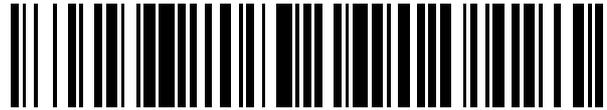


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 311**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2011 E 11733207 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2524057**

54 Título: **Ensayo de exploración empleando DEX y GDF8**

30 Prioridad:

15.01.2010 US 295631 P

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

09.08.2016

73 Titular/es:

**RIGEL PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1180 Veterans Boulevard
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

KINSELLA, TODD M.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 579 311 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

Ensayo de exploración empleando DEX y GDF8

5 Antecedentes

Una pérdida general de masa muscular o atrofia es una respuesta característica al ayuno, así como a muchas enfermedades, incluyendo cáncer avanzado, insuficiencia renal, septicemia, caquexia, artritis, osteoporosis y diabetes. La atrofia muscular también se produce por desuso o denervación, por ejemplo, inmovilización, descarga muscular, lesión de médula espinal etc., y la atrofia contribuye sustancialmente a muchos problemas de salud comunes, incluyendo, pero sin limitación, VIH, insuficiencia cardíaca crónica, retinopatía crónica, cirrosis hepática, lesiones por quemadura, osteoporosis, artritis, etc. Independientemente de la causa de la atrofia muscular, la atrofia musculoesquelética se caracteriza por una disminución en el contenido de proteínas, en el diámetro de la fibra, en la producción de fuerza y en la resistencia a la fatiga.

La pérdida de masa muscular asociada con progresión de atrofia se ha estudiado en animales sometidos a denervación, inmovilización, inanición y en animales a los que se implantaron células cancerosas con capacidad de inducir desgaste muscular. Como alternativa, la atrofia puede inducirse en animales sometidos a administración de glucocorticoides. En estos animales, el grado de desgaste muscular puede evaluarse empleando diversas mediciones que registran cambios en los pesos musculares o en el área transversal de la fibra, y realizando experimentos cinéticos usando una gran cantidad de animales etc. La detección de un cambio significativo en la masa o cinética muscular a menudo requiere un período de espera prolongado. La medición del peso muscular y del área transversal de la fibra requiere intervenciones quirúrgicas molestas, mediciones del área transversal y con frecuencia el animal se sacrifica. Por tanto, dichos procedimientos normalmente requieren una gran cantidad de animales e impiden poder seguir un conjunto de músculos, temporalmente, en el mismo animal.

El documento WO 02/061046 muestra métodos de exploración para la identificación de compuestos útiles para el tratamiento de la atrofia muscular basándose en alteraciones en la actividad o expresión de MURF1. El documento US 2009/291928 desvela el tratamiento con ligandos de receptores de glucocorticoides, tales como dexametasona, e informa que este induce genes de MURF-1 y otros genes relacionados con atrofia, entre otros, miostatina.

Determinados aspectos de esta divulgación se refieren a un método para inducir una respuesta atrófica.

35 Sumario

Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren a un método que comprende poner en contacto una célula de mamífero con un ligando del receptor de glucocorticoides y con un ligando del receptor de miostatina, activando de este modo el receptor de glucocorticoides y el receptor de miostatina. También se proporcionan ensayos de exploración que implican a estos.

40 En una realización, la presente invención se refiere a un método que comprende:

poner en contacto una célula muscular de mamífero cultivada *in vitro* con un ligando del receptor de glucocorticoides y con un ligando del receptor de miostatina, activando de este modo dicho receptor de glucocorticoides y dicho receptor de miostatina, en el que dicha célula puesta en contacto inicia una respuesta atrófica en la célula muscular de mamífero.

50 En realizaciones particulares, el ligando del receptor de glucocorticoides puede ponerse en contacto con la célula de mamífero a una concentración en el intervalo de 0,1 μ M a 100 μ M, y el ligando de receptor de miostatina se pone en contacto con la célula de mamífero a una concentración de 1 ng/ml a 1000 ng/ml. El ligando del receptor de glucocorticoides y el ligando del receptor de miostatina pueden ponerse en contacto con la célula de mamífero simultáneamente o a tiempos diferentes.

55 En realizaciones particulares, el ligando del receptor de glucocorticoides puede ser dexametasona. En determinados casos, el ligando del receptor de miostatina puede ser GDF8.

También se proporciona un método de exploración. En determinadas realizaciones este método comprende:

60 poner en contacto una célula muscular cultivada *in vitro* con un agente candidato en presencia de un ligando del receptor de glucocorticoides y de un ligando del receptor de miostatina; y determinar si dicho agente candidato altera un fenotipo de dicha célula muscular inducida en respuesta a dicho ligando del receptor de glucocorticoides y a dicho ligando del receptor de miostatina, en el que el fenotipo es una respuesta atrófica.

65 En determinados casos, la determinación puede realizarse midiendo la expresión de la expresión génica en la célula, por ejemplo, midiendo la producción de una proteína indicadora, donde la proteína indicadora se produce usando, por ejemplo, una construcción promotor de atrógeno-proteína indicadora.

En determinados casos, el gen puede ser un gen atrógeno, por ejemplo, MURF-1 o Atrogin-1.

En determinadas realizaciones, la puesta en contacto puede realizarse administrando el agente candidato a un mamífero y evaluando una respuesta atrófica en el tejido muscular del mamífero. En determinados casos, la evaluación puede comprender medir la expresión génica en el tejido muscular y/o medir la masa muscular en el tejido muscular. En realizaciones particulares, el mamífero puede ser una rata.

5 En realizaciones particulares, la puesta en contacto puede realizarse poniendo en contacto el agente candidato con una célula cultivada *in vitro*, y evaluando una respuesta atrófica en la célula cultivada. En esta realización, la evaluación puede comprender medir la expresión génica en la célula cultivada.

10 También se describe una composición que comprende una célula de mamífero, un ligando del receptor de glucocorticoides y un ligando del receptor de miostatina.

Breve descripción de las figuras

15 La FIGURA 1 es un gráfico de barras que muestra que la expresión de MURF1 endógeno se regula positivamente de un modo sinérgico mediante tratamiento con Dex y GDF8 en células HepG2.
La FIGURA 2 es un gráfico que muestra que el ARNm de MuRF1 en células HepG2 se induce a las 4 horas de tratamiento con Dex y GDF8

20 Definiciones

Los términos “determinar”, “medir”, “evaluar”, “valorar”, “ensayar” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier forma de medición, e incluye determinar si un elemento está o no presente. Estos términos incluyen determinaciones cuantitativas y/o cualitativas. La valoración puede ser relativa o absoluta. La “determinación de la presencia de” incluye determinar la cantidad de alguna cosa que esté presente, así como determinar si está o no presente.

La expresión “poner en contacto” significa asociar o agrupar. Como tal, un primer elemento se pone en contacto con un segundo elemento cuando los dos elementos se asocian o agrupan, por ejemplo, estableciendo contacto o combinándose en la misma solución. A menos que se indique otra cosa, una célula que se pone en contacto con un agente puede ser una célula *in vivo*, es decir, dentro de un organismo multicelular, o una célula *in vitro*, es decir, una célula cultivada.

La expresión “proteína ópticamente detectable” se refiere a una proteína cuya expresión puede detectarse a través de la presencia de una señal óptica producida por la proteína. Una proteína produce una señal óptica, por ejemplo, cuando la proteína tiene la capacidad de excitarse mediante una longitud de onda de luz particular y emitir otra longitud de onda de luz que es detectable. Una proteína produce una señal óptica, por ejemplo, cuando la proteína cataliza una reacción que produce una señal lumínica. Las proteínas fluorescentes, proteínas luminiscentes, etc. son ejemplos de proteínas ópticamente detectables.

El término “gen” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende una región promotora, una secuencia codificante y una UTR 3’.

En el presente documento los términos “proteína” y “polipéptido” se usan indistintamente.

La expresión “ácido nucleico” incluye ADN, ARN, monocatenario o bicatenario y modificaciones químicas de los mismos. En el presente documento los términos “ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan indistintamente.

Un animal “no humano” se refiere a cualquier mamífero de una especie que no es humana.

Los términos “roedor” y “roedores” se refieren a todos los miembros del orden filogenético *Rodentia* incluyendo cualquiera y toda la descendencia de todas las generaciones futuras procedentes de la misma.

El término “murino” se refiere a cualquier miembro y a todos los miembros de la familia *Muridae*, incluyendo ratas y ratones.

La expresión “unido(a) operativamente” se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un solo fragmento de ácido nucleico de tal manera que la función de una está afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante cuando tiene la capacidad de afectar la expresión de esa secuencia codificante (es decir, la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). De manera similar, cuando un IRES (*Internal Ribosome Entry Site*, Sitio Interno de entrada al Ribosoma) está unido operativamente a una secuencia codificante, el IRES permite la traducción del ARNm transcrito de esa secuencia codificante. “No ligado” significa que los elementos genéticos asociados no están estrechamente asociados entre sí y la función de un elemento genético o no afecta al otro.

El término “luciferasa” se refiere a una enzima que emite luz durante la oxidación de su sustrato luciferina. Los

términos luciferina y luciferasa no se refieren a una luciferina o luciferasa particular. Son términos genéricos para referirse a un sustrato y a su enzima (o proteína) asociadas que cataliza una reacción que produce luz.

5 El término “inducido”, con respecto a un promotor, se entiende que incluye tanto el inicio de la transcripción de un ácido nucleico cadena abajo, así como un incremento en la tasa de transcripción de un ácido nucleico cadena abajo que ya se está transcribiendo, en comparación con un estado no inducido.

10 El término “endógeno”, con referencia a un gen, indica que el gen es nativo en una célula, es decir, el gen está presente en un locus particular en el genoma de una célula no modificada. Un gen endógeno puede ser un gen de tipo silvestre, presente en un locus en una célula de tipo silvestre (como se encuentra en la naturaleza). Un gen endógeno puede ser un gen endógeno modificado si está presente en el mismo locus en el genoma como un gen de tipo silvestre. Un ejemplo de dicho gen endógeno modificado es un gen en el que se inserta un ácido nucleico extraño. Un gen endógeno puede estar presente en el genoma nuclear, genoma mitocondrial etc.

15 El término “construcción” se refiere a un ácido nucleico recombinante, generalmente ADN recombinante, que se ha generado con el fin de expresar una o más secuencias de nucleótidos específicas, o que va a usarse en la construcción de otras secuencias de nucleótidos recombinantes. Una construcción podría estar presente en un vector o en un genoma.

20 El término “recombinante” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que no se produce de manera natural en una célula hospedadora. Una molécula recombinante puede contener dos o más secuencias de origen natural que están ligadas entre sí de una manera que no se produce de manera natural. Una célula recombinante contiene un polinucleótido o polipéptido recombinante.

25 El término “expresión”, como se usa en el presente documento, se refiere al proceso mediante el cual se produce un polipéptido basándose en la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye tanto transcripción como traducción.

30 El término “introducida”, en el contexto de insertar una secuencia de ácido nucleico en una célula, significa “transfección”, o “transformación” o “transducción” e incluye la referencia a la incorporación de una secuencia de ácido nucleico en una célula eucariota o procariota en la que la secuencia de ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido, o ADN mitocondrial), transformarse en un replicón autónomo, o expresarse de manera transitoria (por ejemplo, ARNm transfectado).

35 “Tratar” o “tratamiento” de una afección o enfermedad incluye proporcionar un beneficio clínico a un sujeto, e incluye: (1) la prevención de al menos un síntoma de las afecciones, es decir, haciendo que un síntoma clínico no se desarrolle significativamente en un mamífero que puede estar expuesto o predispuesto a la enfermedad pero que aún no padezca o presente los síntomas de la enfermedad, (2) la inhibición de la enfermedad, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o de sus síntomas o (3) el alivio de la enfermedad, es decir, hacer que la enfermedad o sus síntomas clínicos retrocedan.

45 La expresión “agentes candidatos” significa oligonucleótidos, polinucleótidos, ARNip (que pueden administrarse como ARNhp), productos génicos, polipéptidos, moléculas pequeñas, por ejemplo, de hasta 2500 Dalton (Da) de tamaño, y compuestos farmacológicos que se combinan con las células o con los animales descritos en el presente documento para explorar su efecto sobre la atrofia muscular. En determinados casos, un agente candidato puede suministrarse como un ácido nucleico que se transcribe y/o traduce para proporcionar el agente candidato, por ejemplo, una molécula de ARNi o un polipéptido.

50 La expresión “secuencia codificante” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que una vez transcrita y traducida produce una proteína, por ejemplo, *in vivo*, cuando se coloca bajo el control de elementos reguladores apropiados. Una secuencia codificante como se usa en el presente documento puede tener una ORF continua o puede tener una ORF interrumpida por la presencia de intrones o secuencias no codificantes. En esta realización, las secuencias no codificantes están cortadas y empalmadas del pre ARNm para producir ARNm maduro.

55 La frase “célula muscular”, como se usa en el presente documento, se refiere a células musculares de todos los tipos, tal como incluyendo las musculo-esqueléticas, las de la musculatura lisa y cardíaca, precursores de estas células musculares y cualquier célula intermedia existente durante la diferenciación de una célula muscular precursora, fibras musculares, líneas de células musculares, etc. Los ejemplos de células musculares incluyen mioblastos, miotubos, miocitos, células musculares cardíacas, células musculo-esqueléticas, miofibras, etc. Una célula muscular puede estar presente *in vivo* (en un animal) o *in vitro* (en un cultivo celular).

65 La frase “gen atrógeno” se refiere a un gen cuya expresión se induce en células musculares en respuesta a un estímulo inductor de atrofia (por ejemplo, ayuno, etc.) antes de que pueda observarse un fenotipo detectable de atrofia muscular, es decir, una pérdida detectable de masa muscular, deshidratación de las células, etc. Los genes de MuRF1 y MAFbx, que codifican las ubiquitina proteína ligasas, son ejemplos de genes atrógenos, aunque existen otros. Los mecanismos moleculares que regulan la atrofia muscular se han revisado exhaustivamente, por ejemplo,

en Siu *et al*, Front. Biosci. 2009 14: 432-52; Murton *et al*, Biochim. Biophys. Acta 2008 1782: 730-43; Tisdale, Curr. Opin. Support Palliat. Care 2007 1: 287-92; Zhang *et al*, Med. Hypotheses. 2007 69: 310-21; Cao *et al*, Int. J. Biochem. Cell Biol. 2005 37: 2088-97; Nader, Int. J. Biochem. Cell Biol. 2005 37: 1985-96; Glass, Int. J. Biochem. Cell Biol. 2005 37: 1974-84; Du *et al*, Int. J. Biochem. Cell Biol. 2005 37: 2147-55; Franch *et al*, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2005 8: 271-5; Glass, Trends Mol. Med. 2003 9: 344-50; y Glass, Nat. Cell Biol. 2003 5: 87-90.

La frase “promotor atrógeno” se refiere a un promotor que está inducido en células musculares expuestas a un estímulo inductor de atrofia (por ejemplo, ayuno, etc.) antes de que pueda observarse un fenotipo detectable de atrofia muscular, es decir, una pérdida detectable de masa muscular, deshidratación de las células, etc. Un promotor atrógeno puede ser el promotor de un gen atrógeno de tipo silvestre, o de una variante activa del mismo que es, por ejemplo, al menos 95 % idéntico a un promotor de tipo atrógeno de tipo silvestre.

La expresión “respuesta atrofica” se refiere a cualquier respuesta, cuantitativa o cualitativamente observable, relacionada con atrofia muscular. Una respuesta atrofica puede ser observable a nivel molecular e incluye una expresión génica alterada, por ejemplo, de un gen endógeno relacionado con músculo o de una proteína indicadora dirigida por un promotor relacionado con músculo, tal como un promotor atrógeno. Una respuesta atrofica también puede ser observable a nivel celular, por ejemplo, observando un fenotipo celular alterado, tal como deshidratación celular, muerte celular o tinción celular alterada, o a nivel tisular, por ejemplo, observando la masa de un músculo, el tamaño de la fibra, el área transversal, etc. Una disminución en la masa del músculo normalmente viene acompañada de un debilitamiento de los músculos. Una respuesta atrofica puede observarse, por ejemplo, *in vitro* (en una célula cultivada) o *in vivo* (en un animal multicelular). En un animal, la atrofia muscular puede producirse por ayuno, caquexia, diabetes, tratamiento con dexametasona, tratamiento con miostatina, estar con un respirador después de cirugía, distrofia muscular, fragilidad sarcopénica en ancianos y esclerosis lateral amiotrófica, así como diversas otras enfermedades, afecciones y tratamientos debilitantes musculares.

La expresión “receptor de glucocorticoides”, que también se conoce como RG, RGC y NR3C1 (subfamilia 3 de receptores nucleares, grupo C, miembro 1) es el receptor al cual se unen y activan el cortisol y otros glucocorticoides. El receptor de glucocorticoides se expresa en casi todas las células del organismo y regula genes que controlan el desarrollo, el metabolismo y la respuesta inmunitaria. Cuando el RG se une a un glucocorticoide, su mecanismo de acción principal es la regulación de la transcripción génica (Lu *et al*, Pharmacol. Rev. 2006 58: 782-97; Rhen *et al*, N. Engl. J. Med. 2005 353: 1711-23). El receptor no unido se encuentra en el citosol de la célula. Después de que el receptor se une al glucocorticoide, el complejo receptor-glucocorticoide puede tomar cualquiera de dos trayectorias. El complejo RG activado regula positivamente la expresión de proteínas antiinflamatorias en el núcleo o reprime la expresión de proteínas proinflamatorias en el citosol (impidiendo la translocación de otros factores de transcripción desde el citosol al interior del núcleo). La proteína RG humana y el ARNm codificante se obtienen en el GenBank con los números de acceso NP_000167 y NM_000176, respectivamente. La proteína RG de ratón y el ARNm codificante se obtienen en el Genbank con los números de acceso NP_03219 y NM_008173, respectivamente. En el genoma humano, el gen de RG se localiza en el cromosoma 5 a 142,64 – 142,8 Mb. El receptor de glucocorticoides se describe, por ejemplo, en Kumar (Steroids 1999 64: 310-9) y en Kumar (J. Steroid Biochem Mol Biol.) 2005 94: 383-94. Un ligando para el receptor de glucocorticoides activa al receptor de glucocorticoides. La dexametasona es un ejemplo de un ligando para el receptor de glucocorticoides aunque, como se verá más adelante, puede haber muchos otros.

“GDF8”, que también se conoce como miostatina (NTCR) o factor 8 de diferenciación de crecimiento, es un miembro de la familia de proteínas de TGF β segregada que inhibe la diferenciación y el crecimiento muscular. La miostatina se produce principalmente en células musculoesqueléticas, circula en la sangre y actúa sobre el tejido muscular, uniéndose a un receptor unido a la célula denominado receptor de activina de tipo II. La secuencia de GDF8 se ha determinado en diversos organismos. La proteína GDF8 humana y el ARNm codificante se obtienen en el GenBank con los números de acceso NP_005250 y NM_005259, respectivamente. La proteína de GDF8 de ratón y el ARNm codificante se obtienen en el GenBank con los números de acceso NP_034964 y NM_010834, respectivamente. En el genoma humano, el gen de GDF8 se localiza en el cromosoma 2 a 190,63 – 190,64 Mb. En el genoma de ratón, el gen GDF8 se localiza en el cromosoma 1 a 53,12 – 53,12 Mb. GDF8 se describe en McPherron (Nature 1997 387: 83-90) y Rodgers (Am J. Physiol Endocrinol Metab 2007 292: E371-2), por ejemplo.

La expresión “receptor de miostatina” se refiere al receptor a través del cual actúa GDF8. Se piensa que el receptor de miostatina es un receptor de activina de tipo II, incluyendo el receptor de activina IIA (ActRIIA) y el receptor de activina IIB (ActRIIB). El receptor de miostatina se revisa en Tsuchida *et al* (Endocr J. 2008 55: 11-21), Joulia-Ekaza *et al* (Curr. Opin. Pharmacol. 2007 7: 310-5), Walsh *et al* (Biochem. Soc. Trans. 2005 33: 1513-7) y Tsuchida *et al* (Immune Endocr. Metabol. Disord. 2004 4: 157-66). Un ligando para el receptor de miostatina activa ese receptor. GDF8 es un ejemplo de un ligando para el receptor de miostatina aunque, como se verá más adelante, puede haber muchos otros.

Descripción de realizaciones ejemplares

Antes de describir con más detalle la presente invención, debe entenderse que esta invención no está limitada a las realizaciones particulares descritas, ya que por supuesto, como tales, pueden variar. También debe entenderse que

la terminología que se utiliza en el presente documento tiene la finalidad de describir solo realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, dado que el alcance de la presente invención estará únicamente limitado por las reivindicaciones que se adjuntan.

5 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que, en la invención, se incluye cada valor interviniente con respecto a la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dictamine claramente otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o interviniente en el que se incluya ese intervalo.

10 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que normalmente entiende un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque en la realización práctica o en el ensayo de la presente invención puede usarse cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

15 Debe observarse que, de la manera en la que se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno(a)" y "el", "la", "lo" incluyen referentes en plural a menos que el contexto dictamine claramente otra cosa. Por tanto, una referencia, por ejemplo, a "una célula" incluye una pluralidad de células y una referencia a "un agente candidato" incluye una referencia a uno o más agentes candidatos y equivalentes de los mismos, conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. Debe observarse también, que las reivindicaciones pueden redactarse excluyendo cualquier elemento opcional. Como tal, esta afirmación pretende servir como un principio precedente para el uso de terminología exclusiva, tal como, "únicamente", "solo" y similar junto con la relación de elementos de la reivindicación, o uso de una limitación "negativa".

25 Las publicaciones comentadas en el presente documento se proporcionan únicamente por su divulgación anterior a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a antedatar dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar confirmarse independientemente.

30 Como será obvio para los expertos en la técnica después de leer la presente divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en el presente documento tiene distintos componentes y características que pueden separarse o combinarse fácilmente con las características de cualquiera de las diversas otras realizaciones proporcionadas que siguen estando dentro del alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones. Cualquier método indicado puede realizarse en el orden de acontecimientos indicado o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

35 Como se ha indicado anteriormente, se proporciona un método que, en líneas generales, comprende poner en contacto una célula de mamífero con un ligando del receptor de glucocorticoides y con un ligando del receptor de miostatina. También se proporciona un ensayo de exploración que implique lo mismo. En la siguiente descripción en primer lugar se describen los ligandos de receptores de glucocorticoides y de miostatina y después un método en el que pueden emplearse estos ligandos.

Ligandos de receptores de glucocorticoides

45 El ligando de receptores de glucocorticoides empleado en el método objeto de la invención, puede ser cualquier compuesto que se una y active al receptor de glucocorticoides. Se conoce el mecanismo mediante el cual se inicia la activación de la respuesta cadena abajo del receptor de glucocorticoides. En términos generales, después de la unión del ligando con el receptor, el complejo receptor-ligando se transloca en el interior del núcleo de la célula, donde se une a elementos de respuesta a glucocorticoides (ERG) en la región promotora de los genes diana dando como resultado la regulación de la expresión génica. Este proceso se revisa, por ejemplo, en Newton (Thorax 2000 55: 603-13). La activación del receptor de glucocorticoides inhibe la capacidad de NF- κ B y AP-1 para estimular la transcripción (véase, por ejemplo, Jonat, Cell 1990 62, 1189; Yang-Yen, Cell 1990 62, 1205; Diamond, Science 1990 249, 1266; y Caldenhoven, Mol. Endocrinol. 1995 9, 401).

55 Un ligando del receptor de glucocorticoides puede ser esteroideo o no esteroideo. En las siguientes solicitudes de patente de Estados Unidos publicadas se describen diversas clases ejemplares de ligandos de receptores de glucocorticoides: US20090227548, US20090170898, US20090137655, US20090105292, US20090075995, US20090074675, US20080090792, US20070281959, US20080076795, US20070281928 y US20070149577.

60 En algunas realizaciones, el ligando del receptor de glucocorticoides puede ser un glucocorticoide tal como dexametasona, betametasona, cortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, triamcinolona, acetato de fludrocortisona, flucortolona, clobetasol, diflorasona, mometasona, desoximetasona, incluyendo sales, solvatos e hidratos de los mismos. En realizaciones particulares, el ligando del receptor de glucocorticoides puede tener una fuerza de al menos 10 veces la fuerza de la hidrocortisona, como se revisa en Begg (Med J. Aust 1987 146: 37-41).

65

Los glucocorticoides y su mecanismo de acción se revisan en los siguientes libros: Glucocorticoid Hormone: Mechanisms of Action by Y. Sakamoto (Editor) Editorial: Springer-Verlag (junio de 1986); Glucocorticoid Action: Basic and Clinical Implications (Hardcover) by Tomoshige Kino (Editor), Editorial: Nueva York Academy of Sciences; segunda edición (30 de agosto de 2004); Glucocorticoids by Goulding (Author) Editorial: Springer/Sci-Tech/Trade; 1ª edición (11 de mayo de 2001); y Recent Advances in Glucocorticoid Receptor Action por A. Cato (Editor), Editorial: Springer; 1ª edición (11 de noviembre de 2002).

Se conocen las dosificaciones y vías de administración para los ligandos de los receptores de glucocorticoides.

10 *Ligandos de receptores de miostatina*

El ligando del receptor de miostatina empleado en el método objeto de la invención puede ser cualquier compuesto que se una y active al receptor de miostatina. Dichos compuestos incluyen compuestos peptídicos y no peptídicos, incluyendo péptidos de GDF8 definidos por los siguientes números de acceso al NCBI: GI: 9506907 (*Rattus norvegicus*), GI:6754752 (*Mus musculus*), GI:4885259 (*Homo sapiens*), GI:48314966 (*Bos Taurus*), GI:260809331 (*Branchiostoma floridae*), GI:51783959 (*Sus scrofa*), GI:47825371 (*Gallus gallus*), GI:18858751 (*Danio rerio*), GI: 121583758 (*Macaca mulatta*), GI:50950173 (*Canis lupus familiaris*), GI:120952608 (*Pan troglodytes*), GI:198417205 (*Ciona intestinalis*) y GI:57164247 (*Ovis aries*), incluyendo variantes activas y variantes peptidomiméticas de los mismos. La estructura del GDF8 humano se expone como MMDB ID: 75808 en la base de datos estructural del NCBI. En determinados casos, un ligando del receptor de miostatina usado en el presente documento puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica, por ejemplo, al menos 60 % idéntica, al menos 70 % idéntica, al menos 80 % idéntica, al menos 85 % idéntica, al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica, o al menos 98 % idéntica, a un ligando del receptor de miostatina de tipo silvestre.

25 Se conocen ensayos para identificar ligandos de receptores de miostatina e incluyen los descritos en las solicitudes de patente de Estados Unidos publicadas US20090220491, US20090098114, US20070149458, US20060216279, US20050272028 y US20040248121.

30 La función de GDF8 en la degeneración muscular activando el receptor de miostatina se ha revisado en diversas publicaciones, entre las que se incluyen Tsuchida (Expert Opin. Biol. Ther. 2006 6: 147-54), Wagner (Curr. Opin. Rheumatol. 2005 17: 720-4), Tsuchida (Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord. 2004 4: 157-66), y Bellinge (Anim. Genet. 2005 36: 1-6).

Se conocen las dosificaciones y vías de administración para los ligandos de los receptores de miostatina.

35 *Métodos*

Los ligandos del receptor de glucocorticoides y del receptor de miostatina descritos anteriormente se ponen en contacto con una célula de mamífero *in vitro* (es decir, los compuestos se ponen en contacto con células que crecen en cultivo). Los compuestos pueden ponerse en contacto con la célula simultáneamente (por ejemplo, los compuestos pueden mezclarse entre sí antes de poner en contacto los compuestos con la célula o los compuestos pueden combinarse por separado con la célula al mismo tiempo) o a tiempos diferentes. A continuación se describen métodos ejemplares *in vitro*.

45 En los métodos *in vitro*, cada ligando del receptor de glucocorticoides y ligando del receptor de miostatina puede ponerse en contacto entre sí independientemente con una célula de mamífero cultivada a una concentración que es coherente con el uso de los mismos compuestos individualmente a una concentración suficiente para efectuar una respuesta de una célula aislada, como se sabe en la técnica. En las referencias indicadas anteriormente, así como en muchas otras, se describen concentraciones ejemplares eficaces y generalmente están en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 1000 µg/ml, aunque en determinadas circunstancias también pueden emplearse concentraciones fuera de este intervalo. En términos generales, la puesta en contacto se realiza mezclando los compuestos con el medio de cultivo.

55 En la presente invención, la célula cultivada es un miocito cultivado, por ejemplo, una célula cultivada de origen musculoesquelético, del músculo liso o cardíaco. En realizaciones ejemplares, la célula cultivada puede ser una célula HL-1 (Clay-comb PNAS 1998 95: 2979-2984) una célula BWEM o CLEM (Enelmann *et al* Molecular and Cellular Biochemistry 1996 157), y mioblastos L6, o una célula C2C12, SM3, Aza2, BC3H-1, BD1, BD2, BD10, TD33, TD38, TD45, TG1, C2 o AT-1, por ejemplo. Se conocen métodos para cultivar dichas células.

60 La puesta en contacto de una célula cultivada con el ligando del receptor de glucocorticoides y el ligando del receptor de miostatina activa el receptor de glucocorticoides y el receptor de miostatina de la célula, alterando de este modo un fenotipo de la célula. En determinadas realizaciones, el método comprende mantener la célula en presencia de los compuestos durante un tiempo suficiente para que la célula muestre un fenotipo que no se produce en ausencia de los compuestos. En determinados casos, el fenotipo puede ser un fenotipo de proliferación celular, un fenotipo de muerte celular (apoptosis), un cambio en el tamaño o forma de las células, una respuesta inflamatoria (observada como una producción alterada de un mediador antiinflamatorio, por ejemplo), un patrón de tinción

alterado, o una expresión génica alterada. En realizaciones particulares, el fenotipo puede ser una respuesta atrofica, como se define anteriormente.

En determinados casos, las células pueden contener un sistema indicador para evaluar la expresión génica en la célula. Por ejemplo, la célula puede contener una secuencia codificante para una proteína indicadora (por ejemplo, luciferasa o GFP), unida operativamente a un promotor (por ejemplo, un promotor que se induce o se reprime durante el desarrollo de la célula muscular o desgaste muscular), donde el contacto de la célula con los compuestos induce o reprime la expresión de la proteína indicadora. En determinadas realizaciones, el promotor puede ser un promotor atrógeno, y la puesta en contacto de la célula con un ligando del receptor de glucocorticoides y con un ligando del receptor de miostatina induce la producción de la proteína indicadora. En realizaciones particulares, el genoma de la célula puede alterarse, por ejemplo, insertando una secuencia codificante para una proteína indicadora en un gen endógeno (por ejemplo, un gen atrógeno) de tal manera que la expresión del indicador está unida operativamente al promotor endógeno, o insertando, en el genoma de la célula, un ácido nucleico recombinante que contenga tanto un promotor como una secuencia codificante indicadora.

En métodos *in vivo*, también descritos en el presente documento, el ligando del receptor de glucocorticoides y el ligando del receptor de miostatina pueden ponerse en contacto con una célula de mamífero mediante la administración de los compuestos a concentraciones independientes que son coherentes con el uso de los mismos compuestos individualmente a una concentración suficiente para efectuar una respuesta del animal, como se sabe en la técnica. En las referencias indicadas anteriormente, así como en muchas otras, se describen concentraciones ejemplares eficaces, y en general, están independientemente en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 500 miligramos de los compuestos por kilogramo del animal por dosis, por ejemplo, de al menos aproximadamente 0,1 a 100 miligramos de agente/kilogramo, aunque en algunas circunstancias pueden emplearse concentraciones fuera de este intervalo. En términos generales, la puesta en contacto se realiza administrando al animal los compuestos, por ejemplo, por vía oral o inyección (que puede ser intravenosa o intramuscular), por vía local o sistémica. El animal empleado en el ensayo puede ser cualquier animal, particularmente un mamífero, tal como un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata).

La administración al animal del ligando del receptor glucocorticoides y del ligando del receptor de miostatina activa al receptor de glucocorticoides y al receptor de miostatina en las células del animal, alterando de este modo un fenotipo del animal. En determinadas realizaciones, después de haber administrado los compuestos, el método puede comprender mantener al animal durante un tiempo suficiente para que el animal muestre un fenotipo que no se produce en ausencia de los compuestos. En determinados casos, el fenotipo puede ser un fenotipo relacionado con cáncer (un fenotipo de proliferación celular, de muerte celular, o relacionado con metástasis) o un fenotipo mediado por una respuesta inflamatoria (por ejemplo un cambio en la respuesta del sistema inmunitario a una exposición). En realizaciones particulares, el fenotipo puede ser una respuesta atrofica, como se define anteriormente, en el que en determinadas realizaciones puede observarse como un cambio en la masa muscular, un cambio en la sección transversal muscular o una regulación negativa de la síntesis de miosina, una activación de la ruta de degradación de miosina (por ejemplo, mediante la activación de la ruta ubiquitina/proteasoma dependiente de ATP o inducción de una ubiquitina ligasa E3).

En determinados casos, las células pueden contener un sistema indicador recombinante para evaluar la expresión génica en el animal. Por ejemplo, el animal puede contener una secuencia codificante para una proteína indicadora (por ejemplo, luciferasa o GFP), unida operativamente a un promotor (por ejemplo, un promotor que se induce o reprime durante el desarrollo de la célula muscular o desgaste muscular), en el que la puesta en contacto de la célula con los compuestos induce o reprime la expresión de la proteína indicadora. En determinadas realizaciones, el promotor puede ser un promotor atrógeno, y la administración al animal de un ligando del receptor de glucocorticoides y un ligando del receptor de miostatina induce la producción de la proteína indicadora. En realizaciones particulares, el genoma del animal puede alterarse, por ejemplo, insertando en un gen endógeno (por ejemplo, un gen atrógeno) una secuencia codificante, de tal manera que la expresión del indicador esté unida operativamente a la del promotor endógeno, o insertando en el genoma de la célula un ácido nucleico recombinante que contenga tanto un promotor como una secuencia codificante indicadora.

Ensayos de exploración

El método descrito anteriormente puede emplearse en un ensayo de exploración para identificar un agente que module el fenotipo inducido por el ligando del receptor de glucocorticoides y el ligando del receptor de miostatina. En realizaciones particulares, el método puede emplearse para identificar un agente que module el inicio de la atrofia de la célula muscular. En realizaciones ejemplares, el método implica poner en contacto una célula en cuestión (es decir, una célula puesta en contacto con el ligando del receptor de glucocorticoides y con el ligando del receptor de miostatina, cuya célula está presente *in vitro*) con un agente candidato, y determinar el efecto, si hubiera, del agente candidato, sobre el fenotipo inducido por el ligando del receptor de glucocorticoides y ligando del receptor de miostatina. En una realización particular, el fenotipo puede valorarse evaluando la producción de una proteína indicadora. En algunas realizaciones, el método implica poner en contacto una célula (*in vitro*) con un agente candidato en presencia de un ligando del receptor de glucocorticoides y un ligando del receptor de miostatina; y determinar si el agente candidato altera el fenotipo de la célula, en el que el fenotipo se produce en respuesta al

ligando del receptor de glucocorticoides y al ligando del receptor de miostatina.

El término “agente”, de la mera en la que se usa en el presente documento, describe cualquier molécula, por ejemplo, un compuesto farmacéutico orgánico o inorgánico proteico o no proteico. Los agentes de interés particular son los que inhiben el inicio de la atrofia de la célula muscular. En paralelo se ejecuta una pluralidad de ensayos con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Una de estas concentraciones puede servir como un control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

En el presente documento las expresiones “agente candidato”, “agente de ensayo”, “agente”, “sustancia” y “compuesto” se usan indistintamente. Los agentes candidatos incluyen numerosas clases químicas, típicamente moléculas sintéticas, semisintéticas u orgánicas o inorgánicas de origen natural. Los agentes candidatos incluyen los encontrados en grandes bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, se dispone de bibliotecas de compuestos sintéticos en el comercio de Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK), ComGenex (South San Francisco, CA), y Micro-Source (New Milford, CT). Como alternativa, en Pan Labs (Bothell, WA) se dispone de bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales o pueden producirse fácilmente.

Los agentes candidatos pueden ser compuestos orgánicos o inorgánicos pequeños que tienen un peso molecular mayor de 50 y menor de aproximadamente 2.500 Da. Los agentes candidatos pueden comprender grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces hidrógeno, y pueden incluir al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, y pueden contener al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos pueden comprender estructuras cíclicas de carbono o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. También se encuentran agentes candidatos entre biomoléculas, incluyendo péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Los agentes candidatos se obtienen de una amplia variedad de fuentes, incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, se dispone de numerosos medios para la síntesis al azar y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligopéptidos aleatorizados. Como alternativa, se dispone de bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales o se producen fácilmente. Adicionalmente, las bibliotecas y los compuestos que se producen de un modo natural o sintético, se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc., para producir análogos estructurales. También pueden crearse nuevos posibles agentes terapéuticos usando métodos tales como el diseño racional de fármacos o modelado por ordenador.

La exploración puede dirigirse a compuestos conocidos farmacológicamente activos y a análogos químicos de los mismos, o a nuevos agentes con propiedades desconocidas tales como los creados a través del diseño racional de fármacos.

Los agentes que modulan un fenotipo pueden disminuir el fenotipo en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, o al menos 90 %, o más, con respecto a un control que no se ha expuesto al agente.

Los agentes que modulan el fenotipo pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc., para producir análogos estructurales. Dichos análogos estructurales incluyen los que aumentan la biodisponibilidad y/o reducen la citotoxicidad. Los expertos en la técnica pueden diseñar y generar fácilmente una amplia variedad de análogos estructurales y someterlos a ensayo con respecto a propiedades deseadas, tales como un aumento de la biodisponibilidad y/o una reducción de la citotoxicidad, etc.

En una realización particular, se proporciona un método *in vitro* para identificar agentes que modulan el inicio de la atrofia de la celular muscular. Este método generalmente implica poner en contacto una célula cultivada que produce una proteína indicadora después del inicio de la atrofia de la célula muscular, con un agente candidato en presencia de un ligando del receptor de glucocorticoides y de un ligando del receptor de miostatina; y determinar si el agente candidato disminuye la producción de la proteína indicadora en la célula, en comparación con una célula de control no tratada con el agente candidato.

La célula puede ponerse en contacto con el ligando del receptor de glucocorticoides y con un ligando del receptor de miostatina antes, después o de manera simultánea, con el contacto de la célula con un agente candidato.

La producción de la proteína(s) indicadora(s) puede monitorizarse a diferentes momentos antes y después de someter a las células a condiciones que inducen el fenotipo. De manera similar, el efecto de un agente candidato puede determinarse midiendo el fenotipo a diversos momentos. Por ejemplo, la producción de la proteína(s) indicadora(s) puede medirse 5 minutos, 30 minutos, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 120 h, 1 semana,

2 semanas y hasta 1 mes, después de haber puesto en contacto la célula con un agente candidato.

Se describe un ensayo de exploración *in vivo* para identificar agentes que modulan el inicio de la atrofia de las células musculares. Este método generalmente implica administrar, a un animal, un agente candidato, un ligando del receptor de glucocorticoides y un ligando del receptor de miostatina, que produce una proteína indicadora, después del inicio de la atrofia de las células musculares; y determinar si el agente candidato disminuye la producción de la proteína indicadora en el animal en comparación con un animal de control al cual no se le ha administrado el agente candidato.

Cualquier fenotipo producido en el sistema *in vivo* se monitoriza a diferentes momentos antes y después de la administración del agente candidato al animal. Por ejemplo, el efecto de un agente candidato puede determinarse midiendo las proteínas indicadoras a diversos momentos. Por ejemplo, la producción de una proteína(s) indicadora(s) pueden medirse al cabo de 0 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 120 h, 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 5 meses, etc., después de haber puesto en contacto la célula con un agente candidato. En determinadas realizaciones, la medición de las proteínas indicadoras puede realizarse midiendo la expresión del gen (o genes) atrógeno, así como midiendo el tamaño de la célula/fibra, la morfología, la fuerza muscular, etc.

Cualquier agente identificado por el método descrito anteriormente puede ensayarse adicionalmente en un modelo animal. Por ejemplo, en una realización, un animal puede someterse a un estímulo inductor de atrofia y ponerse en contacto con un agente candidato. Pueden usarse diversas condiciones que se sabe que inducen a la atrofia. En un animal, la atrofia de las células musculares puede iniciarse mediante diversos estímulos, que incluyen, pero sin limitación ayuno, envejecimiento, diabetes, cáncer avanzado, insuficiencia renal, septicemia, caquexia, artritis, osteoporosis, diabetes, denervación, inmovilización, descarga muscular, lesión de médula espinal, tratamiento con glucocorticoides y similares. La atrofia de las células musculares *in vitro* puede iniciarse por inanición, exposición de las células, por ejemplo, a glucocorticoides, o a virus.

También se describe una composición que comprende una célula de mamífero, un ligando del receptor de glucocorticoides y un ligando del receptor de miostatina. La célula y los ligandos que pueden estar presentes en la composición se han indicado más detalladamente en líneas anteriores.

Utilidad

Los ensayos *in vitro* presentados en este documento proporcionan métodos para identificar y ensayar agentes que modulan diversos fenotipos, incluyendo los que disminuyen la atrofia de las células musculares. Estos agentes pueden usarse en formulaciones que pueden usarse para tratar sujetos con atrofia de las células musculares. Además, estos agentes pueden darse profilácticamente a sujetos que están en riesgo de desarrollar atrofia de las células musculares, por ejemplo, antes de una cirugía en la que el paciente necesitará con un respirador. Un sujeto que puede beneficiarse de un agente identificado por los métodos proporcionados en el presente documento puede tener, o correr riesgo de desarrollar, atrofia de las células musculares producida por diversos estímulos. Estos estímulos incluyen, pero sin limitación, ayuno, envejecimiento, cáncer avanzado, insuficiencia renal, septicemia, caquexia, artritis, osteoporosis, y diabetes. La atrofia de los músculos también puede producirse por su desuso o denervación, por ejemplo, inmovilización, descarga muscular, lesión de la médula espinal, etc. En determinadas realizaciones, el sujeto puede tener un problema de salud que esté agravado por la atrofia de las células musculares, tal como VIH, insuficiencia cardíaca crónica, retinopatía crónica, cirrosis hepática, lesiones por quemadura, osteoporosis, artritis, etc. Pueden usarse métodos de uso de células para explorar compuestos candidatos que inhiben la atrofia de las células musculares identificando agentes que mejoran el contenido de las proteínas, el diámetro de la fibra, la producción de fuerza, y la resistencia a la fatiga de los músculos en sujetos con atrofia de las células musculares.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar e ilustrar adicionalmente determinadas realizaciones y aspectos de la presente invención y no deben considerarse como limitantes de su alcance.

Ejemplo 1

Células HepG2 cultivadas se expusieron a dexametasona 1 μM , a dexametasona 10 μM , a GDF8 100 ng/ml, a TGF β 1 100 ng/ml y a dexametasona 10 μM + GDF8 100 ng/ml, y se evaluó la expresión de MuRF1 endógeno por RT-PCR usando el ensayo de la PCR-en tiempo real de TaqMan. En la Figura 1 se muestran los resultados. MuRF1 endógeno se indujo 22 veces sobre el control sin tratamiento. La dexametasona 10 μM indujo la expresión de MuRF1 endógeno 2,5 veces sobre el control sin tratamiento, y GDF8 100 ng/ml indujo la expresión de MuRF1 endógeno 1,8 veces sobre el control sin tratamiento. Dado que el tratamiento con una combinación tanto de dexametasona como de GDF8 causó una inducción de MuRF1 que estaba muy por debajo de la inducción de MuRF1 por dexametasona y GDF8 individualmente, la expresión de MuRF1 endógeno se regula positivamente de un modo sinérgico con dexametasona y GDF8.

La Figura 2 muestra una evolución de la inducción de MuRF1 después de tratar a las células HepG2 tanto con dexametasona 10 μ M como con GDF8 100 ng/ml. La inducción de MuRF1 es observable a las cuatro horas de tratamiento, en comparación con los controles.

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:
 - 5 poner en contacto una célula muscular de mamífero cultivada *in vitro* con un ligando del receptor de glucocorticoides y con un ligando del receptor de miostatina, activando de este modo dicho receptor de glucocorticoides y dicho receptor de miostatina, en el que dicha puesta en contacto inicia una respuesta atrófica en la célula muscular de mamífero.
 - 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha célula muscular cultivada comprende un ácido nucleico recombinante que comprende un promotor que está inducido por dicho ligando del receptor de glucocorticoides y dicho ligando del receptor de miostatina, unido operativamente a una secuencia codificante que codifica una proteína indicadora.
 - 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho ligando del receptor de glucocorticoides es dexametasona.
 4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho ligando del receptor de miostatina es GDF8.
5. Un método de exploración que comprende:
 - 20 poner en contacto una célula muscular cultivada *in vitro* con un agente candidato en presencia de un ligando del receptor de glucocorticoides y de un ligando del receptor de miostatina; y
 - determinar si dicho agente candidato altera un fenotipo de dicha célula muscular inducida en respuesta a dicho ligando del receptor de glucocorticoides y a dicho ligando del receptor de miostatina, en el que el fenotipo es una
 - 25 respuesta atrófica.
 6. El método de la reivindicación 5, en el que dicha determinación se realiza midiendo la expresión de un gen atrógeno por dicha célula.
 - 30 7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha determinación se realiza midiendo la producción de una proteína indicadora, en la que dicha proteína indicadora se produce usando una construcción promotor de atrógeno-proteína indicadora.

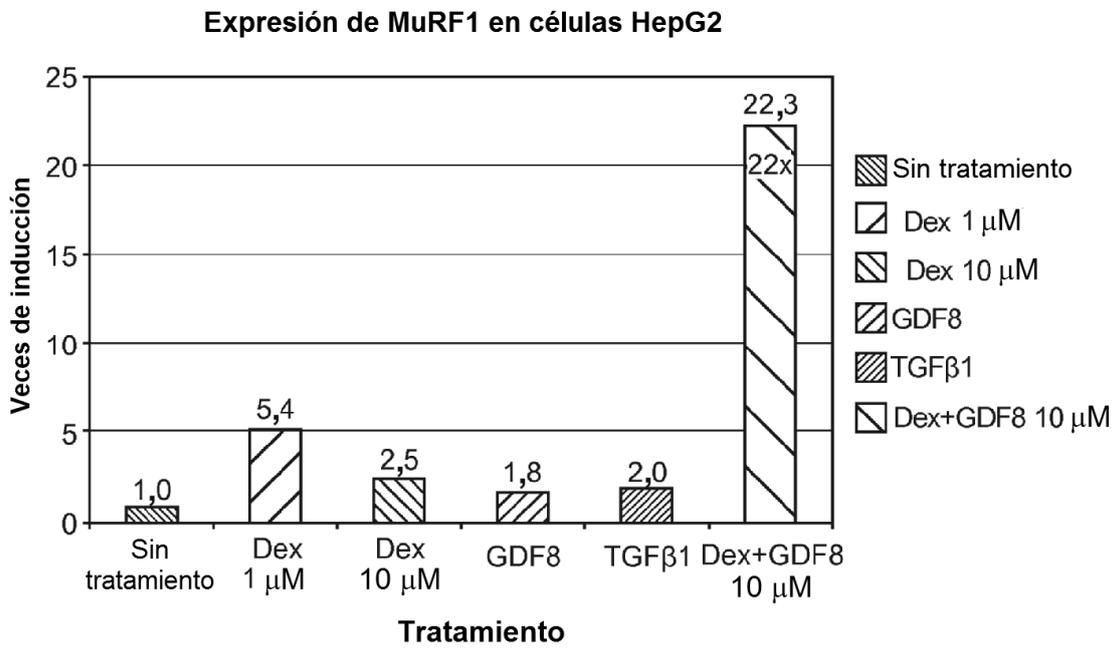


FIG. 1

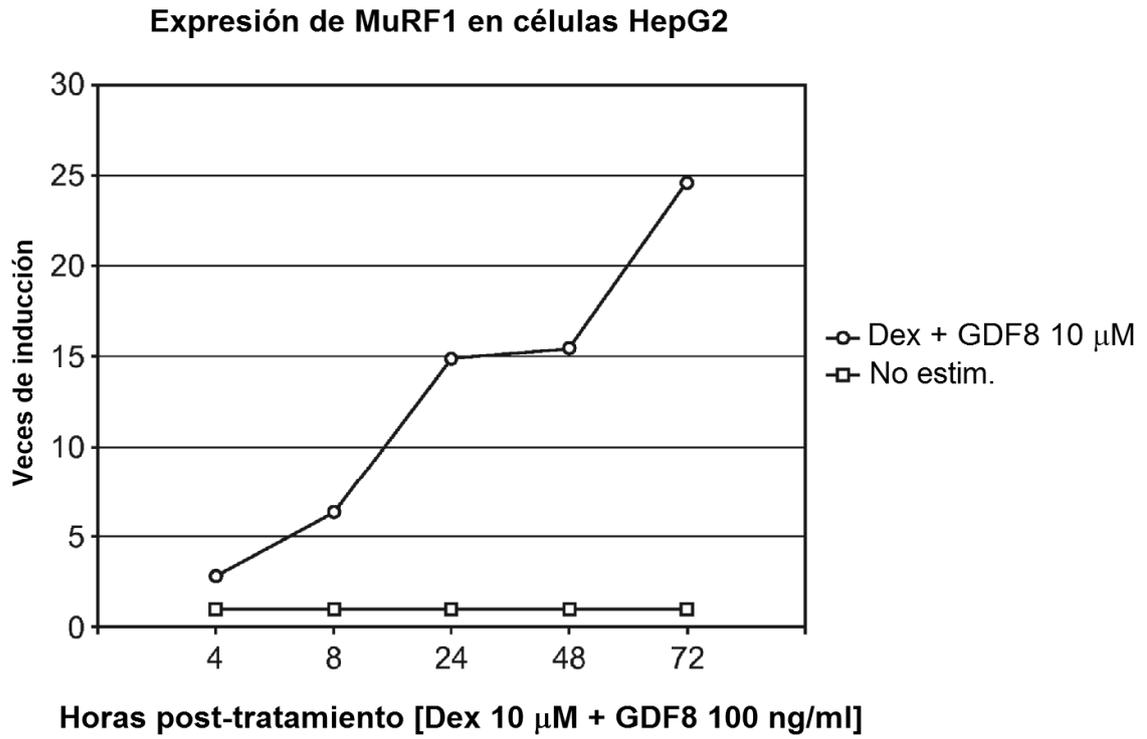


FIG. 2