo. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.827.733 y el n.º de registro de NCBI U84OC5 para la secuencia de nucleótidos de miostatina murina; la patente estadounidense n.º 5.827.733, la publicación internacional n.º WO 98/33887 y el n.º de registro de NCBI AFO19627 para la secuencia de nucleótidos de miostatina humana; la figura 16A en el presente documento, así como las publicaciones internacionales n.ºs WO 99/02667 y WO 98/33887 y el n.º de registro de NCBI AFO19620 para la secuencia de nucleótidos de miostatina bovina; n.º de registro de NCBI AFO19626 para la secuencia de nucleótidos de miostatina de pez cebra; la publicación internacional n.º WO 98/33887, para las secuencias de nucleótidos de miostatina de rata (véase, también n.º de registro de NCBI AFO19624), babuino (véase, también el n.º de registro de NCBI AFO19619), porcina (véase, también el n.º de registro de NCBI AFO19623), ovina (véase, también el n.º de registro de NCBI AFO19622), de pollo (véase, también el n.º de registro de NCBI AFO19621) y de pavo (véase también el n.º de registro de NCBI AFO19625). La secuencia de miostatina está sumamente conservada a lo largo de todas estas especies.

Partes de estas secuencias que codifican para péptidos de miostatina deseados, y si se desea, una secuencia que codifica para una proteína transportadora, pueden clonarse, aislarse y ligarse entre sí usando técnicas recombinantes generalmente conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

El gen puede ponerse bajo el control de un promotor, sitio de unión a ribosoma (para expresión bacteriana) y, opcionalmente, un operador, de modo que la secuencia de ADN de interés se transcribe en ARN mediante un transformante adecuado. La secuencia codificante puede contener o no un péptido señal o una secuencia líder. Los inmunógenos peptídicos pueden expresarse usando, por ejemplo, el promotor tac de *E. coli* o el promotor del gen de la proteína A (spa) y la secuencia señal. Pueden eliminarse las secuencias líder por el huésped bacteriano en el procesamiento postraduccion. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.431.739; 4.425.437; 4.338.397. También pueden estar presentes secuencias secundarias, tales como las descritas anteriormente.

Además de secuencias de control, puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión de las secuencias de inmunógeno con relación al crecimiento de la célula huésped. Los expertos en la técnica conocen secuencias reguladoras, y los ejemplos incluyen las que provocan la expresión de un gen que va a activarse y desactivarse en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. También pueden estar presentes otros tipos de elementos reguladores en el vector, por ejemplo, secuencias potenciadoras.

Se construye un vector de expresión de modo que la secuencia codificante particular está ubicada en el vector con las secuencias reguladoras apropiadas, siendo la situación y orientación de la secuencia codificante con respecto a las secuencias de control tales que la secuencia codificante se transcribe bajo el "control" de las secuencias de control (es decir, ARN polimerasa que se une a la molécula de ADN en las secuencias de control transcribe la secuencia codificante). La modificación de las secuencias que codifican para el inmunógeno de miostatina particular puede ser deseable para lograr este fin. Por ejemplo, en algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia de modo que pueda unirse a las secuencias de control en la orientación apropiada; es decir, para mantener el marco de lectura. Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden ligarse a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector, tal como los vectores de clonación descritos anteriormente. Alternativamente, la secuencia codificante puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado.

En algunos casos, puede ser deseable añadir secuencias que provocan la secreción del inmunógeno desde el organismo huésped, con la escisión posterior de la señal secretora. También puede ser deseable producir mutantes o un análogo del inmunógeno. Pueden prepararse mutantes o análogos mediante la delección de una parte de la secuencia que codifica para el inmunógeno, o si está presente, una parte de la secuencia que codifica para la molécula transportadora deseada, mediante la inserción de una secuencia, y/o mediante la sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia. Los expertos en la técnica conocen bien técnicas para modificar secuencias de nucleótidos, tales como mutagénesis dirigida al sitio, y similares. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente; DNA Cloning, Vols. I y II, citado anteriormente; *Nucleic Acid Hybridization*, citado anteriormente; Kunkel, T.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:448; Geisselsoder *et al.* BioTechniques (1987) 5:786; Zoller y Smith, Methods Enzymol. (1983) 100:468; Dalbie-McFarland *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79:6409.

Los inmunógenos de miostatina pueden expresarse en una amplia variedad de sistemas, incluyendo sistemas de expresión de insectos, de mamíferos, bacterianos, virales y de levaduras, todos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los sistemas de expresión de células de insectos, tales como sistemas de baculovirus, los conocen los expertos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987). Los materiales y métodos para los sistemas de expresión de baculovirus/células de insectos están disponibles comercialmente en forma de kit de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBac"). De manera similar, se conocen bien en la técnica sistemas de expresión bacterianos y de células de mamíferos y se describen en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente. Los sistemas de expresión de levaduras también se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Yeast Genetic Engineering (Barr *et al.*, eds., 1989) Butterworths, Londres.

También se conocen varias células huésped apropiadas para su uso con los sistemas anteriores. Por ejemplo, se conocen en la técnica líneas celulares de mamífero e incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), tales como, pero sin limitarse a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovino Madin-Darby ("MDBK"), así como otras. De manera similar, huéspedes bacterianos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus spp.*, encontrarán uso con los presentes constructos de expresión. Los huéspedes de levaduras útiles en la presente invención incluyen entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Las células de insectos para su uso con vectores de expresión de baculovirus incluyen, entre otros, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*.

Dependiendo del sistema de expresión y el huésped seleccionados, los inmunógenos de miostatina se producen haciendo crecer células huésped transformadas mediante un vector de expresión descrito anteriormente en condiciones mediante las cuales se expresa el inmunógeno. Entonces se aísla el inmunógeno expresado de las

células huésped y se purifica. Si el sistema de expresión secreta el inmunógeno en medios de crecimiento, el producto puede purificarse directamente de los medios. Si no se secreta, puede aislarse de lisados celulares. La selección de las condiciones de crecimiento y los métodos de recuperación apropiados están dentro del conocimiento de la técnica.

Una vez obtenidos, los péptidos de miostatina, con o sin transportador asociado, pueden formularse en composiciones de vacuna, tales como las composiciones de vacuna descritas adicionalmente a continuación, para provocar la producción de anticuerpos en un sujeto vertebrado.

6. Producción de anticuerpos

Los péptidos de miostatina objeto pueden usarse para generar anticuerpos para su uso en métodos de inmunización pasiva o para fines de inmunopurificación o inmunodiagnóstico. Normalmente, los péptidos útiles para producir anticuerpos tendrán habitualmente al menos aproximadamente 3-5 aminoácidos de longitud, preferiblemente 7-10 aminoácidos de longitud, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente de 10 a 15 aminoácidos de longitud, o más.

Los anticuerpos frente a los inmunógenos objeto incluyen preparaciones de anticuerpos policlonales y monoclonales, antisueros mono-específicos, así como preparaciones que incluyen anticuerpos híbridos, anticuerpos alterados, fragmentos F(ab')₂, fragmentos F(ab), fragmentos F_v, anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y fragmentos funcionales de los mismos, que conservan la especificidad por la molécula diana en cuestión. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir regiones variables, o fragmentos de regiones variables, que conservan la especificidad por las moléculas en cuestión. La parte restante del anticuerpo puede derivarse de la especie en la que se usará el anticuerpo. Por tanto, si el anticuerpo va a usarse en un ser humano, el anticuerpo puede "humanizarse" para reducir la inmunogenicidad aunque conservando la actividad. Para una descripción de anticuerpos quiméricos, véanse, por ejemplo, Winter, G. y Milstein, C. (1991) *Nature* 349:293-299; Jones, P.T. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann, L. *et al.* (1988) *332*:323-327; y Carter, P. *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289. Tales anticuerpos quiméricos pueden contener no sólo sitios de combinación para la molécula diana, sino también sitios de unión para otras proteínas. De esta manera, pueden generarse reactivos bifuncionales con especificidad dirigida frente a antígenos tanto externos como internos.

Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado, (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con el antígeno deseado, o su fragmento, o un antígeno mutado, tal como se describió anteriormente. Antes de la inmunización, puede ser deseable aumentar adicionalmente la inmunogenicidad de un inmunógeno particular. Esto puede lograrse de una cualquiera de varias maneras conocidas por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, la inmunización para la producción de anticuerpos se realiza generalmente mezclando o emulsionando la proteína en un excipiente adecuado, tal como solución salina, preferiblemente en un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund, o cualquiera de los adyuvantes descritos a continuación, e inyectando la mezcla o inyección por vía parenteral (generalmente por vía subcutánea o por vía intramuscular). Se realiza una inmunización de refuerzo del animal generalmente 2-6 semanas más tarde con una o más inyecciones de la proteína en solución salina, preferiblemente usando adyuvante incompleto de Freund, o similar. También pueden generarse anticuerpos mediante inmunización *in vitro*, usando métodos conocidos en la técnica. Entonces se obtienen antisueros policlonales a partir del animal inmunizado y se tratan según procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, Jurgens *et al.* (1985) *J. Chrom.* 348:363-370. Si se usa suero que contiene anticuerpos policlonales, pueden purificarse los anticuerpos policlonales mediante cromatografía de inunoafinidad, usando procedimientos conocidos.

Los anticuerpos monoclonales se preparan generalmente usando el método de Kohler y Milstein, *Nature* (1975) 256:495-96, o una modificación del mismo. Normalmente, se inmuniza un ratón o una rata tal como se describió anteriormente. Sin embargo, más que obtener sangre del animal para extraer el suero, se extirpa el bazo (y opcionalmente varios ganglios linfáticos grandes) y se disocia en células individuales. Si se desea, pueden examinarse células del bazo (tras la retirada de células adherentes de manera no específica) aplicando una suspensión celular a una placa o un pocillo recubierto con el antígeno de la proteína. Células B, que expresan inmunoglobulina unida a membrana específica para el antígeno, se unirán a la placa, y no se eliminan por lavado con el resto de la suspensión. Entonces se induce que las células B resultantes, o todas las células de bazo disociadas, se fusionen con células de mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, hipoxantina, aminopterina, medio de timidina, "HAT"). Se siembran en placa los hibridomas resultantes mediante dilución limitante, y se someten a ensayo para determinar la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de inmunización (y que no se unen a antígenos no relacionados). Entonces se cultivan los hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales seleccionados o bien *in vitro* (por ejemplo, en frascos de cultivo tisular o reactores de fibra hueca) o bien *in vivo* (como ascitis en ratones). Véanse, por ejemplo, M. Schreier *et al.*, *Hybridoma Techniques* (1980); Hammerling *et al.*, *Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas* (1981); Kennett *et al.*, *Monoclonal Antibodies* (1980); véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 4.341.761; 4.399.121; 4.427.783; 4.444.887; 4.452.570; 4.466.917; 4.472.500. 4.491.632; y 4.493.890. Pueden examinarse paneles de anticuerpos monoclonales producidos frente al péptido de miostatina de interés, o fragmento del mismo, para determinar diversas propiedades; es decir, para determinar el isotipo, epítipo, afinidad, etc.

También pueden producirse fragmentos funcionales de los anticuerpos frente al péptido de miostatina de interés y pueden prepararse escindiendo una región constante, no responsable de la unión al antígeno, a partir de la molécula de anticuerpo, usando por ejemplo, pepsina, para producir fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos contendrán dos sitios de unión a antígeno, pero carecen de una parte de la región constante de cada una de las cadenas pesadas. De manera similar, si se desea, pueden producirse fragmentos Fab, que comprenden un único sitio de unión a antígeno, por ejemplo, mediante digestión de anticuerpos policlonales o monoclonales con papaína. También pueden producirse fragmentos funcionales, que incluyen sólo las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, usando técnicas convencionales. Estos fragmentos se conocen como F_v .

También pueden producirse anticuerpos quiméricos o humanizados usando los inmunógenos objeto. Estos anticuerpos pueden diseñarse para minimizar las reacciones inmunológicas no deseadas atribuibles a las regiones variables de entramado específicas de la especie y constantes heterólogas presentes normalmente en anticuerpos monoclonales y policlonales. Por ejemplo, si los anticuerpos van a usarse en sujetos humanos, pueden crearse anticuerpos quiméricos sustituyendo regiones constantes no humanas, en cualquiera de las cadenas pesadas y ligeras, o ambas, por regiones constantes humanas, usando técnicas generalmente conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Winter, G. y Milstein, C. (1991) *Nature* 349:293-299; Jones, P.T. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann, L. *et al.* (1988) *332*:323-327; y Carter, P. *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289.

7. Composiciones de vacuna

Una vez que se producen las moléculas anteriores, se formulan en composiciones de vacuna para la administración a un sujeto vertebrado. La molécula de miostatina relevante se administra sola, o mezclada con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Vehículos adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similar, y combinaciones de los mismos. Además, el vehículo puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH o adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna. A continuación se describen adicionalmente adyuvantes adecuados. Se conocen métodos reales de preparación de tales formas de dosificación por, o resultarán evidentes para, los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 18ª edición, 1990. La composición o formulación que va a administrarse contendrá una cantidad del inmunógeno de miostatina adecuada para lograr el estado inmunizado deseado en el sujeto que está tratándose.

Tal como se explicó anteriormente, las composiciones de vacuna pueden incluir adyuvantes para aumentar adicionalmente la inmunogenicidad del inmunógeno de miostatina. Los adyuvantes pueden incluir por ejemplo, emulsionantes, muramilo dipéptidos, avridina, hidróxido de aluminio, aceites, saponinas y otras sustancias conocidas en la técnica. Por ejemplo, los compuestos que pueden servir como emulsionantes en el presente documento incluyen agentes emulsionantes naturales y sintéticos, así como compuestos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Entre los compuestos sintéticos, los agentes emulsionantes aniónicos incluyen, por ejemplo, las sales de potasio, sodio y amonio del ácido láurico y oleico, las sales de calcio, magnesio y aluminio de ácidos grasos (es decir, jabones metálicos) y sulfonatos orgánicos tales como laurilsulfato de sodio. Los agentes catiónicos sintéticos incluyen, por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio, mientras que los agentes no iónicos sintéticos se ejemplifican mediante ésteres de glicerilo (por ejemplo, monoestearato de glicerilo), ésteres y éteres de polioxietilenglicol, y los ésteres de sorbitano de ácidos grasos (por ejemplo, monopalmitato de sorbitano) y sus derivados de polioxietileno (por ejemplo, monopalmitato de sorbitano y polioxietileno). Los agentes emulsionantes naturales incluyen goma arábiga, gelatina, lecitina y colesterol.

Otros adyuvantes adecuados pueden formarse con un componente de aceite, tal como un único aceite, una mezcla de aceites, una emulsión de agua en aceite, o una emulsión de aceite en agua. El aceite puede ser un aceite mineral, un aceite vegetal o un aceite animal. Se prefieren aceite mineral, o emulsiones de aceite en agua en las que el componente de aceite es aceite mineral. A este respecto, un "aceite mineral" se define en el presente documento como una mezcla de hidrocarburos líquidos obtenidos a partir de vaselina mediante una técnica de destilación; el término es sinónimo a "parafina líquida", "vaselina líquida" y "aceite mineral blanco". El término también pretende incluir "aceite mineral ligero", es decir, un aceite que se obtiene de manera similar mediante destilación de vaselina, pero que tiene una densidad relativa ligeramente menor que el aceite mineral blanco. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, citado anteriormente. Un componente de aceite particularmente preferido es la emulsión de aceite en agua vendida como el nombre comercial de EMULSIGEN PLUS™ (que comprende un aceite mineral ligero así como formalina al 0,05% y gentamicina 30 mcg/ml como conservantes), disponible de MVP Laboratories, Ralston, Nebraska, o el adyuvante VSA-3 que es una forma modificada del adyuvante EMULSIGEN PLUS™. Los aceites animales adecuados incluyen, por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceite de halibut, aceite de lacha tirana, aceite de reloj anaranjado y aceite de hígado de tiburón, todos los cuales están disponibles comercialmente. Los aceites vegetales adecuados, incluyen, sin limitación, aceite de canola, aceite de almendras, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soja, y similares.

Alternativamente, varias bases nitrogenadas alifáticas pueden usarse como adyuvantes con las formulaciones de

vacuna. Por ejemplo, los adyuvantes inmunológicos conocidos incluyen aminas, compuestos de amonio cuaternario, guanidinas, benzamidas y tiuronios (Gall, D. (1966) *Immunology* 11:369-386). Los compuestos específicos incluyen bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) (disponible de Kodak) y N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxietil)propanodiamina ("avridina"). Se ha descrito el uso de DDA como adyuvante inmunológico; véanse, por ejemplo, the Kodak Laboratory Chemicals Bulletin 56(1):1-5 (1986); Adv. Drug Deliv. Rev. 5(3):163-187 (1990); J. Controlled Release 7:123-132 (1988); Clin. Exp. Immunol. 78(2):256-262 (1989); J. Immunol. Methods 97 (2):159-164 (1987); *Immunology* 58 (2):245-250 (1986); e Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 68(3):201-208 (1982). La avridina es también un adyuvante muy conocido. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.310.550 concedida a Wolff, III *et al.*, que describe el uso de N,N-alkil superior-N',N'-bis(2-hidroxietil)propanodiaminas en general, y la avridina en particular, como adyuvantes de vacuna. La patente estadounidense n.º 5.151.267 concedida a Babiuk, y Babiuk *et al.* (1986) *Virology* 159:57-66, también se refieren al uso de avridina como adyuvante de vacuna.

Las composiciones de vacuna también pueden incluir sustancias secundarias, tales como agentes farmacológicos, citocinas, u otros modificadores de la respuesta biológica. Otras sustancias secundarias incluyen, pero no se limitan a, sustancias para incrementar el aumento de peso, la masa muscular o la resistencia muscular, tales como hormonas de crecimiento, agentes que fomentan el crecimiento, beta-antagonistas, agentes de reparto y antibióticos.

Las vacunas se preparan normalmente como inyectables, o bien como disoluciones o suspensiones líquidas, o bien como formas sólidas que son adecuadas para disolución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o puede encapsularse el principio activo en vehículos liposomales u otros portadores particulados usados.

Las composiciones de vacuna también pueden prepararse en forma sólida. Por ejemplo, pueden prepararse formulaciones particuladas sólidas para la administración desde dispositivos inyectores sin agujas disponibles comercialmente. Alternativamente, pueden proporcionarse implantes de dosis sólidos para la implantación en un sujeto. También pueden usarse formulaciones de liberación controlada o sostenida y se preparan incorporando los inmunógenos de miostatina en portadores o vehículos tales como liposomas, polímeros impermeables no reabsorbibles tales como copolímeros de etileno-acetato de vinilo y copolímeros Hytrel®, polímeros hinchables tales como hidrogeles, o polímeros reabsorbibles tales como colágeno y determinados poliácidos o poliésteres tales como los usados para preparar suturas reabsorbibles.

Además, los inmunógenos pueden formularse en composiciones de vacuna en formas o bien neutras o bien de sal. Las sales farmacéuticamente aceptable incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de los polipéptidos activos) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas a partir de grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, y similares.

La composición de vacuna se formula para que contenga una cantidad eficaz del inmunógeno de miostatina, determinándose fácilmente la cantidad exacta por un experto en la técnica, en la que la cantidad depende del animal que vaya a tratarse, la capacidad del sistema inmunitario del animal para sintetizar anticuerpos, y el grado de inmunoneutralización de miostatina deseado. Las formulaciones de vacuna que incluyen de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1 mg, más generalmente de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 200 µg de inmunógeno por dosis de disolución inyectada deben ser adecuadas para producir una respuesta inmunológica cuando se administran. Si se usa una quimera de péptido-transportador, la razón de inmunógeno con respecto a transportador en la formulación de vacuna variará basándose en el transportador e inmunógeno particulares seleccionados para construir tales moléculas. Las dosificaciones eficaces pueden establecerse fácilmente por un experto habitual en la técnica a través de ensayos rutinarios que establecen curvas de dosis-respuesta.

El sujeto se inmuniza mediante la administración de una de las composiciones de vacuna descritas anteriormente en al menos una dosis, y preferiblemente dos o más dosis. Además, pueden administrarse al animal tantas dosis como se requiera para mantener un estado de inmunidad.

Puede emplearse cualquier medio de administración farmacéutico adecuado para administrar la composición de vacuna al sujeto vertebrado. Por ejemplo, jeringas con aguja convencionales, inyectores de resorte o gas (aire) comprimido (patentes estadounidenses n.ºs 1.605.763 concedida a Smoot; 3.788.315 concedida a Laurens; 3.853.125 concedida a Clark *et al.*; 4.596.556 concedida a Morrow *et al.*; y 5.062.830 concedida a Dunlap), inyectores de chorro de líquido (patentes estadounidenses n.ºs 2.754.818 concedida a Scherer; 3.330.276 concedida a Gordon; y 4.518.385 concedida a Lindmayer *et al.*), e inyectores de partículas (patentes estadounidenses n.ºs 5.149.655 concedida a McCabe *et al.* y 5.204.253 concedida a Sanford *et al.*) son todos apropiados para la administración de las composiciones de vacuna.

Preferiblemente, la composición de vacuna se administra por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía

intravenosa, por vía subdérmica o por vía intradérmica, al sujeto. Si se usa un inyector de chorro, se expulsa un único chorro de la composición de vacuna líquida a alta presión y velocidad, por ejemplo, 1200-1400 PSI, creando de ese modo una abertura en la piel y penetrando hasta profundidades adecuadas para la inmunización.

- 5 A continuación se facilitan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos únicamente, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

C. Parte experimental

10

Ejemplo 1

Identificación de péptidos de miostatina inmunogénicos

- 15 Se identificaron varias regiones de las moléculas de miostatina bovina como potencialmente inmunogénicas basándose en análisis informáticos de las moléculas de longitud completa usando diversos programas informáticos. Un programa usado formula escalas de hidropatía a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína basándose en las propiedades hidrófobas e hidrófilas de cada uno de los 20 aminoácidos. Hopp y Woods, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78:3824-3828. La figura 17 representa un perfil de hidrofiliidad calculado usando una longitud de grupo promedio de seis aminoácidos. Se encontraron los tres mayores puntos de hidrofiliidad de las moléculas de miostatina en las posiciones de aminoácido 263-268, lo que abarca el sitio de escisión proteolítica y tiene la secuencia de aminoácidos Lys-Arg-Ser-Arg-Arg-Asp (SEQ ID NO: 37); las posiciones 31-37 que tiene la secuencia de aminoácidos Lys-Glu-Asn-Val-Glu-Lys-Glu (SEQ ID NO: 38); y las posiciones 106-111 que tienen la secuencia de aminoácidos Ser-Leu-Lys-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 39).

25

También se realizó el análisis de la proteína usando el programa PC/Gene, versión 6.60 (Intelligenetics Inc., Ginebra, Suiza). Se llevó a cabo el análisis tridimensional de la proteína miostatina usando Swiss-Pdb Viewer v2.6 (<http://expasy.hcuge.ch/espdbv/mainpage.html>).

30

A partir de esta información, se diseñó una serie de oligómeros de ADN representativos y se construyó con un sintetizador de ADN Oligo 1000M de Beckman usando la química de la fosoramidita. Los oligómeros se denominaron MYOS 1-20. Myos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 (mostrados en las figuras 2 a 11, respectivamente) incluyen partes de la hebra codificante de ADN mientras que MYOS 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 incluyen partes de la hebra complementaria. La posición de estos péptidos con referencia a las moléculas de longitud completa de miostatina se muestra en la figura 12.

35

Los oligómeros de ADN codificados para péptidos con de 12 a 23 aminoácidos, flanqueados por ligadores de 2 aminoácidos para el ligamiento a una molécula transportadora (véase adicionalmente a continuación). Estos péptidos representaban colectivamente toda la parte activa de la proteína, así como tres secciones individuales en el sentido de 5' con respecto al sitio de escisión proteolítica que libera la proteína activa.

40

En particular, basándose en análisis informáticos, se seleccionaron tres partes de la proteína activa como dianas de inmunización primarias. Se preparó la primera parte combinando el par de oligonucleótidos designado como MYOS 1 y 2 y que contenía el sitio de escisión proteolítica y el extremo N-terminal de la proteína activa. MYOS 1 proporcionó la mayor clasificación de determinante antigénico usando el programa informático de Hopp y Woods (véase la figura 17). El análisis tridimensional de la parte activa de miostatina mostró que el péptido MYOS 1 está expuesto en la superficie de la proteína y por tanto es probable que lo detecte el sistema inmunitario. MYOS 1 también se solapa con el sitio de escisión proteolítica, que libera la parte activa de la proteína. El bloqueo de este sitio usando anticuerpos contra el mismo impide la escisión de la proteína y la liberación de la parte activa de la proteína para impedir su efecto sobre el tejido muscular.

50

Se seleccionaron otros dos segmentos de la proteína activa (MYOS 5 y 6 y MYOS 9 y 10) debido a que parecían formar un bucle y una hélice basándose en un análisis de la estructura tridimensional. Es probable que esta estructura de bucle esté expuesta en la superficie de la proteína y por tanto pueda detectarse por el sistema inmunitario. Es probable que los anticuerpos generados contra estas partes de las moléculas se unan a la proteína miostatina y la retiren de la circulación. Se reconstruyó el resto de la parte activa de la proteína a partir de los pares de oligonucleótidos (MYOS 3 y 4, MYOS 7 y 8, MYOS 11 y 12, MYOS 13 y 14). El uso de toda la parte activa garantiza la estructura tridimensional apropiada para provocar una respuesta inmunitaria eficaz. Se seleccionó una de las regiones en el sentido de 5' con respecto a la parte activa de la proteína, (MYOS 15 y 16) basándose en análisis informáticos de probables epítomos antigénicos. Se seleccionaron las otras dos partes en el sentido de 5' con respecto a la proteína para que contuviesen el sitio de escisión proteolítica (MYOS 19 y 20, que contienen el sitio de escisión y los aminoácidos inmediatamente en el sentido de 5' con respecto al sitio de escisión) o estuviesen cerca del mismo (MYOS 17 y 18) de modo que un anticuerpo que se une con el sitio interfiriese en la actividad proteasa.

65

Basándose en comparación con otras secuencias de proteínas conocidas, la miostatina tiene áreas de homología

con otras proteínas del factor de crecimiento transformante β . La proteína morfogenética ósea 6 (BMP-6) tiene una gran cantidad de homología con las regiones intermedia y C-terminal de la parte activa de miostatina.

Ejemplo 2

Construcción de pCB150

Se diseñaron los oligómeros anteriores para fusionarse en el extremo 3'-terminal de un polinucleótido que codifica para una proteína transportadora de leucotoxina (LKT) de 52 kDa, denominada "LKT 114" en el presente documento. Se derivó este polinucleótido del gen *lktA* presente en el plásmido pCB114, descrito en la patente estadounidense n.º 5.837.268. Este plásmido, la secuencia de nucleótidos de este gen y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestran en las figuras 15A-15D en el presente documento y también se describen en la patente estadounidense n.º 5.837.268. El gen codifica para una versión acortada de leucotoxina que se desarrolló a partir del gen de la leucotoxina recombinante presente en el plásmido pAA352 (n.º de registro de ATCC 68283 y descrito en la patente estadounidense 5.476.657) mediante la eliminación de un fragmento de ADN interno de aproximadamente 1300 pb de longitud. El polipéptido LKT 114 tiene un peso molecular estimado de 52 kDa y contiene sitios de restricción convenientes para su uso en la producción de las proteínas de fusión de la presente invención.

Se preparó el plásmido pCB150, que contiene la secuencia codificante para LKT 114, en la que se clonaron los oligonucleótidos MYOS, tal como sigue. Se aisló el gen de la leucotoxina tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 5.476.657 y 5.837.268. En particular, para aislar el gen de la leucotoxina, se construyeron bibliotecas génicas de *P. haemolytica* A1 (cepa B122) usando técnicas convencionales. Véanse, Lo *et al.*, Infect. Immun., citado anteriormente; DNA CLONING: Vols. I y II, citado anteriormente; y Sambrook *et al.*, citado anteriormente. Se construyó una biblioteca genómica en el vector de plásmido pUC13 y se construyó una biblioteca de ADN en el bacteriófago lambda gt11. Se usaron los clones resultantes para transformar *E. coli* y se reunieron las colonias individuales y se examinaron para determinar la reacción con suero de un ternero que había sobrevivido a una infección por *P. haemolytica* y que se había sometido a inmunización de refuerzo con un sobrenadante de cultivo concentrado de *P. haemolytica* para aumentar los niveles de anticuerpos anti-leucotoxina. Se examinaron las colonias positivas para determinar su capacidad para producir leucotoxina incubando lisados celulares con neutrófilos bovinos y posteriormente midiendo la liberación de lactato deshidrogenasa desde estos últimos.

Se identificaron varias colonias positivas y se analizaron estos recombinantes mediante mapeo con endonucleasas de restricción. Un clon pareció ser idéntico al gen de la leucotoxina clonado previamente. Véase, Lo *et al.*, Infect. Immun., citado anteriormente. Para confirmar esto, se volvieron a clonar fragmentos más pequeños y se compararon los mapas de restricción. Se determinó que se habían clonado aproximadamente 4 kilopares de bases de ADN. Progresivamente, se aislaron clones más grandes llevando a cabo un paseo cromosómico (sentido de 5' a 3') para aislar recombinantes de longitud completa que tenían aproximadamente 8 kb de longitud. El constructo final se denominó pAA114. Este constructo contenía toda la secuencia del gen de la leucotoxina.

Se trató *lktA*, un fragmento de endonucleasa de restricción *MaeI* procedente de pAA114 que contenía todo el gen de la leucotoxina, con el fragmento Klenow de ADN polimerasa I más nucleótidos trifosfato y se ligaron en el sitio *SmaI* del vector de clonación pUC13. Este plásmido se denominó pAA179. A partir de este, se prepararon dos constructos de expresión en el vector basado en *ptac*, pGH432:*lacI* digerido con *SmaI*. Uno, pAA342, consistía en el fragmento 5'-*AhaIII* del gen *lktA* mientras que el otro, pAA345, contenía todo el fragmento *MaeI* descrito anteriormente. El clon pAA342 expresó un péptido de leucotoxina truncado a altos niveles mientras que pAA345 expresó leucotoxina de longitud completa a niveles muy bajos. Por tanto, se ligó el extremo 3' del gen *lktA* (fragmento *StyI* *BamHI* de pAA345) a pAA342 digerido con *StyI* *BamHI*, produciendo el plásmido pAA352. La leucotoxina de *P. haemolytica* producida a partir del constructo pAA352 se denomina a continuación en el presente documento LKT 352.

Entonces se usó el plásmido pAA352 para preparar una versión acortada del polipéptido de leucotoxina recombinante. Se produjo el gen de LKT acortada delecionando un fragmento de ADN interno de aproximadamente 1300 pb de longitud del gen de LKT recombinante tal como sigue. Se digirió el plásmido pCB113, (n.º de registro de ATCC 69749 y descrito en la patente estadounidense n.º 5.837.268) que incluye el polipéptido LKT 352 con la enzima de restricción *BstBI* (New England Biolabs). Entonces se digirió el plásmido linealizado resultante con una nucleasa Mung-Bean (Pharmacia) para eliminar los extremos terminales sobresalientes monocatenarios producidos por la digestión con *BstBI*. Entonces se digirió el ADN de extremos romos con la enzima de restricción *NaeI* (New England Biolabs), y se cargó el ADN digerido sobre un gel de agarosa al 1% en el que se separaron los fragmentos de ADN mediante electroforesis. Se aisló un fragmento de ADN grande de aproximadamente 6190 pb y se purificó del gel de agarosa usando un kit Gene Clean (Bio 101), y se permitió que el fragmento purificado se ligase a sí mismo usando la ADN ligasa del bacteriófago T4 (Pharmacia). Se usó la mezcla de ligamiento resultante para transformar células JM105 de *E. coli* competentes, y se identificaron los clones positivos por su capacidad para producir una proteína agregada que tienen un peso molecular apropiado. El plásmido recombinante así formado se designó como pCB114, (descrito en la patente estadounidense n.º 5.837.268), y produce un polipéptido de leucotoxina acortado denominado "LKT 114".

Entonces se usó el plásmido pCB114 para producir el plásmido pSLKT-30. Se preparó el plásmido pSLKT-30

clonando el fragmento que codifica para la leucotoxina de pCB114 mediante PCR en el plásmido pAA352 (n.º de registro de ATCC 68283 y descrito en la patente estadounidense 5.476.657). Al hacer esto, se introdujeron mutaciones cerca del extremo C-terminal, dando como resultados cambios de dos aminoácidos con respecto a la molécula de leucotoxina nativa. Por tanto, se clonó un fragmento de PCR del área afectada de vuelta en el plásmido pSLKT-30. Específicamente, se creó un fragmento de pSLKT-30 mediante PCR usando LKT6 (SEQ ID NO: 40) como cebador de PCR en el sentido de 5', y LKT13 (SEQ ID NO: 41) como cebador de PCR en el sentido de 3':

LKT6: TTA GAG AGT TAT GCC GAA CGC (SEQ ID NO: 40);

LKT13: GAT GCC ATC GCT AGC TAG CTA GGA TCC CCT AGC
AAA TTC AAG AGA AGA TAA ACT TTG ATC CAA CAT
TGA (SEQ ID NO: 41).

El fragmento contenía el cambio deseado y los sitios de restricción *Nsi*I y *Nco*I. Se digirió el fragmento aislado usando las enzimas de restricción *Nsi*I y *Nco*I, como lo fue el plásmido pSLKT-30. Se eliminó el fragmento *Nsi*I/*Nco*I del plásmido y se sustituyó por el fragmento de PCR, dando como resultado la retromutación en la secuencia original. El plásmido se denominó pCB150. Un diagrama del plásmido pCB150 se muestra en la figura 14. La secuencia de ácido nucleico de LKT 114 a partir del plásmido pCB150 se muestra en las figuras 15A-15D.

Ejemplo 3

Construcción de fusiones multiméricas de LKT-péptido de miostatina

Se usaron múltiples copias de cada par de oligómeros descrito en el ejemplo 1 para preparar repeticiones en tándem de secuencias codificantes para múltiplos de péptido de miostatina unidos al gen de LKT 114. También se reconstruyó toda la parte activa de la proteína y se fusionó a LKT 114 para su uso como agente de inmunización.

Se construyeron fusiones de LKT-péptido de miostatina representativas tal como sigue. Se hibridaron los pares de oligonucleótidos del ejemplo 1 y se ligaron en el vector pUC19 (Pharmacia) que se había digerido con la endonucleasa de restricción *Hinc*II. Se usó el ADN ligado para transformar *E. coli* cepa TOP10F' (Invitrogen). Se identificaron los transformantes que contenían los insertos de oligonucleótido mediante PCR y mapeo con endonucleasas de restricción.

Se diseñaron los pares de oligonucleótidos para unirse entre sí mediante ligamiento del sitio *Bam*HI en el extremo delantero de un par de oligonucleótidos al sitio *Bgl*II en el extremo trasero de una segunda copia del par de oligonucleótidos. Se inactivaron los sitios de restricción en el punto de ligación dejando un único sitio *Bam*HI en el extremo delantero de la repetición y un único sitio *Bgl*II en el extremo trasero de la repetición. Se construyeron repeticiones en tándem de cada par de oligonucleótidos mediante digestión del plásmido que contiene el oligonucleótido con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Bgl*II para liberar el fragmento de oligonucleótido insertado. Entonces se ligó este fragmento de vuelta en el plásmido que contiene el oligonucleótido, que se había digerido con la endonucleasa de restricción *Bgl*II. Se usó el ADN ligado para transformar *E. coli* cepa TOP10F'. Se identificaron los transformantes que contenían los insertos de oligonucleótido mediante PCR y mapeo con endonucleasas de restricción. Se repitió este proceso hasta que se produjeron los plásmidos pUC19 que contenían al menos cuatro copias de repetición y hasta 8 copias de cada par de oligonucleótidos en la orientación correcta.

Además de unirse a sí mismos, también se diseñaron algunos de los pares de oligonucleótidos para unirse entre sí para recrear la región activa de la proteína miostatina con la mayor precisión posible. Esto se realizó ligando el par de oligonucleótidos MYOS 3/4 que se cortaron con *Bam*HI, *Bgl*II, en el sitio *Bgl*II detrás del par de oligonucleótidos MYOS 1/2 en el vector pUC19. Esto estuvo seguido por el ligamiento en el par de oligonucleótidos MYOS 5/6 que se cortaron con *Bst*BI y *Bgl*II en el vector que contiene la región activa de miostatina reconstruida que se cortó con *Bst*BI y *Bgl*II. Se cortó el par de oligonucleótidos MYOS 7/8 con *Bam*HI y *Bgl*II y se ligaron en el vector que contiene la región activa de miostatina reconstruida, en el sitio *Bgl*II. Se cortó el par de oligonucleótidos MYOS 9/10 que contiene el vector con *Eco*RI y se ligó en el fragmento *Eco*RI procedente de la reconstrucción de miostatina. Se cortó el par de oligonucleótidos MYOS 11/12 con *Bam*HI y *Bgl*II y se ligaron en el vector que contiene la región activa de miostatina reconstruida, en el sitio *Bgl*II. Esto estuvo seguido por el ligamiento del par de oligonucleótidos MYOS 13/14 que se cortaron con *Bsm*I y *Bgl*II en el vector que contiene la región activa de miostatina reconstruida que se cortó con *Bsm*I y *Bgl*II. Esto completó la reconstrucción de la secuencia codificante para la región activa de miostatina, que contenía tres conjuntos de ligadores de dos aminoácidos insertados en la secuencia de la región activa de miostatina en las posiciones 55-60, 139-144 y 241-246 y en el extremo C-terminal (véase la figura 13).

Entonces se liberaron las múltiples copias de cada par de oligonucleótidos y la reconstrucción de la región activa de miostatina desde el plásmido pUC19 mediante digestión con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Bgl*II. Entonces se ligaron estos fragmentos de ADN en el plásmido pCB150. Se digirió el plásmido pCB150 con la endonucleasa de restricción *Bam*HI. Se usó el ADN ligado para transformar *E. coli* cepa TOP10F'. Se identificaron los transformantes que contenían los insertos de oligonucleótido mediante PCR y mapeo con endonucleasas de

restricción. Los plásmidos recombinantes se designaron como pJS121, pJS122, pJS123, pJS124, pJS125, pJS126, pJS127, pJS128, pJS129, pJS130 y pCB317.

El plásmido pJS121 contiene 6 copias de repetición del par de oligonucleótidos MYOS 1/2 fusionado a LKT 114. El plásmido pJS122 contiene 8 copias de repetición del par de oligonucleótidos MYOS 3/4 fusionado a LKT 114. El plásmido pJS123 contiene 8 copias de repetición del par de oligonucleótidos MYOS 5/6 fusionado a LKT 114. El plásmido pJS124 contiene 8 copias de repetición del par de oligonucleótidos MYOS 7/8 fusionado a LKT 114. El plásmido pJS125 contiene 6 copias de repetición del par de oligonucleótidos MYOS 9/10 fusionado a LKT 114. El plásmido pJS126 contiene 4 copias de repetición del par de oligonucleótidos MYOS 11/12 fusionado a LKT 114. El plásmido pJS127 contiene 6 copias de repetición del par de oligonucleótidos MYOS 13/14 fusionado a LKT 114. El plásmido pJS128 contiene 4 copias de repetición del par de oligonucleótidos MYOS 15/16 fusionado a LKT 114. El plásmido pJS129 contiene 8 copias de repetición del par de oligonucleótidos MYOS 17/18 fusionado a LKT 114. El plásmido pJS130 contiene 4 copias de repetición del par de oligonucleótidos MYOS 19/20 fusionado a LKT 114. El plásmido pCB317 contiene una única copia de la reconstrucción de la región activa de miostatina fusionada a LKT 114.

Ejemplo 4

Purificación de fusiones de LKT-péptido de miostatina

Se expresaron las proteínas de fusión de LKT-péptido de miostatina recombinantes anteriores como cuerpos de inclusión y se purificaron usando el siguiente procedimiento. Se inoculó un asa de células de cada disolución madre congelada, en 10 ml de caldo TB en un matraz Erlenmeyer de 50 ml. Se complementó el caldo TB con 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C durante 12-16 horas en un agitador Innova 4000 a 250 rpm. Se usó el cultivo para inocular un litro de caldo TB en un matraz Erlenmeyer de 4 l. Se complementó el caldo TB con 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C durante aproximadamente 3 horas en un agitador Innova 4000 a 250 rpm. Entonces se añadió 1 ml de una disolución 1 M de IPTG (isopropil-B,D-tiogalactopiranosido) al cultivo para inducir la producción de proteína recombinante. Entonces se incubó el cultivo durante unas dos horas más. Se recogieron las células mediante centrifugación durante 10 min a 6000 rpm en 3 frascos de polipropileno de 500 ml usando un rotor JA 10 en una centrífuga Avanti J25. Se resuspendió el sedimento celular en 40 ml de sacarosa al 25%, clorhidrato de Tris 50 mM, pH 8,0 y se congeló a -70°C durante 15 min. Se descongelaron las células congeladas, a temperatura ambiente y se mezclaron con 10 ml de lisozima (Sigma, 10 mg/ml en clorhidrato de Tris 250 mM, pH 8,0). Tras incubación durante 15 min en hielo, se añadieron 300 ml de tampón de lisis (Triton X100 al 2%, EDTA 50 mM, clorhidrato de Tris 100 mM, pH 8,0) y se mezcló mediante agitación. Entonces se sonicó la suspensión celular lisada durante 4 ráfagas de 30 segundos a toda potencia con una sonda grande en un sonicador Misonix. Se dividió la disolución en 2 frascos de centrífuga de 250 ml y se centrifugaron durante 25 min a 10000 rpm en un rotor JA 14. Se lavaron los sedimentos de cuerpos de inclusión mediante resuspensión en 100 ml de agua bidestilada y centrifugación para recoger los cuerpos de inclusión. Se repitió este procedimiento de lavado una vez más y se suspendió el sedimento de cuerpos de inclusión final en 10 ml de agua bidestilada y se almacenó a -20°C hasta que se necesitó.

Se sometieron a prueba todas las proteínas de fusión aisladas, mediante SDS-PAGE para determinar su identidad mediante el peso molecular, la concentración y la pureza, comparando las proteínas con patrones conocidos. Se solubilizaron alícuotas de 10 µl de cada proteína de fusión con 10 µl de urea 8 M y se mezclaron entonces 2 µl de la proteína solubilizada con 100 µl de tampón de carga para SDS-PAGE 1X. Se calentaron las muestras de tampón de carga hasta 94°C durante 5 min y se hicieron correr en un gel de poliacrilamida al 10%. También se hizo correr LKT 114 recombinante procedente de pCB150 como control.

Ejemplo 5

Efecto biológico *in vivo* de proteínas de fusión de LKT-péptido de miostatina

Para someter a prueba la capacidad de las proteínas de fusión que comprenden múltiples copias de diversos péptidos de miostatina fusionados a una proteína transportadora para manifestar un efecto biológico *in vivo*, se realizó el siguiente ensayo de vacunación. Se prepararon proteínas de fusión de LKT-péptido de miostatina recombinantes tal como se describió anteriormente. Se prepararon vacunas para cada una solubilizando cada una de las proteínas de fusión en una concentración final de urea 6 M (usada para la primera inyección) o guanidina-HCl 4 M (usada para todas las inyecciones posteriores). A alícuotas de 2,5 ml (usadas para las primeras dos inyecciones) o 1,5 ml (usadas para la última inyección) de adyuvante VSA-3 (un adyuvante de Emulsigen Plus modificado) se añadieron 1250 µg de cada proteína solubilizada y se mezclaron mediante 5 ráfagas de 5 s con un sonicador Misonix con una sonda con micropunta a un ajuste de potencia de 5. A estas mezclas, se añadieron 50 µl de una disolución de timerosal al 1% y PBS (solución salina tamponada con fosfato) pH 7,4 hasta un volumen final de 5 ml y se sonicaron de nuevo las mezclas. Se usó un volumen de 200 µl para cada inyección. Cada inyección contenía 50 µg de proteína de fusión. Se administró esta inyección inicial (día 0) a las 3-4 semanas de edad con inyecciones posteriores en los días 28 y 56.

Catorce grupos de tratamiento contenían cada uno 15 ratones CD1 Swiss. Los grupos de tratamiento eran tal como sigue (véase la tabla 1): grupo 1 control sin vacunación, grupo 2 control sólo con adyuvante, grupo 3 control con proteína transportadora pCB150, grupos 4 a 13 proteínas de prueba pJS121 a pJS130, grupo 14 proteína de prueba pCB317. Se pesaron semanalmente los ratones para determinar el aumento de peso a lo largo del transcurso del experimento de 98 días. Se resumen los resultados de este ensayo en la tabla 2 y la figura 18. Se usó guanidina-HCl como agente de solubilización de elección ya que parecía proporcionar una estabilidad mejorada de las proteínas con respecto a urea en la formulación de vacuna. Se redujo la concentración de VSA-3 desde el 50% hasta el 30% en la formulación de vacuna en un esfuerzo por reducir las reacciones en el sitio de inyección.

Tabla 1		
Grupo de tratamiento	Oligonucleótido Myos	Plásmido
1	-	-
2	-	-
3	-	pCB150
4	1	pJS121
5	3	pSJ122
6	5	pSJ123
7	7	pJS124
8	9	pJS125
9	11	pJS126
10	13	pJS127
11	15	pJS128
12	17	pJS129
13	19	PJS130
14	reconstrucción	pCB317

Tabla 2			
Grupo de tratamiento	Peso de grupo medio en día 0 $\pm$ EEM	Peso de grupo medio en día 98 $\pm$ EEM	Aumento de peso de grupo medio hasta el día 84 $\pm$ EEM
1 Control	16,67 $\pm$ 0,32	29,33 $\pm$ 0,71	12,67 $\pm$ 0,65
2 Control	16,11 $\pm$ 0,25	29,09 $\pm$ 0,79	12,99 $\pm$ 0,72
3 Control	16,05 $\pm$ 0,34	29,33 $\pm$ 0,70	13,27 $\pm$ 0,61
4 Prueba	16,39 $\pm$ 0,37	30,02 $\pm$ 0,60	13,63 $\pm$ 0,60
5 Prueba	15,52 $\pm$ 0,35	30,48 $\pm$ 0,84	14,96 $\pm$ 0,72
6 Prueba	15,78 $\pm$ 0,33	30,84 $\pm$ 0,99	15,06 $\pm$ 0,90
7 Prueba	15,72 $\pm$ 0,27	30,36 $\pm$ 0,76	14,64 $\pm$ 0,65
8 Prueba	15,46 $\pm$ 0,25	29,42 $\pm$ 0,84	13,96 $\pm$ 0,79
9 Prueba	15,32 $\pm$ 0,32	29,48 $\pm$ 0,54	14,16 $\pm$ 0,50
10 Prueba	16,44 $\pm$ 0,31	31,27 $\pm$ 0,92	14,85 $\pm$ 0,92
11 Prueba	16,30 $\pm$ 0,41	31,02 $\pm$ 0,70	14,72 $\pm$ 0,75
12 Prueba	15,54 $\pm$ 0,28	30,73 $\pm$ 0,71	15,19 $\pm$ 0,69
13 Prueba	15,57 $\pm$ 0,30	31,04 $\pm$ 0,96	15,47 $\pm$ 0,99
14 Prueba	15,51 $\pm$ 0,20	29,25 $\pm$ 0,62	13,73 $\pm$ 0,56

Ejemplo 6Análisis estadístico de los resultados de ensayo

5 Se realizó un análisis estadístico de los resultados de ensayo usando un paquete de software estadístico (Statistix versión 1.0). En este ensayo, todos los grupos control tenían pesos totales medios muy similares, mientras que varios grupos de prueba tuvieron pesos totales medios elevados. Se realizó un ANOVA de un factor sobre el aumento de peso a lo largo de los 98 días del experimento. Una prueba de comparación por LSD de las medias indicó que el grupo de tratamiento 13 era significativamente diferente de cualquiera de los grupos control. Los grupos de prueba 12 y 6 eran significativamente diferentes de dos de los tres grupos control. También se analizaron los grupos de tratamiento agrupándolos en los controles (grupos 1-3) y el grupo de prueba (grupos 4-14). Se realizó un ANOVA de un factor sobre los aumentos de peso de estos dos grupos. Una prueba de comparación por LSD de las medias indicó que el grupo que recibió un tratamiento de prueba era significativamente diferente del grupo control.

Depósitos de cepas útiles en la puesta en práctica de la invención

20 Se realizó un depósito de cultivos biológicamente puros de las siguientes cepas en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA. Se asignó el número de registro indicado tras pruebas de viabilidad satisfactorias, y de haberse pagado las tasas requeridas. Se realizaron los depósitos según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes y los Reglamentos del mismo (Tratado de Budapest). Esto garantiza el mantenimiento de cultivos viables durante un periodo de treinta (30) años desde la fecha del depósito y al menos cinco (5) años tras la petición más reciente para proporcionar una muestra del depósito por el depositario.

25 Los organismos se pondrán a disposición por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, que garantiza la disponibilidad permanente y sin restricciones de los cultivos a una persona que el Comisario de Patentes y Marcas de los Estados Unidos ha determinado que tiene derecho a ello según 35 U.S.C. §122 y las reglas del comisario en virtud del mismo (incluyendo 37 C.F.R. §1.12). Tras la concesión de una patente, todas las restricciones sobre la disponibilidad para el público de los cultivos depositados se eliminarán de manera irrevocable.

30 Estos depósitos se proporcionan meramente según convenga a los expertos en la técnica, y no son un reconocimiento de que se requiere un depósito según 35 U.S.C. §112. Las secuencias de ácido nucleico de estos plásmidos, así como las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificados por los mismos, se incorporan como referencia al presente documento y prevalecen en el caso de cualquier conflicto con la descripción en el presente documento. Puede requerirse una licencia para producir, usar o vender los materiales depositados, y no se concede por el presente documento tal licencia.

Cepa	Fecha de depósito	N.º ATCC
pAA352 en <i>E. coli</i> W1485	30 de marzo de 1990	68283
pCB113 en <i>E. coli</i> JM105	1 de febrero de 1995	69749

40 Por tanto, se dan a conocer péptidos inmunogénicos de miostatina, multímeros e inmunoconjugados, como los son métodos de preparación y uso de los mismos.

Lista de secuencias

45 <110> Metamorphix International, Inc

<120> COMPOSICIONES INMUNOLÓGICAS PARA MODULAR MIOSTATINA EN SUJETOS VERTEBRADOS

<130> P009750EPB

50 <150> Documento US 60/075.213

<151> 19-02-1998

<160> 39

55 <170> PatentIn Ver 2.0

<210> 1

<211> 1128

60 <212> ADN

<213> *Bos taurus*

<400> 1

```

atgcaaaaac tgcaaatctc tgtttatatt tacctattta cgctgattgt tgctggccca 60
gtggatctga atgagaacag cgagcagaag gaaaatgtgg aaaaagaggg gctgtgtaat 120
gcatgtttgt ggagggaaaa cactacatcc tcaagactag aagccataaa aatccaaatc 180
ctcagtaaac ttgcctgga aacagctcct aacatcagca aagatgctat cagacaactt 240
ttgccaagg ctcctccact cctggaactg attgatcagt tcgatgtcca gagagatgcc 300
agcagtgcgc gtccttgga agacgatgac taccacgcca ggacggaaac ggtcattacc 360
atgccacgg agtctgatct tctaacgcaa gtggaaggaa aacccaaatg ttgcttcttt 420
aaatttagct ctaagataca atacaataaa ctagtaaagg cccaactgtg gatatatctg 480
aggcctgtca agactcctgc gacagtgttt gtgcaaatcc tgagactcat caaacccatg 540
aaagacggta caaggtatac tggaaatcca tctctgaaac ttgacatgaa cccaggcact 600
ggtatttggc agagcattga tgtgaagaca gtgttgacaga actggctcaa acaacctgaa 660
tccaacttag gcattgaaat caaagcttta gatgagaatg gccatgatct tgctgtaacc 720
ttcccagaac caggagaaga tggactgact ccttttttag aagtcaaggt aacagacaca 780
ccaaaaagat ctaggagaga ttttgggctt gattgtgatg aacactccac agaatctoga 840
tgctgtcgct accccctcac ggtggatttt gaagcttttg gatgggattg gattattgca 900
cctaaaagat ataaggccaa ttactgctct ggagaatgtg aatttgtatt ttgcaaaag 960
tatcctcata cccatcttgt gcaccaagca aaccccagag gttcagccgg cccctgctgt 1020
actcctacaa agatgtctcc aattaatatg ctatatttta atggcgaagg acaaataata 1080
tacgggaaga ttccagccat ggtagtagat cgctgtgggt gctcatga 1128

```

5

<210> 2

<211> 375

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

10

<400> 2

ES 2 527 410 T3

Met Gln Lys Leu Gln Ile Ser Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Thr 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

5 <210> 3
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (60)
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 1, figura 2

15 <400> 3
 gga tcc cgt tct cgt cgc gac ttt ggt ctg gac tgc gac gaa cat tct 48
 Gly Ser Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser
 1 5 10 15
 acc gaa aga tct 60
 Thr Glu Arg Ser
 20

20 <210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 1, figura 2
 <400> 4
 Gly Ser Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser
 1 5 10 15
 Thr Glu Arg Ser
 20

30 <210> 5
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 3, figura 3

40 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(51)
 <400> 5
 gga tcc tct cgt tgc tgt cgc tat ccg ctg acc gtt gac ttc gaa aga 48
 Gly Ser Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Arg
 1 5 10 15
 tct 51
 Ser

45 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 3, figura 3

<400> 6

Gly Ser Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Arg
1 5 10 15

Ser

<210> 7

<211> 57

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 5, figura 4

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (57)

<400> 7

gga tcc ttc gaa gct ttt ggt tgg gac tgg atc att gca ccg aaa cgt 48
Gly Ser Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg
1 5 10 15

tat aga tct 57
Tyr Arg Ser

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 5, figura 4

<400> 8

Gly Ser Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg
1 5 10 15

Tyr Arg Ser

<210> 9

<211> 54

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 7, figura 5

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (54)

<400> 9

gga tcc aaa cgt tat aaa gct aac tat tgc tct ggt gaa tgc gaa ttc 48
Gly Ser Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe
1 5 10 15

aga tct 54
Arg Ser

<210> 10

<211> 18

<212> PRT
<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 7, figura 5

<400> 10

Gly Ser Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe
1 5 10 15

Arg Ser

10

<210> 11

<211> 72

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 9, figura 6

<220>

20 <221> CDS

<222> (1) .. (72)

<400> 11

gga tcc gaa ttc gtt ttc ctg cag aaa tat ccg cat acc cat ctg gtt 48
Gly Ser Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val
1 5 10 15

cat cag gct aac ccg cgt aga tct 72
His Gln Ala Asn Pro Arg Arg Ser
20

25

<210> 12

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 9, figura 6

<400> 12

35

Gly Ser Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val
1 5 10 15
His Gln Ala Asn Pro Arg Arg Ser
20

<210> 13

40 <211> 81

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

45 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 11, figura 7

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(81)

50

<400> 13

gga tcc gct ggt ccg tgc tgt tat ccg acc aaa atg tct ccg atc aac 48
Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Tyr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn
1 5 10 15

atg ctg tat ttc aac ggt gaa tgc cag aga tct 81
Met Leu Tyr Phe Asn Gly Glu Cys Gln Arg Ser
20 25

<210> 14
<211> 27
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 11, figura 7

<400> 14

Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Tyr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn
1 5 10 15

Met Leu Tyr Phe Asn Gly Glu Cys Gln Arg Ser
20 25

15 <210> 15
<211> 72
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 13, figura 8

<220>
25 <221> CDS
<222> (1) .. (72)

<400> 15

gga tcc gaa tgc cag atc att tat tgc aaa atc ccg gct atg gtt gta 48
Gly Ser Glu Cys Gln Ile Ile Tyr Cys Lys Ile Pro Ala Met Val Val
1 5 10 15

gac cgt tgc ggt tgt tct aga tct 72
Asp Arg Cys Gly Cys Ser Arg Ser
20

30 <210> 16
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 13, figura 8

<400> 16

Gly Ser Glu Cys Gln Ile Ile Tyr Cys Lys Ile Pro Ala Met Val Val
1 5 10 15

Asp Arg Cys Gly Cys Ser Arg Ser
20

45 <210> 17
<211> 63
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 15, figura 9

<220>

5 <221> CDS

<222> (1) .. (63)

<400> 17

```
gga tcc gaa cag aaa gaa aac gtt gaa aaa gaa ggt ctg tgc aac gct 48
Gly Ser Glu Gln Lys Glu Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala
  1             5             10             15
```

```
tgc ctg tgg aga tct 63
Cys Leu Trp Arg Ser
                20
```

10

<210> 18

<211> 21

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 15, figura 9

20 <400> 18

```
Gly Ser Glu Gln Lys Glu Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala
  1             5             10             15
```

```
Cys Leu Trp Arg Ser
                20
```

25

<210> 19

<211> 60

<211> 60

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 17, figura 10

<220>

35 <221> CDS

<222> (1) .. (60)

<400> 19

```
gga tcc caa gac ctg gct gtt acc ttc ccg gaa ccg ggt gaa gac ggt 48
Gly Ser His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Glu Pro Gly Glu Asp Gly
  1             5             10             15
```

```
ctg acc aga tct 60
Leu Thr Arg Ser
                20
```

40

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

45 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 17, figura 10

<400> 20

50

Gly Ser His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Glu Pro Gly Glu Asp Gly
 1 5 10 15

Leu Thr Arg Ser
 20

<210> 21
 <211> 60
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 19, figura 11

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(60)

15 <400> 21

gga tcc acc ccg ttc ctg gaa gtt aaa gtt acc gac act ccg aaa cgt 48
 Gly Ser Thr Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg
 1 5 10 15

tct cgt aga tct 60
 Ser Arg Arg Ser
 20

<210> 22
 20 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia codificante del péptido MYOS 19, figura 11

<400> 22

Gly Ser Thr Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg
 1 5 10 15

Ser Arg Arg Ser
 20

30 <210> 23
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: región activa de miostatina reconstruida, figura 13

<220>
 40 <221> CDS
 <222> (1) .. (372)

<400> 23

ES 2 527 410 T3

```

gga tcc cgt tct cgt cgc gac ttt ggt ctg gac tgc gac gaa cat tct 48
Gly Ser Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser
1 5 10 15

acc gaa aga tcc tct cgt tgc tgt cgc tat ccg ctg acc gtt gac ttc 96
Thr Glu Arg Ser Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe
20 25 30

gaa gct ttt ggt tgg gac tgg atc att gca ccg aaa cgt tat aga tcc 144
Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Arg Ser
35 40 45

aaa cgt tat aaa gct aac tat tgc tct ggt gaa tgc gaa ttc gtt ttc 192
Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe
50 55 60

ctg cag aaa tat ccg cat acc cat ctg gtt cat cag gct aac ccg cgt 240
Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg
65 70 75 80

aga tcc gct ggt ccg tgc tgt tat ccg acc aaa atg tct ccg atc aac 288
Arg Ser Ala Gly Pro Cys Cys Tyr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn
85 90 95

atg ctg tat ttc aac ggt gaa tgc cag atc att tat tgc aaa atc ccg 336
Met Leu Tyr Phe Asn Gly Glu Cys Gln Ile Ile Tyr Cys Lys Ile Pro
100 105 110

gct atg gtt gta gac cgt tgc ggt tgt tct aga tct 372
Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser Arg Ser
115 120

```

<210> 24

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: región activa de miostatina reconstruida, figura 13

<400> 24

```

Gly Ser Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser
1 5 10 15

Thr Glu Arg Ser Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe
20 25 30

Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Arg Ser
35 40 45

Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe
50 55 60

Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg
65 70 75 80

Arg Ser Ala Gly Pro Cys Cys Tyr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn
85 90 95

Met Leu Tyr Phe Asn Gly Glu Cys Gln Ile Ile Tyr Cys Lys Ile Pro
100 105 110

Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser Arg Ser
115 120

```

<210> 25

<211> 1473

<212> ADN
<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: transportador polipeptídico de leucotoxina, figuras 15A-15D

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1473)

10

<400> 25

```

atg gct act gtt ata gat cta agc ttc cca aaa act ggg gca aaa aaa 48
Met Ala Thr Val Ile Asp Leu Ser Phe Pro Lys Thr Gly Ala Lys Lys
  1           5           10           15

att atc ctc tat att ccc caa aat tac caa tat gat act gaa caa ggt 96
Ile Ile Leu Tyr Ile Pro Gln Asn Tyr Gln Tyr Asp Thr Glu Gln Gly
      20           25           30

aat ggt tta cag gat tta gtc aaa gcg gcc gaa gag ttg ggg att gag 144
Asn Gly Leu Gln Asp Leu Val Lys Ala Ala Glu Glu Leu Gly Ile Glu
      35           40           45

gta caa aga gaa gaa cgc aat aat att gca aca gct caa acc agt tta 192
Val Gln Arg Glu Glu Arg Asn Asn Ile Ala Thr Ala Gln Thr Ser Leu
      50           55           60

ggc acg att caa acc gct att ggc tta act gag cgt ggc att gtg tta 240
Gly Thr Ile Gln Thr Ala Ile Gly Leu Thr Glu Arg Gly Ile Val Leu
      65           70           75           80

tcc gct cca caa att gat aaa ttg cta cag aaa act aaa gca ggc caa 288
Ser Ala Pro Gln Ile Asp Lys Leu Leu Gln Lys Thr Lys Ala Gly Gln
      85           90           95

gca tta ggt tct gcc gaa agc att gta caa aat gca aat aaa gcc aaa 336
Ala Leu Gly Ser Ala Glu Ser Ile Val Gln Asn Ala Asn Lys Ala Lys
      100           105           110

act gta tta tct ggc att caa tct att tta ggc tca gta ttg gct gga 384
Thr Val Leu Ser Gly Ile Gln Ser Ile Leu Gly Ser Val Leu Ala Gly
      115           120           125

atg gat tta gat gag gcc tta cag aat aac agc aac caa cat gct ctt 432
Met Asp Leu Asp Glu Ala Leu Gln Asn Asn Ser Asn Gln His Ala Leu
      130           135           140

```

ES 2 527 410 T3

gct aaa gct ggc ttg gag cta aca aat tca tta att gaa aat att gct Ala Lys Ala Gly Leu Glu Leu Thr Asn Ser Leu Ile Glu Asn Ile Ala 145 150 155 160	480
aat tca gta aaa aca ctt gac gaa ttt ggt gag caa att agt caa ttt Asn Ser Val Lys Thr Leu Asp Glu Phe Gly Glu Gln Ile Ser Gln Phe 165 170 175	528
ggt tca aaa cta caa aat atc aaa ggc tta ggg act tta gga gac aaa Gly Ser Lys Leu Gln Asn Ile Lys Gly Leu Gly Thr Leu Gly Asp Lys 180 185 190	576
ctc aaa aat atc ggt gga ctt gat aaa gct ggc ctt ggt tta gat gtt Leu Lys Asn Ile Gly Gly Leu Asp Lys Ala Gly Leu Gly Leu Asp Val 195 200 205	624
atc tca ggg cta tta tcg ggc gca acc gct gca ctt gta ctt gca gat Ile Ser Gly Leu Leu Ser Gly Ala Thr Ala Ala Leu Val Leu Ala Asp 210 215 220	672
aaa aat gct tca aca gct aaa aaa gtg ggt gcg ggt ttt gaa ttg gca Lys Asn Ala Ser Thr Ala Lys Lys Val Gly Ala Gly Phe Glu Leu Ala 225 230 235 240	720
aac caa gtt gtt ggt aat att acc aaa gcc gtt tct tct tac att tta Asn Gln Val Val Gly Asn Ile Thr Lys Ala Val Ser Ser Tyr Ile Leu 245 250 255	768
gcc caa cgt gtt gca gca ggt tta tct tca act ggg cct gtg gct gct Ala Gln Arg Val Ala Ala Gly Leu Ser Ser Thr Gly Pro Val Ala Ala 260 265 270	816
tta att gct tct act gtt tct ctt gcg att agc cca tta gca ttt gcc Leu Ile Ala Ser Thr Val Ser Leu Ala Ile Ser Pro Leu Ala Phe Ala 275 280 285	864
ggt att gcc gat aaa ttt aat cat gca aaa agt tta gag agt tat gcc Gly Ile Ala Asp Lys Phe Asn His Ala Lys Ser Leu Glu Ser Tyr Ala 290 295 300	912
gaa cgc ttt aaa aaa tta ggc tat gac gga gat aat tta tta gca gaa Glu Arg Phe Lys Lys Leu Gly Tyr Asp Gly Asp Asn Leu Leu Ala Glu 305 310 315 320	960
tat cag cgg gga aca ggg act att gat gca tcg gtt act gca att aat Tyr Gln Arg Gly Thr Gly Thr Ile Asp Ala Ser Val Thr Ala Ile Asn 325 330 335	1008
acc gca ttg gcc gct att gct ggt ggt gtg tct gct gct gca gcc gat Thr Ala Leu Ala Ala Ile Ala Gly Gly Val Ser Ala Ala Ala Ala Asp 340 345 350	1056
tta aca ttt gaa aaa gtt aaa cat aat ctt gtc atc acg aat agc aaa Leu Thr Phe Glu Lys Val Lys His Asn Leu Val Ile Thr Asn Ser Lys 355 360 365	1104
aaa gag aaa gtg acc att caa aac tgg ttc cga gag gct gat ttt gct Lys Glu Lys Val Thr Ile Gln Asn Trp Phe Arg Glu Ala Asp Phe Ala 370 375 380	1152
aaa gaa gtg cct aat tat aaa gca act aaa gat gag aaa atc gaa gaa	1200

ES 2 527 410 T3

Lys Glu Val Pro Asn Tyr Lys Ala Thr Lys Asp Glu Lys Ile Glu Glu
 385 390 395 400

atc atc ggt caa aat ggc gag cgg atc acc tca aag caa gtt gat gat 1248
 Ile Ile Gly Gln Asn Gly Glu Arg Ile Thr Ser Lys Gln Val Asp Asp
 405 410 415

ctt atc gca aaa ggt aac ggc aaa att acc caa gat gag cta tca aaa 1296
 Leu Ile Ala Lys Gly Asn Gly Lys Ile Thr Gln Asp Glu Leu Ser Lys
 420 425 430

gtt gtt gat aac tat gaa ttg ctc aaa cat agc aaa aat gtg aca aac 1344
 Val Val Asp Asn Tyr Glu Leu Leu Lys His Ser Lys Asn Val Thr Asn
 435 440 445

agc tta gat aag tta atc tca tct gta agt gca ttt acc tcg tct aat 1392
 Ser Leu Asp Lys Leu Ile Ser Ser Val Ser Ala Phe Thr Ser Ser Asn
 450 455 460

gat tcg aga aat gta tta gtg gct cca act tca atg ttg gat caa agt 1440
 Asp Ser Arg Asn Val Leu Val Ala Pro Thr Ser Met Leu Asp Gln Ser
 465 470 475 480

tta tct tct ctt caa ttt gct agg gga tcc tag 1473
 Leu Ser Ser Leu Gln Phe Ala Arg Gly Ser
 485 490

<210> 26
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: transportador polipeptídico de leucotoxina, figuras 15A-15D

<400> 26

Met Ala Thr Val Ile Asp Leu Ser Phe Pro Lys Thr Gly Ala Lys Lys
 1 5 10 15

Ile Ile Leu Tyr Ile Pro Gln Asn Tyr Gln Tyr Asp Thr Glu Gln Gly
 20 25 30

Asn Gly Leu Gln Asp Leu Val Lys Ala Ala Glu Glu Leu Gly Ile Glu
 35 40 45

Val Gln Arg Glu Glu Arg Asn Asn Ile Ala Thr Ala Gln Thr Ser Leu
 50 55 60

Gly Thr Ile Gln Thr Ala Ile Gly Leu Thr Glu Arg Gly Ile Val Leu
 65 70 75 80

Ser Ala Pro Gln Ile Asp Lys Leu Leu Gln Lys Thr Lys Ala Gly Gln
 85 90 95

Ala Leu Gly Ser Ala Glu Ser Ile Val Gln Asn Ala Asn Lys Ala Lys
 100 105 110

ES 2 527 410 T3

Thr Val Leu Ser Gly Ile Gln Ser Ile Leu Gly Ser Val Leu Ala Gly
 115 120 125
 Met Asp Leu Asp Glu Ala Leu Gln Asn Asn Ser Asn Gln His Ala Leu
 130 135 140
 Ala Lys Ala Gly Leu Glu Leu Thr Asn Ser Leu Ile Glu Asn Ile Ala
 145 150 155 160
 Asn Ser Val Lys Thr Leu Asp Glu Phe Gly Glu Gln Ile Ser Gln Phe
 165 170 175
 Gly Ser Lys Leu Gln Asn Ile Lys Gly Leu Gly Thr Leu Gly Asp Lys
 180 185 190
 Leu Lys Asn Ile Gly Gly Leu Asp Lys Ala Gly Leu Gly Leu Asp Val
 195 200 205
 Ile Ser Gly Leu Leu Ser Gly Ala Thr Ala Ala Leu Val Leu Ala Asp
 210 215 220
 Lys Asn Ala Ser Thr Ala Lys Lys Val Gly Ala Gly Phe Glu Leu Ala
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Val Gly Asn Ile Thr Lys Ala Val Ser Ser Tyr Ile Leu
 245 250 255
 Ala Gln Arg Val Ala Ala Gly Leu Ser Ser Thr Gly Pro Val Ala Ala
 260 265 270
 Leu Ile Ala Ser Thr Val Ser Leu Ala Ile Ser Pro Leu Ala Phe Ala
 275 280 285
 Gly Ile Ala Asp Lys Phe Asn His Ala Lys Ser Leu Glu Ser Tyr Ala
 290 295 300
 Glu Arg Phe Lys Lys Leu Gly Tyr Asp Gly Asp Asn Leu Leu Ala Glu
 305 310 315 320
 Tyr Gln Arg Gly Thr Gly Thr Ile Asp Ala Ser Val Thr Ala Ile Asn
 325 330 335
 Thr Ala Leu Ala Ala Ile Ala Gly Gly Val Ser Ala Ala Ala Ala Asp
 340 345 350
 Leu Thr Phe Glu Lys Val Lys His Asn Leu Val Ile Thr Asn Ser Lys
 355 360 365
 Lys Glu Lys Val Thr Ile Gln Asn Trp Phe Arg Glu Ala Asp Phe Ala
 370 375 380
 Lys Glu Val Pro Asn Tyr Lys Ala Thr Lys Asp Glu Lys Ile Glu Glu
 385 390 395 400
 Ile Ile Gly Gln Asn Gly Glu Arg Ile Thr Ser Lys Gln Val Asp Asp
 405 410 415
 Leu Ile Ala Lys Gly Asn Gly Lys Ile Thr Gln Asp Glu Leu Ser Lys
 420 425 430
 Val Val Asp Asn Tyr Glu Leu Leu Lys His Ser Lys Asn Val Thr Asn
 435 440 445
 Ser Leu Asp Lys Leu Ile Ser Ser Val Ser Ala Phe Thr Ser Ser Asn
 450 455 460
 Asp Ser Arg Asn Val Leu Val Ala Pro Thr Ser Met Leu Asp Gln Ser
 465 470 475 480
 Leu Ser Ser Leu Gln Phe Ala Arg Gly Ser
 485 490

<210> 27
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 27

```

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

```

ES 2 527 410 T3

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> 28
<211> 376
5 <212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 28

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

ES 2 527 410 T3

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 Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met		
	355	360 365
Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser		
	370	375

<210> 29

<211> 375

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

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
10 20 25 30

ES 2 527 410 T3

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

5 <210> 30
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> *Papio hamadryas*

ES 2 527 410 T3

<400> 30

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	

ES 2 527 410 T3

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> 31
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

<400> 31

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 Arg 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

ES 2 527 410 T3

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> 32
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

<400> 32

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

ES 2 527 410 T3

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 Arg 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 Ala Met Val				
	355		360	365
Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser				

370 375

5 <210> 33
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> *Ovis aries*

10 <400> 33

ES 2 527 410 T3

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 Arg 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> 34
 <211> 375
 <212> PRT
 5 <213> *Gallus gallus*

<400> 34

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

10

ES 2 527 410 T3

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 Phe Asp Glu Thr Gly Arg Asp Leu Ala Val Thr
225 230 235 240
Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Arg
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> 35

<211> 375

<212> PRT

<213> *Meleagris gallopavo*

<400> 35

Met Gln Ile Leu Ala Val Tyr Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Gln Ile
1 5 10 15
Leu Val His Pro Val Ala Leu Asp Gly Ser Ser Gln Pro Thr Glu Asn
20 25 30
Ala Glu Lys Asp 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 Gln Ala Pro Asn Ile Ser Arg Asp Val Ile Lys Gln Leu
65 70 75 80

ES 2 527 410 T3

Leu Pro Arg Ala Pro Pro Leu Gln Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val
 85 90 95
 Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His
 100 105 110
 Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu
 115 120 125
 Val Gln Met Glu Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu
 145 150 155 160
 Arg Gln Val Gln Lys 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 Phe Asp Glu Asn Gly Arg Asp Leu Ala Val Thr
 225 230 235 240
 Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Arg
 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> 36

<211> 374

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 36

ES 2 527 410 T3

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 Arg 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 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

ES 2 527 410 T3

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> 37

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido de miostatina

<400> 37

Lys Arg Ser Arg Arg Asp
 1 5

15 <210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido de miostatina

<400> 38

25 Lys Glu Asn Val Glu Lys Glu
 1 5

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido de miostatina

35 <400> 39

Ser Leu Lys Asp Asp Asp
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende un inmunoconjugado de miostatina para la preparación de un medicamento para tratar atrofia muscular progresiva en un mamífero, en el que el inmunoconjugado comprende un transportador fusionado a un multímero de miostatina, en el que el transportador estimula la actividad de células T cooperadoras, y en el que el multímero de miostatina tiene la fórmula general (MP-X-MP)y, en la que cada MP se selecciona independientemente del grupo que consiste en
 - a) los aminoácidos 3-15 de SEQ ID NO: 6;
 - b) los aminoácidos 3-17 de SEQ ID NO: 8;
 - c) los aminoácidos 3-16 de SEQ ID NO: 10;
 - d) los aminoácidos 3-22 de SEQ ID NO: 16;
 - e) los aminoácidos 3-19 de SEQ ID NO: 8;
 - f) los aminoácidos 3-18 de SEQ ID NO: 20; y
 - g) los aminoácidos 3-18 de SEQ ID NO: 22,

X se selecciona del grupo que consiste en: una unión peptídica; un grupo espaciador de aminoácidos; y [MP]_n, en la que n es mayor que o igual a 1; y en la que y es mayor que o igual a 1.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que la atrofia muscular progresiva está provocada por un trastorno seleccionado del grupo que consiste en atrofia muscular, anorexia, caquexia, distrofia facioescapulohumeral, miopatía ocular y distrofia miotónica.
3. Uso según la reivindicación 1, en el que la atrofia muscular progresiva está provocada por distrofia muscular.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que la distrofia muscular es de Becker o de Duchennes.
5. Uso según la reivindicación 3, en el que la distrofia muscular se selecciona del grupo que consiste en de Becker, pseudohipertrofica, de cintura y extremidades, de Dejerine-Landouzy, de Duchennes, de Landouzy, de Emery-Dreifuss, de Erb, de Fukuyama, de Gowers, neuroaxonal infantil, de Leyden-Mobius, oculofaríngea, pelvifemoral, progresiva, escapulohumeral, distal y de Simmerlin.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador se selecciona del grupo que consiste en hemocianina de lapa californiana, toxoide tetánico, ovoalbúmina, un polipéptido de leucotoxina (LKT) y mioglobina de esperma de ballena.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina comprende al menos dos copias de los aminoácidos 3-15 de SEQ ID NO: 6.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina consiste en ocho copias de los aminoácidos 3-15 de SEQ ID NO: 6.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina comprende al menos dos copias de los aminoácidos 3-17 de SEQ ID NO: 8.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina consiste en ocho copias de los aminoácidos 3-17 de SEQ ID NO: 8.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina comprende al menos dos copias de los aminoácidos 3-16 de SEQ ID NO: 10.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina consiste en ocho copias de los aminoácidos 3-16 de SEQ ID NO: 10.

13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina comprende al menos dos copias de los aminoácidos 3-22 de SEQ ID NO: 16.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina consiste en seis copias de los aminoácidos 3-22 de SEQ ID NO: 16.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina comprende al menos dos copias de los aminoácidos 3-19 de SEQ ID NO: 18.
16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina consiste en cuatro copias de los aminoácidos 3-19 de SEQ ID NO: 18.
17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina comprende al menos dos copias de los aminoácidos 3-18 de SEQ ID NO: 20.
18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina consiste en ocho copias de los aminoácidos 3-18 de SEQ ID NO: 20.
19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina comprende al menos dos copias de los aminoácidos 3-18 de SEQ ID NO: 22.
20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el transportador es un polipéptido de leucotoxina (LKT) y el multímero de miostatina consiste en cuatro copias de los aminoácidos 3-18 de SEQ ID NO: 22 fusionado a un polipéptido de LKT.
21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el grupo espaciador de los aminoácidos incluye al menos un epítipo de células T cooperadoras.
22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el inmunoconjugado comprende además un adyuvante.
23. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el mamífero es un ser humano.

1 MMQKLQMYVY 10	11 IYLFMLIAAG 20	21 PV—DLNEGSER 30 de ratón
1 MI QKPQMYVY 10	11 IYLFVLI AAG 20	21 PV—DLNEDSER 30 de rata
1 -M QKLQ L CVY 9	10 IYLFMLI VAG 19	20 PV—DLNENSEQ 29 de ser humano
1 -M QKLQ L CVY 9	10 IYLFMLI VAG 19	20 PV—DLNENSEQ 29 de babuino
1 -M QKLQ I SVY 9	10 IYLFMLI VAG 19	20 PV—DLNENSEQ 29 bovina
1 -M QKLQ I YVY 9	10 IYLFMLI VAG 19	20 PV—DLNENSEQ 29 porcina
1 -M QKLQ I FVY 9	10 IYLFMLLVAG 19	20 PV—DLNENSEQ 29 ovina
1 -M QKLA VYVY 9	10 IYLFMQI AVD 19	20 PV—ALDGSSQP 29 de pollo
1 -M Q I LA VYVY 9	10 IYLFMQ I LVH 19	20 PV—ALDGSSQP 29 de pavo
1 -MH FTQ—VL 7	8 ISLS VL I ACG 17	18 PVGYGDITAHQQP 30 de pez cebra
31 EENVEKEGLC 40	41 NACA WRQNTR 50	51 YS RI E AIKIQ 60 de ratón
31 EANVEKEGLC 40	41 NACA WRQNTR 50	51 YS RI E AIKIQ 60 de rata
30 KENVEKEGLC 39	40 NACT WRQNTK 49	50 SS RI E AIKIQ 59 de ser humano
30 KENVEKEGLC 39	40 NACT WRQNTK 49	50 SS RI E AIKIQ 59 de babuino
30 KENVEKEGLC 39	40 NACL WRE NTT 49	50 SS RLE AIKIQ 59 bovina
30 KENVEKEGLC 39	40 NACMWRQNTK 49	50 SS RLE AIKIQ 59 porcina
30 KENVEKKGLC 39	40 NACL WRQNNK 49	50 SS RLE AIKIQ 59 ovina
30 TENAEKDGLC 39	40 NACT WRQNTK 49	50 SS RI E AIKIQ 59 de pollo
30 TENAEKDGLC 39	40 NACT WRQNTK 49	50 SS RI E AIKIQ 59 de pavo
31 STAT EES ELC 40	41 S TCE FRQHSK 50	51 LM RLHAIKSQ 60 de pez cebra
61 ILSKLRLETA 70	71 PNISKDA IRQ 80	81 LLPRAPPLRE 90 de ratón
61 ILSKLRLETA 70	71 PNISKDA IRQ 80	81 LLPRAPPLRE 90 de rata
60 ILSKLRLETA 69	70 PNISKDV IRQ 79	80 LLPKAPPLRE 89 de ser humano
60 ILSKLRLETA 69	70 PNISKDA IRQ 79	80 LLPKAPPLRE 89 de babuino
60 ILSKLRLETA 69	70 PNISKDA IRQ 79	80 LLPRAPPLLE 89 bovina
60 ILSKLRLETA 69	70 PNISKDA IRQ 79	80 LLPRAPPLRE 89 porcina
60 ILSKLRLETA 69	70 PNISKDA IRQ 79	80 LLPRAPPLRE 89 ovina
60 ILSKLRLEQA 69	70 PNISRDV IKQ 79	80 LLPRAPPLQE 89 de pollo
60 ILSKLRLEQA 69	70 PNISRDV IKQ 79	80 LLPRAPPLQE 89 de pavo
61 ILSKLRLEQA 70	71 PNISRDVVKQ 80	81 LLPRAPPLQQ 90 de pez cebra
91 LI DQYDVQRD 100	101 DS SDGSLEDD 110	111 DYH ATTET I I 120 de ratón
91 LI DQYDVQRD 100	101 DS SDGSLEDD 110	111 DYH ATTET I I 120 de rata
90 LI DQYDVQRD 99	100 DS SDGSLEDD 109	110 DYH ATTET I I 119 de ser humano
90 LI DQYDVQRD 99	100 DS SDGSLEDD 109	110 DYH ATTET I I 119 de babuino
90 LI DQYDVQRD 99	100 AS SDGSLEDD 109	110 DYH ARTETV I I 119 bovina
90 LI DQYDVQRD 99	100 DS SDGSLEDD 109	110 DYH ATTET I I 119 porcina
90 LI DQYDVQRD 99	100 DS SDGSLEDD 109	110 DYH VTTETV I I 119 ovina
90 LI DQYDVQRD 99	100 DS SDGSLEDD 109	110 DYH ATTET I I 119 de pollo
90 LI DQYDVQRD 99	100 DS SDGSLEDD 109	110 DYH ATTET I I 119 de pavo
91 LLDQYDVLGD 100	101 DSKDGAVEED 110	111 DEH ATTET IM 120 de pez cebra

FIG. 1A

121 TMPTESDFLM 130	131 QADGKPKCCF 140	141 FKFSSSKIQYN 150 de ratón
121 TMPTESDFLM 130	131 QADGKPKCCF 140	141 FKFSSSKIQYN 150 de rata
120 TMPTESDFLM 129	130 QVDGKPKCCF 139	140 FKFSSSKIQYN 149 de ser humano
120 TMPTESDFLM 129	130 QVDGKPKCCF 139	140 FKFSSSKIQYN 149 de babuino
120 TMPTESDLL T 129	130 QVEGKPKCCF 139	140 FKFSSSKIQYN 149 bovina
120 TMPTESDLLM 129	130 QVEGKPKCCF 139	140 FKFSSSKIQYN 149 porcina
120 TMPTESDLL A 129	130 EVQEKPKCCF 139	140 FKFSSSKIQHN 149 ovina
120 TMPTESDFL V 129	130 QMEGKPKCCF 139	140 FKFSSSKIQYN 149 de pollo
120 TMPTESDFL V 129	130 QMEGKPKCCF 139	140 FKFSSSKIQYN 149 de pavo
121 TMATEPDPI V 130	131 QVDRKPKCCF 140	141 FS FSPKIQAN 150 de pez cebra
151 KVVKAQLW IY 160	161 LRP VKTPPTTV 170	171 FVQILRLIKP 180 de ratón
151 KVVKAQLW IY 160	161 LRAVKTPPTTV 170	171 FVQILRLIKP 180 de rata
150 KVVKAQLW IY 159	160 LRP VETPTTV 169	170 FVQILRLIKP 179 de ser humano
150 KVVKAQLW IY 159	160 LRP VETPTTV 169	170 FVQILRLIKP 179 de babuino
150 KLVKAQLW IY 159	160 LRP VKTPATV 169	170 FVQILRLIKP 179 bovina
150 KVVKAQLW IY 159	160 LRP VKTPPTTV 169	170 FVQILRLIKP 179 porcina
150 KVVKAQLW IY 159	160 LRP VKTPPTTV 169	170 FVQILRLIKP 179 ovina
150 KVVKAQLW IY 159	160 LRQVQKPTTV 169	170 FVQILRLIKP 179 de pollo
150 KVVKAQLW IY 159	160 LRQVQKPTTV 169	170 FVQILRLIKP 179 de pavo
151 R I VRAQLWVH 160	161 LRP AEEATTV 169	170 FLQISRLM-P 179 de pez cebra
181 MKDGTRYTGI 190	191 RSLKLDMSPG 200	201 TGIWQSIDVK 210 de ratón
181 MKDGTRYTGI 190	191 RSLKLDMSPG 200	201 TGIWQSIDVK 210 de rata
180 MKDGTRYTGI 189	190 RSLKLDMPG 199	200 TGIWQSIDVK 209 de ser humano
180 MKDGTRYTGI 189	190 RSLKLDMPG 199	200 TGIWQSIDVK 209 de babuino
180 MKDGTRYTGI 189	190 RSLKLDMPG 199	200 TGIWQSIDVK 209 bovina
180 MKDGTRYTGI 189	190 RSLKLDMPG 199	200 TGIWQSIDVK 209 porcina
180 MKDGTRYTGI 189	190 RSLKLDMPG 199	200 TGIWQSIDVK 209 ovina
180 MKDGTRYTGI 189	190 RSLKLDMPG 199	200 TGIWQSIDVK 209 de pollo
180 MKDGTRYTGI 189	190 RSLKLDMPG 199	200 TGIWQSIDVK 209 de pavo
180 V KDGRHR-I 188	189 RSLK IDV NAG 198	199 VTSWQSIDVK 208 de pez cebra
211 TVLQNWLKQP 220	221 ESNLGEIKA 230	231 LD ENGHDLAV 240 de ratón
211 TVLQNWLKQP 220	221 ESNLGEIKA 230	231 LD ENGHDLAV 240 de rata
210 TVLQNWLKQP 219	220 ESNLGEIKA 229	230 LD ENGHDLAV 239 de ser humano
210 TVLQNWLKQP 219	220 ESNLGEIKA 229	230 LD ENGHDLAV 239 de babuino
210 TVLQNWLKQP 219	220 ESNLGEIKA 229	230 LD ENGHDLAV 239 bovina
210 TVLQNWLKQP 219	220 ESNLGEIKA 229	230 LD ENGHDLAV 239 porcina
210 TVLQNWLKQP 219	220 ESNLGEIKA 229	230 LD ENGHDLAV 239 ovina
210 TVLQNWLKQP 219	220 ESNLGEIKA 229	230 FD ETGRDLAV 239 de pollo
210 TVLQNWLKQP 219	220 ESNLGEIKA 229	230 FD ENGRDLAV 239 de pavo
209 QVLTWVWLKQP 218	219 ETNRGIEINA 228	229 YDAKGNDLAV 238 de pez cebra

FIG. 1B

241 TFPGPGEDGL 250	251 NPFLEVKVT D 260	261 TPKRSRRDFG 270 de ratón
241 TFPGPGEDGL 250	251 NPFLEVKVT D 260	261 TPKRSRRDFG 270 de rata
240 TFPGPGEDGL 249	250 NPFLEVKVT D 259	260 TPKRSRRDFG 269 de ser humano
240 TFPGPGEDGL 249	250 NPFLEVKVT D 259	260 TPKRSRRDFG 269 de babuino
240 TFPEPGEDGL 249	250 TPFLEVKVT D 259	260 TPKRSRRDFG 269 bovina
240 TFPGPGEDGL 249	250 NPFLEVKVT D 259	260 TPKRSRRDFG 269 porcina
240 TFPEPGEEGL 249	250 NPFLEVKVT D 259	260 TPKRSRRDFG 269 ovina
240 TFPGPGEDGL 249	250 NPFLEVRVT D 259	260 TPKRSRRDFG 269 de pollo
240 TFPGPGEDGL 249	250 NPFLEVRVT D 259	260 TPKRSRRDFG 269 de pavo
239 TSTETGEDGL 248	249 LPFMEVKI SE 258	259 GPKRIRRD SG 268 de pez cebra
271 LDCDEHSTES 280	281 RCCRYPLTVD 290	291 FEAFGWDWII 300 de ratón
271 LDCDEHSTES 280	281 RCCRYPLTVD 290	291 FEAFGWDWII 300 de rata
270 LDCDEHSTES 279	280 RCCRYPLTVD 289	290 FEAFGWDWII 299 de ser humano
270 LDCDEHSTES 279	280 RCCRYPLTVD 289	290 FEALGWDWII 299 de babuino
270 LDCDEHSTES 279	280 RCCRYPLTVD 289	290 FEAFGWDWII 299 bovina
270 LDCDEHSTES 279	280 RCCRYPLTVD 289	290 FEAFGWDWII 299 porcina
270 LDCDEHSTES 279	280 RCCRYPLTVD 289	290 FEAFGWDWII 299 ovina
270 LDCDEHSTES 279	280 RCCRYPLTVD 289	290 FEAFGWDWII 299 de pollo
270 LDCDEHSTES 279	280 RCCRYPLTVD 289	290 FEAFGWDWII 299 de pavo
269 LDCDENSSSES 278	279 RCCRYPLTVD 288	289 FEDFGWDWII 298 de pez cebra
301 APKRYKANYC 310	311 SGECE FV FLQ 320	321 KYPTHHLVHQ 330 de ratón
301 APKRYKANYC 310	311 SGECE FV FLQ 320	321 KYPTHHLVHQ 330 de rata
300 APKRYKANYC 309	310 SGECE FV FLQ 319	320 KYPTHHLVHQ 329 de ser humano
300 APKRYKANYC 309	310 SGECE FV FLQ 319	320 KYPTHHLVHQ 329 de babuino
300 APKRYKANYC 309	310 SGECE FV FLQ 319	320 KYPTHHLVHQ 329 bovina
300 APKRYKANYC 309	310 SGECE FV FLQ 319	320 KYPTHHLVHQ 329 porcina
300 APKRYKANYC 309	310 SGECE FL FLQ 319	320 KYPTHHLVHQ 329 ovina
300 APKRYKANYC 309	310 SGECE FV FLQ 319	320 KYPTHHLVHQ 329 de pollo
300 APKRYKANYC 309	310 SGECE FV FLQ 319	320 KYPTHHLVHQ 329 de pavo
299 APKRYKANYC 308	309 SGECDYMYLQ 318	319 KYPTHHLV NK 328 de pez cebra
331 ANPRGSAGPC 340	341 CTPTKMSPIN 350	351 MLYFNGKEQI 360 de ratón
331 ANPRGSAGPC 340	341 CTPTKMSPIN 350	351 MLYFNGKEQI 360 de rata
330 ANPRGSAGPC 339	340 CTPTKMSPIN 349	350 MLYFNGKEQI 359 de ser humano
330 ANPRGSAGPC 339	340 CTPTKMSPIN 349	350 MLYFNGKEQI 359 de babuino
330 ANPRGSAGPC 339	340 CTPTKMSPIN 349	350 MLYFNGEGQI 359 bovina
330 ANPRGSAGPC 339	340 CTPTKMSPIN 349	350 MLYFNGKEQI 359 porcina
330 ANPKGSAGPC 339	340 CTPTKMSPIN 349	350 MLYFNGKEQI 359 ovina
330 ANPRGSAGPC 339	340 CTPTKMSPIN 349	350 MLYFNGKEQI 359 de pollo
330 ANPRGSAGPC 339	340 CTPTKMSPIN 349	350 MLYFNGKEQI 359 de pavo
329 ASPRGTAGPC 338	339 CTPTKMSPIN 248	349 MLYFNGKEQI 359 de pez cebra

FIG. 1C

361 IYGKIPAMVV 370	371 DRCGCS 376 de ratón
361 IYGKIPAMVV 370	371 DRCGCS 376 de rata
360 IYGKIPAMVV 369	370 DRCGCS 375 de ser humano
360 IYGKIPAMVV 369	370 DRCGCS 375 de babuino
360 IYGKIPAMVV 369	370 DRCGCS 375 bovina
360 IYGKIPAMVV 369	370 DRCGCS 375 porcina
360 IYGKIPGMVV 369	370 DRCGCS 375 ovina
360 IYGKIPAMVV 369	370 DRCGCS 375 de pollo
360 IYGKIPAMVV 369	370 DRCGCS 375 de pavo
359 IYGKIP SMVV 368	369 DRCGCS 374 de pez cebra

FIG. 1D

			10				20				30				40	
GGA	TCC	CGT	TCT	CGT	CGC	GAC	TTT	GGT	CTG	GAC	TGC	GAC	GAA	CAT		
Gly	Ser	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp	Glu	His		
			50				60									
TCT	ACC	GAA	AGA	TCT												
Ser	Thr	Glu	Arg	Ser												

FIG. 2

			10				20				30				40	
GGA	TCC	TCT	CGT	TGC	TGT	CGC	TAT	CCG	CTG	ACC	GTT	GAC	TTC	GAA		
Gly	Ser	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val	Asp	Phe	Glu		
			50													
AGA	TCT															
Arg	Ser															

FIG. 3

			10				20				30				40	
GGA	TCC	TTC	GAA	GCT	TTT	GGT	TGG	GAC	TGG	ATC	ATT	GCA	CCG	AAA		
Gly	Ser	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys		
			50													
CGT	TAT	AGA	TCT													
Arg	Tyr	Arg	Ser													

FIG. 4

10 20 30 40
 GGA TCC AAA CGT TAT AAA GCT AAC TAT TGC TCT GGT GAA TGC GAA
 Gly Ser Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu

 50
 TTC AGA TCT
 Phe Arg Ser

FIG. 5

FIG. 5

10 20 30 40
 GGA TCC GAA TTC GTT TTC CTG CAG AAA TAT CCG CAT ACC CAT CTG
 Gly Ser Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu

 50 60 70
 GTT CAT CAG GCT AAC CCG CGT AGA TCT
 Val His Gln Ala Asn Pro Arg Arg Ser

FIG. 6

10 20 30 40
 GGA TCC GCT GGT CCG TGC TGT TAT CCG ACC AAA ATG TCT CCG ATC
 Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Tyr Pro Thr Lys MET Ser Pro Ile

 50 60 70 80
 AAC ATG CTG TAT TTC AAC GGT GAA TGC CAG AGA TCT
 Asn MET Leu Tyr Phe Asn Gly Glu Cys Gln Arg Ser

FIG. 7

			10				20				30				40			
GGA	TCC	GAA	TGC	CAG	ATC	ATT	TAT	TGC	AAA	ATC	CCG	GCT	ATG	GTT				
Gly	Ser	Glu	Cys	Gln	Ile	Ile	Tyr	Cys	Lys	Ile	Pro	Ala	<u>MET</u>	Val				

		50			60			70										
GTA	GAC	CGT	TGC	GGT	TGT	TCT	AGA	TCT										
Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser	Arg	Ser										

FIG. 8

			10				20				30				40			
GGA	TCC	GAA	CAG	AAA	GAA	AAC	GTT	GAA	AAA	GAA	GGT	CTG	TGC	AAC				
Gly	Ser	Glu	Gln	Lys	Glu	Asn	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Leu	Cys	Asn				

		50			60													
GCT	TGC	CTG	TGG	AGA	TCT													
Ala	Cys	Leu	Trp	Arg	Ser													

FIG. 9

			10				20				30				40			
GGA	TCC	CAT	GAC	CTG	GCT	GTT	ACC	TTC	CCG	GAA	CCG	GGT	GAA	GAC				
Gly	Ser	His	Asp	Leu	Ala	Val	Thr	Phe	Pro	Glu	Pro	Gly	Glu	Asp				

		50			60													
GGT	CTG	ACC	AGA	TCT														
Gly	Leu	Thr	Arg	Ser														

FIG. 10

			10				20				30				40			
GGA	TCC	ACC	CCG	TTC	CTG	GAA	GTT	AAA	GTT	ACC	GAC	ACT	CCG	AAA				
Gly	Ser	Thr	Pro	Phe	Leu	Glu	Val	Lys	Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys				
			50												60			
CGT	TCT	CGT	AGA	TCT														
Arg	Ser	Arg	Arg	Ser														

FIG. 11

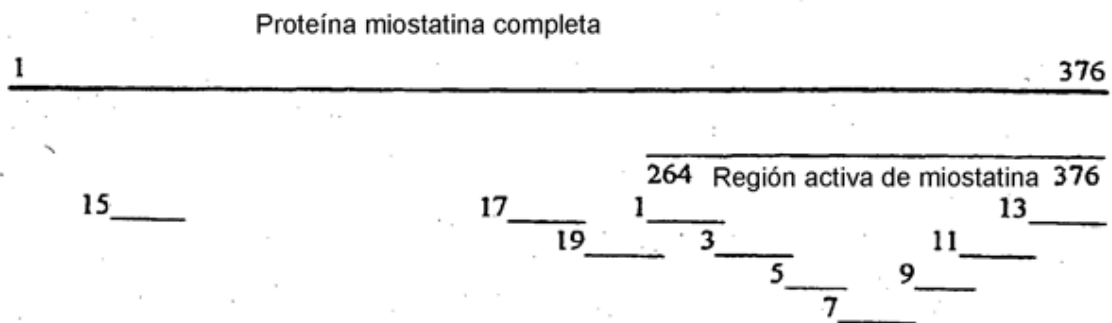


FIG. 12

	10		20		30		40							
GGA	TCC	CGT	TCT	CGT	CGC	GAC	TTT	GGT	CTG	GAC	TGC	GAC	GAA	CAT
Gly	Ser	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp	Glu	His
	50		60		70		80		90					
TCT	ACC	GAA	AGA	TCC	TCT	CGT	TGC	TGT	CGC	TAT	CCG	CTG	ACC	GTT
Ser	Thr	Glu	Arg	Ser	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val
	100		110		120		130							
GAC	TTC	GAA	GCT	TTT	GGT	TGG	GAC	TGG	ATC	ATT	GCA	CCG	AAA	CGT
Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg
	140		150		160		170		180					
TAT	AGA	TCC	AAA	CGT	TAT	AAA	GCT	AAC	TAT	TGC	TCT	GGT	GAA	TGC
Tyr	Arg	Ser	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys
	190		200		210		220							
GAA	TTC	GTT	TTC	CTG	CAG	AAA	TAT	CCG	CAT	ACC	CAT	CTG	GTT	CAT
Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys	Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His
	230		240		250		260		270					
CAG	GCT	AAC	CCG	CGT	AGA	TCC	GCT	GGT	CCG	TGC	TGT	TAT	CCG	ACC
Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Arg	Ser	Ala	Gly	Pro	Cys	Cys	Tyr	Pro	Thr
	280		290		300		310							
AAA	ATG	TCT	CCG	ATC	AAC	ATG	CTG	TAT	TTC	AAC	GGT	GAA	TGC	CAG
Lys	<u>MET</u>	Ser	Pro	Ile	Asn	<u>MET</u>	Leu	Tyr	Phe	Asn	Gly	Glu	Cys	Gln
	320		330		340		350		360					
ATC	ATT	TAT	TGC	AAA	ATC	CCG	GCT	ATG	GTT	GTA	GAC	CGT	TGC	GGT
Ile	Ile	Tyr	Cys	Lys	Ile	Pro	Ala	<u>MET</u>	Val	Val	Asp	Arg	Cys	Gly
	370													
TGT	TCT	AGA	TCT											
Cys	Ser	Arg	Ser											

FIG. 13

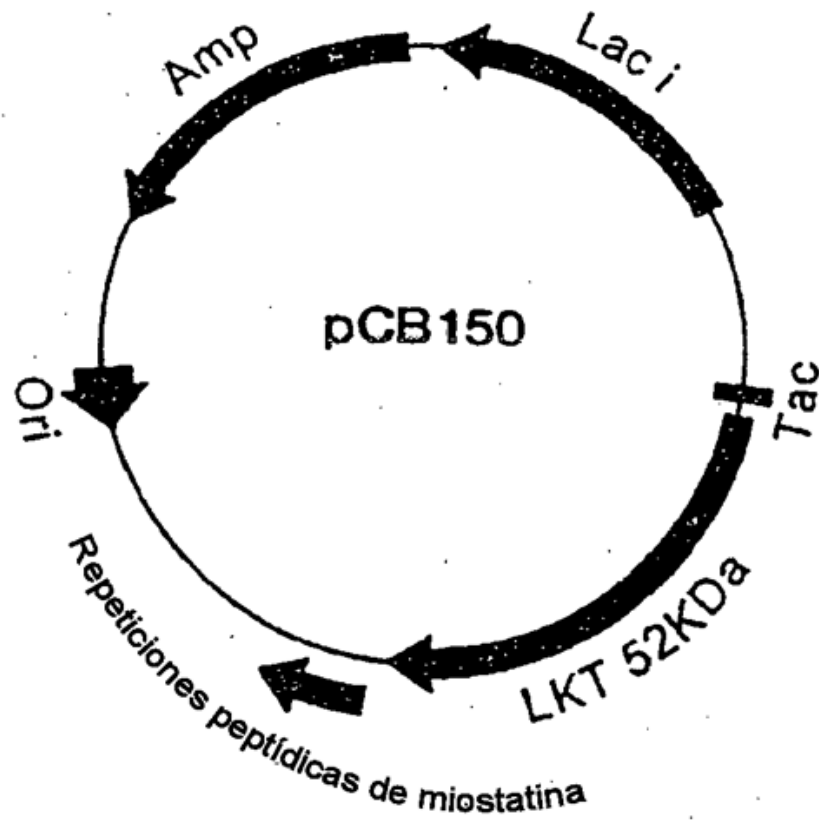


FIG. 14

1870	1880	1890	1900	1910
ATG	GCT	ACT	GTT	ATA
GAT	CTA	AGC	TTC	CCA
AAA	ACT	GGG	GCA	AAA
MET	Ala	Thr	Val	Ile
Asp	Leu	Ser	Phe	Pro
Lys	Thr	Gly	Ala	Lys
1920	1930	1940	1950	
AAA	ATT	ATC	CTC	TAT
ATT	CCC	CAA	AAT	TAC
CAA	TAT	GAT	ACT	GAA
Lys	Ile	Ile	Leu	Tyr
Ile	Pro	Gln	Asn	Tyr
Gln	Tyr	Asp	Thr	Glu
1960	1970	1980	1990	2000
CAA	GGT	AAT	GGT	TTA
CAG	GAT	TTA	GTC	AAA
GCG	GCC	GAA	GAG	TTG
Gln	Gly	Asn	Gly	Leu
Gln	Asp	Leu	Val	Lys
Ala	Ala	Glu	Glu	Leu
2010	2020	2030	2040	
GGG	ATT	GAG	GTA	CAA
AGA	GAA	GAA	CGC	AAT
AAT	ATT	GCA	ACA	GCT
Gly	Ile	Glu	Val	Gln
Arg	Glu	Glu	Arg	Asn
Asn	Ile	Ala	Thr	Ala
2050	2060	2070	2080	2090
CAA	ACC	AGT	TTA	GGC
ACG	ATT	CAA	ACC	GCT
ATT	GGC	TTA	ACT	GAG
Gln	Thr	Ser	Leu	Gly
Thr	Ile	Gln	Thr	Ala
Ile	Gly	Leu	Thr	Glu
2100	2110	2120	2130	
CGT	GGC	ATT	GTG	TTA
TCC	GCT	CCA	CAA	ATT
GAT	AAA	TTG	CTA	CAG
Arg	Gly	Ile	Val	Leu
Ser	Ala	Pro	Gln	Ile
Asp	Lys	Leu	Leu	Gln
2140	2150	2160	2170	2180
AAA	ACT	AAA	GCA	GGC
CAA	GCA	TTA	GGT	TCT
GCC	GAA	AGC	ATT	GTA
Lys	Thr	Lys	Ala	Gly
Gln	Ala	Leu	Gly	Ser
Ala	Glu	Ser	Ile	Val
2190	2200	2210	2220	
CAA	AAT	GCA	AAT	AAA
GCC	AAA	ACT	GTA	TTA
TCT	GGC	ATT	CAA	TCT
Gln	Asn	Ala	Asn	Lys
Ala	Lys	Thr	Val	Leu
Ser	Gly	Ile	Gln	Ser
2230	2240	2250	2260	2270
ATT	TTA	GGC	TCA	GTA
TTG	GCT	GGA	ATG	GAT
TTA	GAT	GAG	GCC	TTA
Ile	Leu	Gly	Ser	Val
Leu	Ala	Gly	MET	Asp
Leu	Asp	Glu	Ala	Leu

FIG. 15A

2280	2290	2300	2310	
CAG AAT AAC AGC AAC CAA CAT GCT CTT GCT AAA GCT GGC TTG GAG				
Gln Asn Asn Ser Asn Gln His Ala Leu Ala Lys Ala Gly Leu Glu				
2320	2330	2340	2350	2360
CTA ACA AAT TCA TTA ATT GAA AAT ATT GCT AAT TCA GTA AAA ACA				
Leu Thr Asn Ser Leu Ile Glu Asn Ile Ala Asn Ser Val Lys Thr				
2370	2380	2390	2400	
CTT GAC GAA TTT GGT GAG CAA ATT AGT CAA TTT GGT TCA AAA CTA				
Leu Asp Glu Phe Gly Glu Gln Ile Ser Gln Phe Gly Ser Lys Leu				
2410	2420	2430	2440	2450
CAA AAT ATC AAA GGC TTA GGG ACT TTA GGA GAC AAA CTC AAA AAT				
Gln Asn Ile Lys Gly Leu Gly Thr Leu Gly Asp Lys Leu Lys Asn				
2460	2470	2480	2490	
ATC GGT GGA CTT GAT AAA GCT GGC CTT GGT TTA GAT GTT ATC TCA				
Ile Gly Gly Leu Asp Lys Ala Gly Leu Gly Leu Asp Val Ile Ser				
2500	2510	2520	2530	2540
GGG CTA TTA TCG GGC GCA ACC GCT GCA CTT GTA CTT GCA GAT AAA				
Gly Leu Leu Ser Gly Ala Thr Ala Ala Leu Val Leu Ala Asp Lys				
2550	2560	2570	2580	
AAT GCT TCA ACA GCT AAA AAA GTG GGT GCG GGT TTT GAA TTG GCA				
Asn Ala Ser Thr Ala Lys Lys Val Gly Ala Gly Phe Glu Leu Ala				
2590	2600	2610	2620	2630
AAC CAA GTT GTT GGT AAT ATT ACC AAA GCC GTT TCT TCT TAC ATT				
Asn Gln Val Val Gly Asn Ile Thr Lys Ala Val Ser Ser Tyr Ile				
2640	2650	2660	2670	
TTA GCC CAA CGT GTT GCA GCA GGT TTA TCT TCA ACT GGG CCT GTG				
Leu Ala Gln Arg Val Ala Ala Gly Leu Ser Ser Thr Gly Pro Val				

FIG. 15B

2680	2690	2700	2710	2720
GCT	GCT	TTA	ATT	GCT
TCT	ACT	GTT	TCT	CTT
GCG	ATT	AGC	CCA	TTA
Ala	Ala	Leu	Ile	Ala
Ser	Thr	Val	Ser	Leu
Ala	Ile	Ser	Pro	Leu
2730	2740	2750	2760	
GCA	TTT	GCC	GGT	ATT
GCC	GAT	AAA	TTT	AAT
CAT	GCA	AAA	AGT	TTA
Ala	Phe	Ala	Gly	Ile
Ala	Asp	Lys	Phe	Asn
His	Ala	Lys	Ser	Leu
2770	2780	2790	2800	2810
GAG	AGT	TAT	GCC	GAA
CGC	TTT	AAA	AAA	TTA
GGC	TAT	GAC	GGA	GAT
Glu	Ser	Tyr	Ala	Glu
Arg	Phe	Lys	Lys	Leu
Gly	Tyr	Asp	Gly	Asp
2820	2830	2840	2850	
AAT	TTA	TTA	GCA	GAA
TAT	CAG	CGG	GGA	ACA
GGG	ACT	ATT	GAT	GCA
Asn	Leu	Leu	Ala	Glu
Tyr	Gln	Arg	Gly	Thr
Gly	Thr	Ile	Asp	Ala
2860	2870	2880	2890	2900
TCG	GTT	ACT	GCA	ATT
AAT	ACC	GCA	TTG	GCC
GCT	ATT	GCT	GGT	GGT
Ser	Val	Thr	Ala	Ile
Asn	Thr	Ala	Leu	Ala
Ala	Ile	Ala	Gly	Gly
2910	2920	2930	2940	
GTG	TCT	GCT	GCT	GCA
GCC	GAT	TTA	ACA	TTT
GAA	AAA	GTT	AAA	CAT
Val	Ser	Ala	Ala	Ala
Ala	Ala	Asp	Leu	Thr
Phe	Glu	Lys	Val	Lys
His				
2950	2960	2970	2980	2990
AAT	CTT	GTC	ATC	ACG
AAT	AGC	AAA	AAA	GAG
AAA	GTG	ACC	ATT	CAA
Asn	Leu	Val	Ile	Thr
Asn	Ser	Lys	Lys	Glu
Lys	Val	Thr	Ile	Gln
3000	3010	3020	3030	
AAC	TGG	TTC	CGA	GAG
GCT	GAT	TTT	GCT	AAA
GAA	GTG	CCT	AAT	TAT
Asn	Trp	Phe	Arg	Glu
Ala	Asp	Phe	Ala	Lys
Glu	Val	Pro	Asn	Tyr
3040	3050	3060	3070	3080
AAA	GCA	ACT	AAA	GAT
GAG	AAA	ATC	GAA	GAA
ATC	ATC	GGT	CAA	AAT
Lys	Ala	Thr	Lys	Asp
Glu	Lys	Ile	Glu	Glu
Ile	Ile	Gly	Gln	Asn

FIG. 15C

3090	3100	3110	3120	
GGC GAG CGG ATC ACC TCA AAG CAA GTT GAT GAT CTT ATC GCA AAA				
Gly Glu Arg Ile Thr Ser Lys Gln Val Asp Asp Leu Ile Ala Lys				
3130	3140	3150	3160	3170
GGT AAC GGC AAA ATT ACC CAA GAT GAG CTA TCA AAA GTT GTT GAT				
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Gln Asp Glu Leu Ser Lys Val Val Asp				
3180	3190	3200	3210	
AAC TAT GAA TTG CTC AAA CAT AGC AAA AAT GTG ACA AAC AGC TTA				
Asn Tyr Glu Leu Leu Lys His Ser Lys Asn Val Thr Asn Ser Leu				
3220	3230	3240	3250	3260
GAT AAG TTA ATC TCA TCT GTA AGT GCA TTT ACC TCG TCT AAT GAT				
Asp Lys Leu Ile Ser Ser Val Ser Ala Phe Thr Ser Ser Asn Asp				
3270	3280	3290	3300	
TCG AGA AAT GTA TTA GTG GCT CCA ACT TCA ATG TTG GAT CAA AGT				
Ser Arg Asn Val Leu Val Ala Pro Thr Ser <u>MET</u> Leu Asp Gln Ser				
3310	3320	3330	3340	
TTA TCT TCT CTT CAA TTT GCT AGG <u>GGA TCC</u> TAG				
Leu Ser Ser Leu Gln Phe Ala Arg Gly Ser ---				

FIG. 15D

```

1 ATGCAAAAAC TGCAAATCTC TGTTTATATT TACCTATTTA CGCTGATTGT
51 TGCTGGCCCA GTGGATCTGA ATGAGAACAG CGAGCAGAAG GAAAATGTGG
101 AAAAAGAGGG GCTGTGTAAT GCATGTTTGT GGAGGGAAAA CACTACATCC
151 TCAAGACTAG AAGCCATAAA AATCCAAATC CTCAGTAAAC TTCGCCTGGA
201 AACAGCTCCT AACATCAGCA AAGATGCTAT CAGACAACTT TTGCCCCAAGG
251 CTCCTCCACT CCTGGAAGTG ATTGATCAGT TCGATGTCCA GAGAGATGCC
301 AGCAGTGACG GCTCCTTGGA AGACGATGAC TACCACGCCA GGACGGAAC
351 GGTCATTACC ATGCCCACGG AGTCTGATCT TCTAACGCAA GTGGAAGGAA
401 AACCCAAATG TTGCTTCTTT AAATTTAGCT CTAAGATACA ATACAATAAA
451 CTAGTAAAGG CCCAACTGTG GATATATCTG AGGCCTGTCA AGACTCCTGC
501 GACAGTGTTT GTGCAAATCC TGAGACTCAT CAAACCCATG AAAGACGGTA
551 CAAGGTATAC TGGAATCCGA TCTCTGAAAC TTGACATGAA CCCAGGCACT
601 GGTATTTGGC AGAGCATTGA TGTGAAGACA GTGTTGCAGA ACTGGCTCAA
651 ACAACCTGAA TCCAACCTAG GCATTGAAAT CAAAGCTTTA GATGAGAATG
701 GCCATGATCT TGCTGTAACC TTCCCAGAAC CAGGAGAAGA TGGACTGACT
751 CCTTTTCTAG AAGTCAAGGT AACAGACACA CCAAAAAGAT CTAGGAGAGA
801 TTTTGGGCTT GATTGTGATG AACACTCCAC AGAATCTCGA TGCTGTCGCT
851 ACCCCCTCAC GGTGGATTTT GAAGCTTTTG GATGGGATTG GATTATTGCA
901 CCTAAAAGAT ATAAGGCCAA TTACTGCTCT GGAGAATGTG AATTGTATT
951 TTTGCAAAAG TATCCTCATA CCCATCTTGT GCACCAAGCA AACCCAGAG
1001 GTTCAGCCGG CCCCTGCTGT ACTCCTACAA AGATGTCTCC AATTAATATG
1051 CTATATTTTA ATGGCGAAGG ACAAATAATA TACGGAAGA TTCCAGCCAT
1101 GGTAGTAGAT CGCTGTGGGT GTCATGA

```

FIG. 16A

```

1 MQKLQISVYI YLFTLIVAGP VDLNENSEQK ENVEKEGLCN ACLWRENTTS
51 SRLEAIKIQI LSKLRLETAP NISKDAIRQL LPKAPLLEL IDQFDVORDA
101 SSDGSLEDDD YHARTETVIT MPTESDLLTQ VEGKPKCCFF KFSSKIQYNK
151 LVKAQLWIYL RPKVTPATVF VQILRLIKPM KDGRYTGIR SLKLDMPGT
201 GIWQSIDVKT VLQNWLKQPE SNLGIEIKAL DENGHD LAVT FPEPGEDGLT
251 PFLEVKTDT PKRSRRDFGL DCDEHSTESR CCRYPLTVDF EAFGWDWIIA
301 PKRYKANYCS GECEFVFLQK YPHTHLVHQA NPRGSAGPCC TPTKMSPINM
351 LYFNGEGQII YGKIPAMVVD RCGCS

```

FIG. 16B

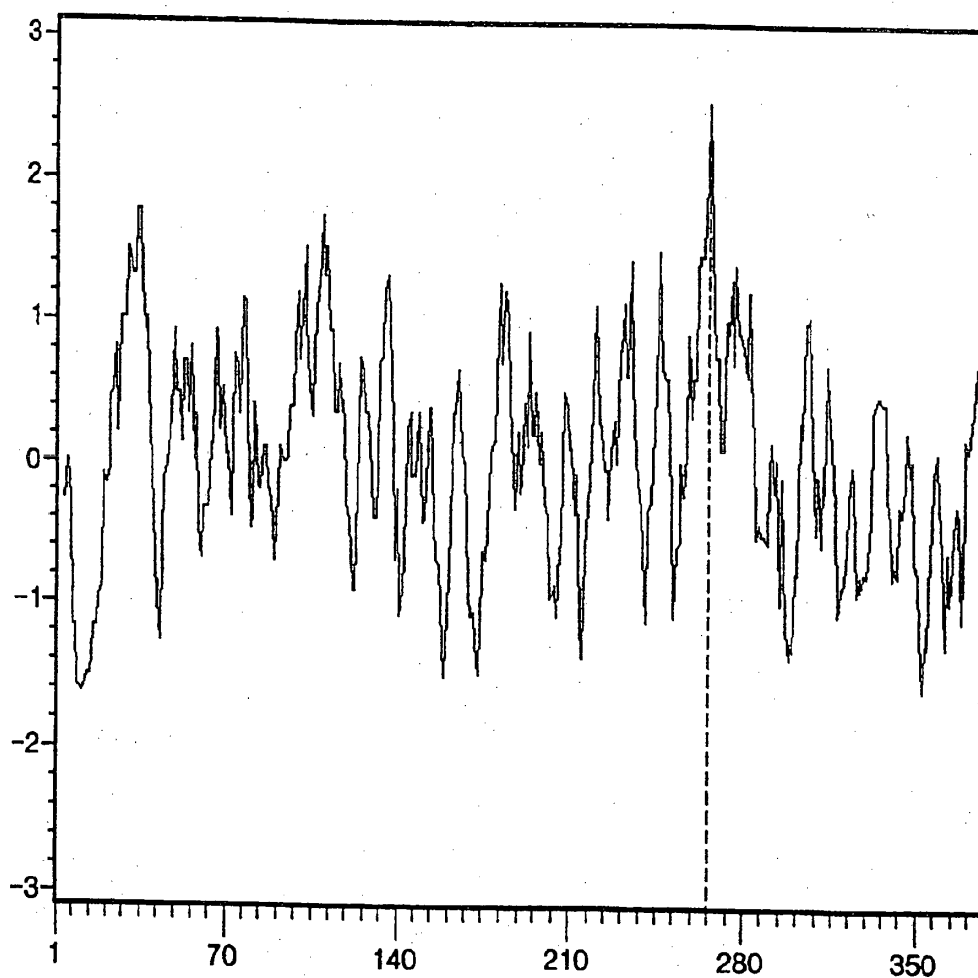
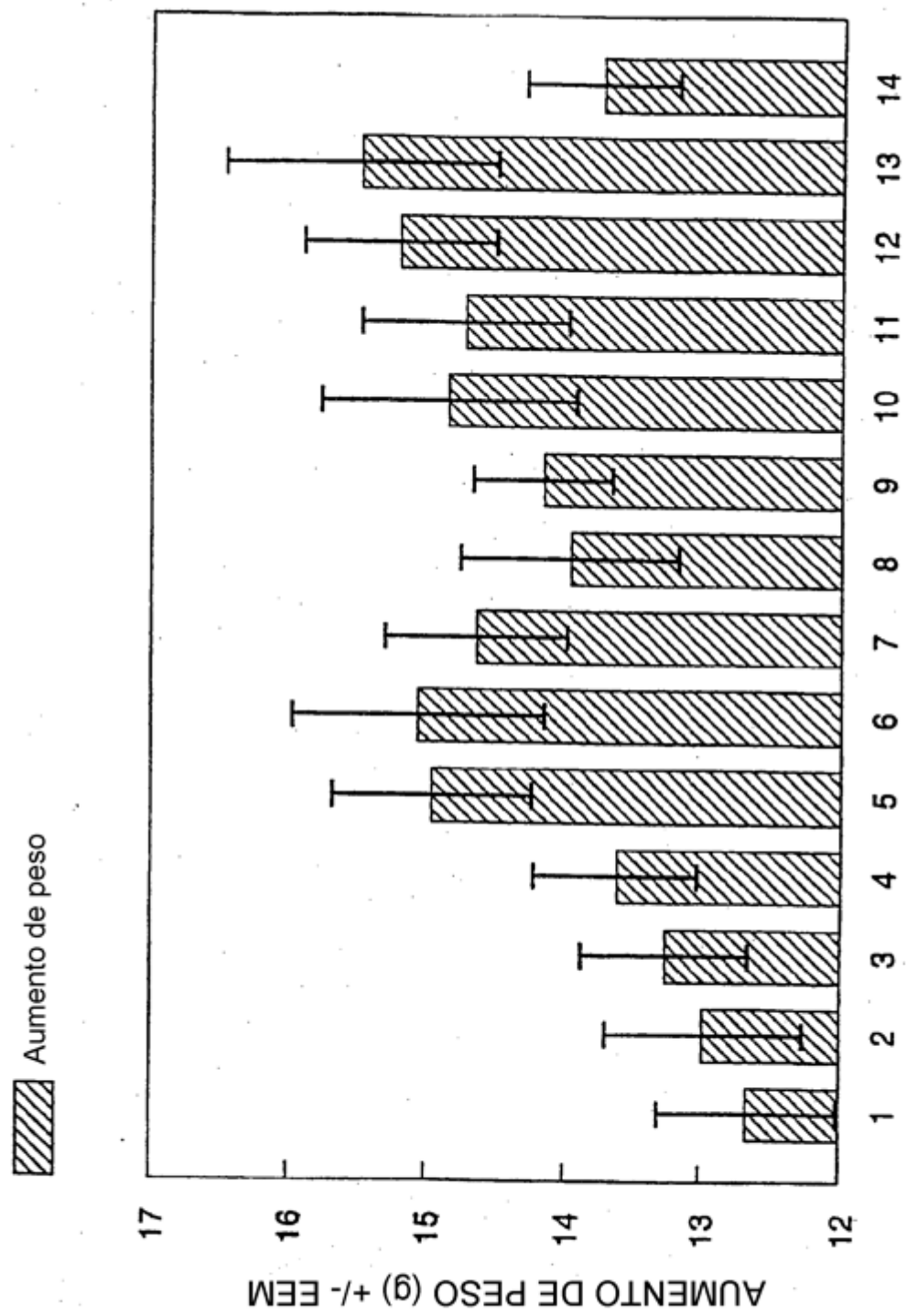


FIG. 17



GRUPO DE TRATAMIENTO
FIG. 18