

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 889**

51 Int. Cl.:

A01K 67/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2011 PCT/US2011/053298**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012 WO12044585**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2011 E 11829785 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2621268**

54 Título: **Modelo de atrofia muscular**

30 Prioridad:

30.09.2010 US 388459 P

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

16.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KINSELLA, TODD M. y
PAYAN, DONALD G.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 629 889 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

Modelo de atrofia muscular

5 Antecedentes

Una pérdida general de masa muscular o atrofia es una respuesta característica a ayunas, además de muchas enfermedades, que incluyen cáncer avanzado, insuficiencia renal, septicemia, caquexia, artritis, osteoporosis y diabetes. La atrofia de músculos también resulta de su desuso o denervación, por ejemplo, inmovilización, descarga muscular, lesión de médula espinal, etc. La atrofia contribuye sustancialmente a muchos problemas de salud comunes, que incluyen, pero no se limitan a, VIH, insuficiencia cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, cirrosis hepática, lesiones por quemaduras, osteoporosis, artritis etc. Independientemente de la causa de la atrofia muscular, la atrofia muscular esquelética se caracteriza por una disminución en el contenido de proteína, diámetro de fibra, producción de fuerza y resistencia a la fatiga.

La pérdida de masa muscular asociada a la progresión de atrofia se ha estudiado en animales sometidos a denervación, inmovilización, inanición y animales implantados con células cancerosas capaces de inducir atrofia muscular progresiva. Alternativamente, la atrofia puede inducirse en animales sometidos a administración de glucocorticoides. En estos animales, el grado de atrofia muscular progresiva puede evaluarse empleando una variedad de mediciones que registran cambios en los pesos de músculo o área en sección transversal de fibra, y realizando experimentos cinéticos usando un gran número de animales, etc. La detección de un cambio significativo en la masa muscular o en la cinética frecuentemente requiere un largo periodo de espera. La medición del peso de músculo y el área en sección transversal de fibra requieren engorrosos procedimientos quirúrgicos, mediciones del área en sección transversal y frecuentemente el animal se sacrifica. Así, tales procedimientos normalmente requieren un gran número de animales y excluye ser capaces de seguir un conjunto de músculos, temporalmente, en el mismo animal.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a líneas celulares y modelos animales para monitorizar el inicio y/o la progresión de la atrofia muscular.

30 Sumario

Se proporciona un modelo animal no humano para la atrofia de células musculares como se define en la reivindicación 1. El animal comprende células musculares que comprenden un genoma nuclear que comprende un gen atrógeno biológicamente activo en enlace operativo con una construcción indicadora que comprende: i. una primera secuencia codificante para proteína detectable fluorescente o luminiscente; y ii. una segunda secuencia codificante de una enzima indicadora secretada. El gen atrógeno, la proteína detectable y la enzima indicadora secretada se co-expresan y así el inicio de la atrofia de células musculares produce la producción de la enzima indicadora secretada y la proteína detectable por la célula. También se proporcionan ensayos de cribado que emplean el animal.

En una realización, el gen atrógeno biológicamente activo es endógeno para la célula, mientras que en otras realizaciones el gen atrógeno biológicamente activo no es endógeno a dicha célula. Por ejemplo, la célula puede comprender además un gen atrógeno endógeno, y dicho gen atrógeno activo biológico está comprendido en una construcción recombinante que está presente en un locus diferente al gen atrógeno endógeno.

En realizaciones particulares, la inducción del promotor atrógeno por atrofia de células musculares produce la secreción de la enzima indicadora secretada en la circulación sanguínea del animal, permitiendo así que se monitorice la inducción del gen atrógeno en la sangre del animal. La proteína ópticamente detectable, por ejemplo, luciferasa, puede usarse para detectar dónde en el animal se produce la atrofia de células musculares.

En realizaciones particulares, la construcción indicadora puede estar presente en UTR 3' del gen atrógeno. En algunas de estas realizaciones, la construcción indicadora puede codificar una secuencia de derivación traduccional que está presente entre la primera secuencia codificante y la segunda secuencia codificante, permitiendo así la co-expresión de las dos proteínas indicadoras. Además, la construcción indicadora puede también codificar una secuencia de derivación traduccional que está presente entre el exón final del gen atrógeno la primera secuencia codificante, permitiendo así la co-expresión del gen atrógeno y las proteínas indicadoras. En otras realizaciones, la primera y segunda secuencias codificantes pueden estar operativamente unidas al gen atrógeno mediante un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). La construcción indicadora puede, en ciertos casos, codificar una secuencia de derivación traduccional que está presente entre la primera secuencia codificante y la segunda secuencia codificante.

En realizaciones particulares, el IRES puede ser un virus de la hepatitis C (VHC) e, independientemente, la secuencia de derivación traduccional puede ser la secuencia de la derivación traduccional de FMDV 2A.

65

En la invención, la proteína ópticamente detectable es una proteína fluorescente o luciferasa, por ejemplo, y la enzima indicadora secretada puede ser, por ejemplo, una fosfatasa alcalina secretada.

5 El animal, que en ciertas realizaciones puede ser un roedor tal como una rata, puede ser homocigótico o heterocigótico para el gen atrógeno.

10 En casos particulares, la célula del animal puede producirse insertando la construcción indicadora en dicha UTR 3' de un gen atrógeno que es endógeno a dicha célula. En otros casos, la célula puede producirse insertando un ácido nucleico recombinante que comprende dicho gen atrógeno y la construcción indicadora en dicho genoma en un locus diferente a una versión endógena del gen atrógeno.

15 También se proporciona una célula muscular que comprende un genoma nuclear que comprende un gen atrógeno biológicamente activo en enlace operativo con una construcción indicadora como se define en las reivindicaciones. Esta célula comprende una primera secuencia codificante para una proteína detectable fluorescente o luminiscente, y una segunda secuencia codificante de una enzima indicadora secretada; en la que la expresión del gen atrógeno se induce tras el inicio de la atrofia de células musculares, produciendo así la producción de dicha enzima indicadora secretada y dicha proteína detectable por dicha célula.

20 También se proporciona un método de cribado. En realizaciones particulares, este método puede comprender: a) poner en contacto el animal no humano anteriormente descrito con un agente candidato en condiciones que inducen la atrofia de células musculares; y b) determinar si el agente candidato altera la producción de la enzima indicadora secretada y dicha proteína detectable por dicho animal. En realizaciones particulares, el método puede comprender además: a) administrar el agente candidato a un animal en condiciones que inducen la atrofia de células musculares; y b) determinar si el agente candidato modula la atrofia de células musculares.

25 Las condiciones que inducen la atrofia de células musculares pueden comprender poner en contacto la célula con un agente inductor de atrofia de células musculares, por ejemplo, un agente que comprende un glucocorticoide.

30 Si se emplea un animal en el método, el método puede comprender además medir la actividad de la enzima indicadora secretada en la sangre del animal y obtener imágenes de dicho animal para detectar la expresión de la proteína ópticamente detectable.

35 En ciertas realizaciones, el modelo animal puede comprender una célula recombinante que comprende un promotor atrógeno operativamente unido a una primera secuencia codificante de una enzima indicadora secretada y una segunda secuencia codificante para una proteína ópticamente detectable, donde la inducción del promotor produce la producción de la enzima indicadora secretada y la primera proteína ópticamente detectable por la célula. La construcción puede integrarse al azar o específicamente en sitio en el genoma de la célula. En ciertas realizaciones, el genoma nuclear de la célula puede comprender: a) un gen atrógeno que comprende: un promotor atrógeno, una secuencia codificante de una proteína atrógena y una UTR 3'; y b) una construcción indicadora que comprende: i) un IRES, ii) una primera secuencia codificante de una enzima indicadora secretada, y iii) una segunda secuencia codificante de una primera proteína ópticamente detectable; donde el IRES está operativamente unido a la primera y segunda secuencias codificantes, donde la construcción indicadora está presente en la UTR 3', y donde el promotor atrógeno se induce tras el inicio de la atrofia de células musculares, produciendo así la producción de la enzima indicadora secretada y la primera proteína ópticamente detectable por la célula. Se proporcionan células aisladas que comprenden un genoma nuclear que comprende la construcción indicadora, por ejemplo, presente en UTR 3' de un gen atrógeno como se ha descrito anteriormente, y métodos de uso del modelo animal y células.

Breve descripción de los dibujos

50 El archivo de la patente o de solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. Copias de la presente publicación de patente o de solicitud de patente con dibujo(s) en color serán proporcionadas por la Oficina tras la solicitud y pago de la tasa necesaria.

55 La Fig. 1A ilustra esquemáticamente una realización de una construcción indicadora. La Fig. 1B ilustra esquemáticamente otra realización de una construcción indicadora.

La Fig. 2 muestra un plásmido que contiene una construcción indicadora.

60 La Fig. 3 muestra la secuencia para las secuencias de unión 2A.1, 2A.2 y 2A.3 con conectores flexibles (panel superior: SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2; panel central SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4; y panel inferior: SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente).

65 La Fig. 4 ilustra esquemáticamente una construcción indicadora y su localización en el ADN genómico de un ratón transgénico. También se muestra la detección de proteínas indicadoras en el ratón por obtención de imágenes *in vivo*.

La Fig. 5 ilustra esquemáticamente una construcción indicadora y su localización en el ADN genómico de un ratón transgénico. El panel inferior muestra otra construcción integrada en el genoma de este ratón. También se muestra la detección de proteínas indicadoras en el ratón por obtención de imágenes *in vivo*.

5 La Fig. 6 representa la obtención de imágenes *in vivo* de tomografía 3D de animal completo para detectar músculos que expresan una proteína indicadora de fluorescencia/bioluminiscencia.

10 La Fig. 7 ilustra una configuración en la que una construcción indicadora se inserta en la UTR 3' de un gen MuRF1 endógeno. En esta realización, se emplean secuencias de derivación traduccional para proporcionar la co-expresión de MuRF1, luciferasa y SEAP.

15 La Fig. 8 ilustra una configuración en la que una construcción indicadora se inserta en la UTR 3' de un gen de atrogina-1 endógeno. En esta realización, se emplean secuencias de derivación traduccional para proporcionar la co-expresión de atrogina-1, luciferasa y SEAP.

20 La Fig. 9 ilustra una configuración en la que una construcción indicadora se inserta en la UTR 3' de un gen MuRF-1 que está presente en un BAC. En esta realización, se emplean un IRES y una secuencia de derivación traduccional para proporcionar la co-expresión de MuRF1, luciferasa y SEAP.

20 Definiciones

25 Los términos "determinar", "medir", "evaluar", "valorar" y "ensayar" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier forma de medición, e incluyen determinar si un elemento está presente o no. Estos términos incluyen ambos, determinación cuantitativa y/o cualitativa. La valoración puede ser relativa o absoluta. "Determinar la presencia de" incluye determinar la cantidad de algo presente, además de determinar si está presente o ausente.

30 El término "poner en contacto" significa juntar o poner juntos. Como tal, un primer artículo se pone en contacto con un segundo artículo cuando los dos artículos se juntan o ponen juntos, por ejemplo, tocándose entre sí o combinándolos en la misma solución.

35 La expresión "señal óptica" se refiere a señal de luz que puede detectarse por un fotodetector, por ejemplo, un microscopio óptico, un espectrofotómetro, un microscopio fluorescente, un lector de muestras fluorescentes, o un citómetro activado por fluorescencia, tomógrafo 3D, una cámara, etc.

40 El término "proteína ópticamente detectable" se refiere a una proteína cuya expresión puede detectarse por la presencia de una señal óptica producida por la proteína. Una señal óptica se produce por una proteína, por ejemplo, cuando la proteína es capaz de ser excitada por una longitud de onda particular de luz y emite otra longitud de onda de luz que es detectable. Una señal óptica se produce por una proteína, por ejemplo, cuando la proteína cataliza una reacción que produce una señal de luz. Proteínas fluorescentes, proteínas luminiscentes, etc., son ejemplos de proteínas ópticamente detectables.

45 El término "gen" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una región promotora, una secuencia codificante y una UTR 3'.

Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente en el presente documento.

50 Una "secuencia señal" es una secuencia de aminoácidos presente en la porción de extremo N de una proteína que facilita la secreción de la forma madura de la proteína de la célula. La definición de una secuencia señal es de una funcional. La forma madura de la proteína extracelular carece de la secuencia señal, que se escinde durante el proceso de secreción.

55 El término "ácido nucleico" engloba ADN, ARN, monocatenario o bicatenario, y modificaciones químicas de los mismos. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente en el presente documento.

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

60 Los términos "roedor" y 'roedores' se refieren a todos los miembros del orden filogenético Rodentia que incluye todos y cada uno de la progenie de todas las generaciones futuras derivadas de los mismos.

El término "murino" se refiere a todos y cada uno de los miembros de la familia Muridae, que incluye ratas y ratones.

65 El término "progenie" o "descendencia" se refiere a todas y cada una de las generaciones futuras derivadas y que descienden de un mamífero particular. Así, la progenie de cualquier generación sucesiva está incluida en el presente documento de forma que la progenie, las generaciones F1, F2, F3, etc., están incluidas en esta definición.

- La expresión "animal transgénico" se refiere a un animal que comprende células que contienen ácido nucleico extraño (es decir, ácido nucleico recombinante que no es nativo para el animal). El ácido nucleico extraño puede estar presentes en todas las células del animal o en algunas, pero no todas las células del animal. La molécula de ácido nucleico extraña se llama un "transgén" y puede contener uno o muchos genes, ADNc, etc. Insertando un transgén en un ovocito fecundado o células del embrión precoz, el animal transgénico resultante puede ser completamente transgénico y capaz de transmitir el ácido nucleico extraño establemente en su línea germinal. Alternativamente, un ácido nucleico extraño puede introducirse por transferencia, por ejemplo, implantación, de una célula recombinante o tejido que contiene el mismo en un animal para producir un animal parcialmente transgénico.
- La expresión "recombinasas específicas de sitio" se refiere a enzimas que están presentes en algunos virus y bacterias y han sido caracterizadas por tener tanto propiedades de endonucleasa como de ligasa. Las recombinasas específicas de sitio catalizan al menos los cuatro siguientes eventos (a) delección de un fragmento de ADN flanqueado por "sitios que se dirigen a recombinasas específicas de sitio compatibles" (SSRTS) en la misma orientación (por ejemplo, cabeza a cola o cola a cabeza); (b) inversión de un fragmento de ADN flanqueado por SSRTS compatible en la orientación opuesta (por ejemplo, cabeza a cabeza o cola a cola); (c) integración de un fragmento de ADN cíclico que contiene un SSRTS en un SSRTS compatible; y (d) translocación cromosómica entre SSRTS compatibles localizados en diferentes cromosomas. Para realizar aquellas reacciones, la recombinasa específica de sitio tiene normalmente al menos las cuatro siguientes actividades: (1) reconocimiento de una o dos secuencias de ADN específicas; (2) escisión de dicha secuencia o secuencias de ADN; (3) actividad de ADN topoisomerasa implicada en el intercambio de cadenas; y (4) actividad de ADN ligasa para volver a sellar las cadenas escindidas de ADN (Sauer, B., Cur. Opin. Biotech. 5: 521-527, 1994). El término "recombinasa" o "recombinasa específica de sitio" se refiere a enzima(s) que llevan a cabo la recombinación específica de sitio (SSR) para alterar la estructura de ADN. Esta definición incluye transposasas, enzimas de integración/escisión lambda y recombinasas específicas de sitio. Ejemplos muy conocidos de recombinasas pueden encontrarse en Cre-lox, FLP/FRT, R/RS, Gin/gix, un sistema pSR1, un sistema cer y un sistema fim (por ejemplo, N. L. Craig, Annu. Rev. Genet. 22:17, 1988); Odell et al., Homologous Recomb. Gene Silencing Plants, 1994, pp. 219-270, Paszkowski, Jerzy, ed. Kluwer: Dordrecht, Alemania). Adicionalmente, se han identificado sistemas de SSR en microorganismos tales como fago, bacteria (por ejemplo, *E. coli*), levadura y similares.
- La expresión "sitio que se dirige a recombinasas específicas de sitio" o "sitio de recombinasa" o "secuencia específica de sitio" significa una secuencia de ADN que reconocerá una recombinasa específica de sitio compatible y a la que se unirá. Se apreciará que ésta puede ser un sitio de recombinasa no mutante o mutante, en tanto que se mantenga la funcionalidad y la enzima recombinasa pueda todavía reconocer el sitio, unirse a la secuencia de ADN y catalizar la recombinación entre dos sitios de recombinasa adyacentes.
- El término "flanqueado por *lox P*" se refiere al flanqueamiento de un elemento genético, o una porción del mismo, con secuencias específicas de sitio en tándem. Las secuencias específicas de sitio pueden estar orientadas en la misma orientación, es decir, directamente repetida (de forma que el elemento de ADN se elimine con el SSR), o en orientaciones opuestas la una a la otra (de forma que el elemento de ADN se invierta con el SSR). El elemento flanqueado por *lox P* puede ser un promotor individual, un elemento "STOP" transcripcional, un promotor operativamente unido a una secuencia diana, o una combinación de estos y otros elementos genéticos.
- El término "intrones" se refiere a secuencias de ADN encontradas en el centro de muchas secuencias de genes en la mayoría de los eucariotas. Estas secuencias de intrones se transcriben, pero se eliminan de dentro del transcrito de pre-ARNm antes de que el ARNm se traduzca en una proteína. Este proceso de eliminación de intrones se produce por auto-corte y empalme de las secuencias (exones) en cualquier lado del intrón.
- El término "operativamente unidas" se refiere a la asociación de secuencias de ácidos nucleicos en un fragmento de ácido nucleico individual de manera que la función de una se afecte por la otra. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido con una secuencia codificante cuando es capaz de afectar la expresión de esa secuencia codificante (es decir, la secuencia codificante está bajo el control de la transcripción del promotor). Similarmente, cuando un IRES está operativamente unido a una secuencia codificante, el IRES proporciona la traducción del ARNm transcrito de esa secuencia codificante. Otro ejemplo de secuencia operativamente unida es cuando una secuencia está presente en la UTR 3' de un gen. Esta secuencia está operativamente unida a la región promotora de ese gen. Dos elementos que están operativamente unidos incluyen dos elementos que están en tándem, además de un elemento insertado en el otro. "No unido" significa que los elementos genéticos asociados no están estrechamente asociados entre sí y la función de uno no afecta a la del otro.
- Cuando dos elementos se "co-expresan", se inducen al mismo tiempo y se reprimen al mismo tiempo. Los niveles a los que dos proteínas se co-expresan no necesitan ser los mismos para que se co-expresen.
- El término "homocigótico" indica que alelos idénticos residen en los mismos loci en cromosomas homólogos. A diferencia, "heterocigótico" indica que alelos diferentes residen en los mismos loci en cromosomas homólogos. Un animal transgénico puede ser homocigótico o heterocigótico para un transgén.

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 un sustrato y su enzima asociada (o proteína) que catalizan una reacción productora de luz.

5 La expresión "obtención de imágenes *in vivo*", como se usa en el presente documento, se refiere a métodos de detección de la presencia de una proteína ópticamente detectable en el animal vivo entero. Pueden detectarse proteínas ópticamente detectables tales como proteínas fluorescentes y luciferasas por obtención de imágenes *in vivo*. Pueden usarse obtención de imágenes *in vivo* para proporcionar imágenes 2D además de 3D de un animal. Pueden usarse cámaras de dispositivo de carga acoplada, CMOS, o tomógrafos 3D, para llevar a cabo la obtención de imágenes *in vivo*.
10

El término "inducido", con respecto a un promotor, pretende englobar tanto el inicio de la transcripción de un ácido nucleico en la dirección 3', además de un aumento en la velocidad de transcripción de un ácido nucleico en la dirección 3' que ya está siendo transcrito, en comparación con un estado no inducido.

15 El término "endógeno", con referencia a un gen, indica que el gen es nativo para 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 no mutante presente en ese locus en una célula no mutante (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 que un gen no mutante. Un ejemplo de un gen endógeno modificado tal 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.
20

El término "biológicamente activo", con respecto a un gen o proteína, se refiere a un gen o proteína que tiene una actividad biológica. Las llamadas "inactivaciones" no son biológicamente activas. Si se denomina que un gen alterado o proteína es biológicamente activo, entonces tiene la misma actividad de una versión no alterada del gen o proteína. No puede observarse cambio significativo en el fenotipo en un animal que tiene gen alterado biológicamente activo con respecto a un gen no alterado.
25

El término "célula ES", como se usa en el presente documento, se refiere a células madre embrionarias pluripotentes y a tales células pluripotentes en las fases muy tempranas del desarrollo embrionario, que incluyen, pero no se limitan a, células en el estadio de desarrollo de blastocisto.
30

El término "construcción" se refiere a un ácido nucleico recombinante, generalmente ADN recombinante, que ha sido generado con el fin de la expresión de una secuencia(s) de nucleótidos específica(s), o va a usarse en la construcción de otras secuencias de nucleótidos recombinantes. Una construcción podría estar presente en un vector o en un genoma.
35

El término "recombinante" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que no se produce naturalmente en una célula hospedadora. Una molécula recombinante puede contener dos o más secuencias que existen de forma natural que se unen juntas en una forma que no se produce naturalmente. Una célula recombinante contiene un polinucleótido o polipéptido recombinante.
40

El término "marcador selectivo" se refiere a una proteína capaz de expresión en un hospedador que permite la facilidad de selección de aquellos hospedadores que contienen un ácido nucleico introducido o vector. Ejemplos de marcadores de selección incluyen, pero no se limitan a, proteínas que confieren resistencia a agentes antimicrobianos (por ejemplo, higromicina, bleomicina o cloranfenicol), proteínas que confieren una ventaja metabólica, tal como una ventaja nutricional a la célula hospedadora, además de proteínas que confieren una ventaja funcional o fenotípica (por ejemplo, división celular) en una célula.
45

El término "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso por el cual un polipéptido se produce basándose en la secuencia de ácidos nucleicos de un gen. El proceso incluye tanto la transcripción como la traducción.
50

El término "introducido", en el contexto de insertar una secuencia de ácidos nucleicos en una célula, significa "transfección" o "transformación" o "transducción" e incluye referencia a la incorporación de una secuencia de ácidos nucleicos en una célula eucariota o procariota en la que la secuencia de ácidos nucleicos puede incorporarse en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertirse en un replicón autónomo, o expresarse transitoriamente (por ejemplo, ARNm transfectado).
55

"Tratar" o "tratamiento" de una afección o enfermedad incluye proporcionar un beneficio clínico a un sujeto, e incluye: (1) prevenir al menos un síntoma de las afecciones, es decir, causar que un síntoma clínico no se desarrolle significativamente en un mamífero que puede exponerse a o tener predisposición a la enfermedad, pero todavía no experimenta o muestra síntomas de la enfermedad, (2) inhibir la enfermedad, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas, o (3) aliviar la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad o sus síntomas clínicos.
60
65

El término "agentes candidatos" significa oligonucleótidos, polinucleótidos, ARNip, genes de ARNhp, productos génicos, polipéptidos, moléculas pequeñas, por ejemplo, hasta 2500 Dalton (Da) de tamaño, y compuestos farmacológicos que se combinan con las células o los animales descritos en el presente documento para detectar su efecto sobre la atrofia muscular. En ciertos casos, un agente candidato puede administrarse como un ácido nucleico que se transcribe y/o traduce para proporcionar el agente candidato, por ejemplo, una molécula de iARN o un polipéptido.

El término "secuencia codificante" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que una vez transcrita y traducida produce una proteína, por ejemplo, *in vivo*, cuando se pone bajo el control de elementos reguladores apropiados. Una secuencia codificante como se usa en el presente documento puede tener un ORF continuo o podría tener un ORF interrumpido por la presencia de intrones o secuencias no codificantes. En esta realización, las secuencias no codificantes se cortan y empalman a partir del pre-ARNm para producir un ARNm maduro.

El término "secuencia codificante interrumpida" se refiere a una secuencia codificante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de interrupción que previene la producción de la proteína codificada por la secuencia codificante. Esta secuencia de ácidos nucleicos de interrupción no puede ser cortada y empalmada a partir del pre-ARNm. La escisión de esta secuencia de ácidos nucleicos de interrupción produce la producción de la proteína codificada por la secuencia codificante.

La expresión "célula muscular", como se usa en el presente documento, se refiere a células musculares de todos los tipos, tales como células de músculo maduras, que incluyen esquelético, liso y cardíaco, precursores de estas células musculares, cualquier célula intermedia que exista durante la diferenciación de una célula precursora de músculo, fibras musculares, líneas de células de músculo, etc. Ejemplos de células musculares incluyen mioblastos, miotubos, miocitos, células de músculo cardíaco, células de músculo esquelético, miofibras, etc. La célula muscular puede estar presente *in vivo* (en un animal) o *in vitro* (en un cultivo celular).

La expresión "enzima indicadora secretada" se refiere a una enzima que es secretada de la célula que la produce y que la enzima sirve de indicador porque es detectable por un ensayo de enzima de, por ejemplo, medio de cultivo celular, líquidos corporales, tales como, sangre, linfa, etc.

La expresión "secuencia de derivación traduccional" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido que proporciona separación de dos proteínas unidas por el péptido. Las secuencias de derivación traduccional se encuentran en una variedad de organismos, tales como virus. Las secuencias de derivación traduccional son útiles para generar proteínas separadas co-traduccionalmente, es decir, las secuencias de derivación traduccional codifican péptidos que proporcionan la producción de dos proteínas a partir de un único ARNm. Una secuencia de derivación traduccional se clona normalmente en marco entre dos ORF, que codifican dos proteínas o polipéptidos, formando un único ORF. Se han descrito secuencias de derivación traduccional en Trichas G. et al., BMC Biology, 6: 40, 2008; de Felipe P., Genet. Vaccines Ther. 2(1): 13, 2004; y El Amrani A. et al., Plant Physiol. 135(1):16-24, 2004, que se incorporan por referencia para la presente divulgación.

La expresión "gen atrógeno" se refiere a un gen cuya expresión se induce en células musculares de un roedor expuesto a un estímulo inductor de atrofia (por ejemplo, ayunas, etc.) antes de que sea observable un fenotipo de atrofia muscular detectable, es decir, una pérdida de masa muscular detectable, resecaimiento de células, etc.

La expresión "promotor atrógeno" se refiere a un promotor que se induce en células musculares de un roedor expuesto a un estímulo inductor de atrofia (por ejemplo, ayunas, etc.) antes de que sea observable un fenotipo de atrofia muscular detectable, es decir, una pérdida de masa muscular detectable, resecaimiento de células, etc. Un promotor atrógeno puede ser el promotor de un gen atrógeno no mutante, o una variante activa del mismo. Es decir, por ejemplo, al menos el 95 % idéntico a un promotor atrógeno no mutante.

Los términos "atrofia de células musculares", "atrofia muscular" y "atrofia" se usan indistintamente para referirse a la atrofia de células musculares *in vitro* o *in vivo*. La atrofia de células musculares, *in vivo*, se refiere a una disminución en la masa de un músculo, tamaño de fibra, área en sección transversal, etc. Una disminución en la masa del músculo va normalmente acompañada de un debilitamiento de los músculos. La atrofia de células musculares, *in vitro*, se refiere a resecaimiento de células musculares, muerte de células musculares, etc. Los términos "atrofia de células musculares", "atrofia muscular" y "atrofia" se usan para referirse a la atrofia producida por una variedad de estímulos, a menos que se establezca de otro modo. Así, la atrofia muscular se refiere a la atrofia debida a ayunas, caquexia, diabetes, etc.

Descripción de realizaciones a modo de ejemplo

Antes de que se describa adicionalmente el presente objeto de la invención, debe entenderse que la presente invención no se limita a realizaciones particulares descritas, ya que tales pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solo, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se limitará solo por las reivindicaciones adjuntas.

Donde se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, al décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, está englobado dentro de la invención.

5 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen los métodos preferidos y materiales. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento son para desvelar y describir los métodos y/o materiales a propósito de los cuales se citan las publicaciones.

15 Debe observarse que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes en plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a "una célula" incluye una pluralidad de células y referencia a "un agente candidato" incluye referencia a uno o más agentes candidatos y equivalentes de los mismos conocidos para aquellos expertos en la materia, etc. Se indica además que las reivindicaciones pueden ser redactadas para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir de base de antecedentes para el uso de tal terminología exclusiva como "únicamente", "solo" y similares a propósito de la cita de los elementos de reivindicación, o uso de una limitación "negativa".

25 Las publicaciones tratadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteceder a tal publicación en virtud de la invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las actuales fechas de publicación que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

30 Todas las publicaciones y patentes citadas en esta memoria descriptiva son para desvelar y describir los métodos y/o materiales a propósito de los que se citan las publicaciones. La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteceder a la tal publicación en virtud de la invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las actuales fechas de publicación que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

35 Como será evidente para aquellos expertos en la materia tras la lectura de la presente divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en el presente documento tienen componentes discretos y características que puede ser fácilmente separadas de o combinadas con las características de cualquiera de las otras varias realizaciones. Cualquier método citado puede llevarse a cabo en el orden de acontecimientos citado o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

40 **Modelo animal para atrofia de células musculares**

45 Como se observa anteriormente, se proporciona un modelo animal no humano para atrofia de células musculares que comprende un genoma nuclear que comprende un gen atrógeno biológicamente activo en enlace operativo con una construcción indicadora que comprende: i. una primera secuencia codificante de una proteína detectable fluorescente o luminiscente; y ii. una segunda secuencia codificante de una enzima indicadora secretada. El gen atrógeno, la proteína ópticamente detectable y la enzima indicadora secretada se co-expresan y así el inicio de la atrofia de células musculares produce la producción de la enzima indicadora secretada y la proteína detectable por la célula.

50 En ciertas realizaciones, el animal puede contener una célula que comprende un gen indicador bifuncional cuya expresión cambia tras el inicio de la atrofia de células musculares. En ciertos casos, la construcción indicadora comprende un promotor atrógeno, por ejemplo, el promotor de un gen atrógeno, que está operativamente unido a una primera secuencia codificante para la primera proteína ópticamente detectable y una segunda secuencia codificante de una enzima indicadora secretada. La construcción indicadora puede integrarse en el genoma de la célula en un sitio específico o mediante un evento de integración aleatorio. En ciertos casos y como se describirá en mayor detalle más adelante, el promotor de la construcción indicadora puede ser un promotor endógeno de la célula hospedadora, en cuyo caso la célula puede producirse integrando un ácido nucleico que contiene un IRES en la UTR 3' de un gen atrógeno o modificando un gen atrógeno de manera que codifique una proteína funcional y un indicador funcional dual separado por una derivación traduccional que es endógena o no endógena a la célula. En otras realizaciones, la construcción indicadora, que incluye el promotor y secuencias codificantes, puede producirse por métodos recombinantes fuera de la célula e introducirse en la célula. En estas realizaciones, la célula resultante puede tener dos copias de un promotor atrógeno (un promotor atrógeno endógeno que es parte de un gen atrógeno endógeno no alterado y un segundo promotor atrógeno que está operativamente unido a los indicadores. Como se observa anteriormente y en realizaciones particulares, la construcción indicadora contiene un IRES y está presente en la UTR 3' de un gen atrógeno.

En la realización mostrada en las Fig. 7 y 8, se describen configuraciones de inactivación a modo de ejemplo. En estas configuraciones, se inserta un casete indicador en el extremo 5' de la secuencia codificante de un gen atrógeno endógeno (por ejemplo, MurRF1 (Fig. 7) o atrogina-1 (Fig. 8) para producir una fusión en la que la secuencia codificante del gen atrógeno está fusionado, en marco, con un indicador bifuncional, y las secuencias codificantes del gen atrógeno, el indicador ópticamente detectable (luciferasa) y la enzima indicadora secretada (SEAP) se separan por una derivación traduccional. En esta realización, la inducción del gen atrógeno produce un único transcrito, y las tres proteínas (una proteína atrógena biológicamente activa que contiene una secuencia de derivación traduccional en su extremo C, la proteína ópticamente detectable que contiene una secuencia de derivación traduccional en su extremo C y la enzima indicadora secretada) se traducen de la misma. La expresión de todos los productos está conducida por el promotor de gen atrógeno.

En la realización mostrada en la Fig. 9, por ejemplo, se describe una configuración transgénica en la que un BAC (de la misma especie que el animal en el que va a introducirse BAC) que contiene una construcción indicadora de IRES se inserta en la UTR 3' del gen atrógeno seleccionado (en este caso, MuRF1), se construye primero en *E. coli*. Una vez construido, el BAC se transfiere a un animal para producir un animal transgénico. En estas realizaciones transgénicas, el BAC puede integrarse en el genoma del animal tanto para sustituir el gen atrógeno endógeno en un locus diferente con el gen atrógeno. Como se muestra en la Fig. 9, la UTR 3' del gen atrógeno contiene un casete indicador que emplea un IRES. En esta realización, la inducción del gen atrógeno produce un único transcrito, y las tres proteínas (una proteína atrógena biológicamente activa, la proteína ópticamente detectable que contiene una secuencia de derivación traduccional en su extremo C y la enzima indicadora secretada) se traducen de la misma.

Las proteínas indicadoras están operativamente unidas al promotor atrógeno y así la expresión de la proteína indicadora proporciona una lectura de la expresión del gen atrógeno. En algunas realizaciones, la expresión de la enzima indicadora secretada puede determinarse monitorizando la sangre del animal o el medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la proteína ópticamente detectable puede monitorizarse por obtención de imágenes *in vivo* o por microscopía de fluorescencia. El modelo animal proporciona métodos no invasivos para monitorizar el inicio y/o progresión de la atrofia de células musculares. En algunas realizaciones, el cambio en la expresión de la proteína indicadora es observable incluso antes de que sean evidentes cambios significativos en la masa muscular o en toda la morfología celular. Así, el modelo animal y la célula proporcionados en el presente documento pueden usarse para monitorizar la fase inicial de la atrofia de células musculares antes de que sea observable un fenotipo. El modelo animal y la célula se describen más abajo en más detalle.

El promotor atrógeno de la construcción puede tener una secuencia de nucleótidos no mutante (es decir, puede tener una secuencia de nucleótidos que es idéntica al promotor de un gen atrógeno no mutante) o puede tener un promotor que tiene una secuencia de nucleótidos que es al menos el 90 % idéntica (por ejemplo, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica) a un promotor no mutante. Dada la disponibilidad pública de las secuencias de nucleótidos de genes atrógenos de muchas especies de mamífero diferentes, tales variantes son fácilmente designables.

Algunos de los principios generales del modelo animal objeto, por ejemplo, los promotores, indicadores, genes atrógenos, secuencias de derivación, secuencias opcionales, secuencias codificantes de recombinasa, etc., se describen más adelante en el contexto de un llamado animal "activado". Como sería fácilmente evidente, aquellos principios son fácilmente aplicables a un animal que no es un animal activado, es decir, un animal transgénico comprende un genoma que comprende una construcción indicadora que contiene un promotor atrógeno operativamente unido a una primera secuencia codificante de una enzima indicadora secretada y una segunda secuencia codificante de una proteína ópticamente detectable, donde la construcción indicadora, que incluye el promotor, se introdujo en la célula y se integra en la célula en un sitio aleatorio o predeterminado que es diferente al locus del gen atrógeno endógeno. La Fig. 1A ilustra una realización de la región genómica de una célula proporcionada en el presente documento. Con referencia a la Fig. 1A, esta célula comprende un gen atrógeno que comprende un promotor atrógeno, secuencias codificantes de la proteína atrógena y una región UTR 3'. Una construcción indicadora puede estar presente en UTR 3' del gen atrógeno en algunas realizaciones. En otras realizaciones, la construcción indicadora puede estar presente en el extremo 3' de la secuencia codificante del gen atrógeno.

La construcción indicadora comprende una primera secuencia codificante de una primera proteína detectable y una segunda secuencia codificante de una enzima indicadora secretada. En ciertas realizaciones, la construcción indicadora está operativamente unida al promotor del gen atrógeno en virtud de su localización en UTR 3' del gen atrógeno. En otras realizaciones, el promotor atrógeno puede estar directamente unido a la secuencia codificante de los indicadores. En otras realizaciones, el promotor atrógeno puede estar operativamente unido a la secuencia codificante de las proteínas indicadoras por medio de una secuencia de derivación traduccional en el extremo 3' de la secuencia codificante del gen atrógeno. Por consiguiente, la activación del promotor atrógeno produce la producción de la proteína codificada por el gen atrógeno, además de la enzima indicadora secretada y la primera proteína ópticamente detectable. La construcción indicadora puede contener además secuencias de ácidos nucleicos, tales como secuencias que pueden aumentar la producción de la enzima indicadora secretada y la primera proteína ópticamente detectable. Un ejemplo de una secuencia tal es una secuencia de IRES que proporciona la traducción de secuencia(s) codificante(s) operativamente unida(s) a la secuencia de IRES. El inicio de

la atrofia de células musculares puede producir la inducción del promotor atrógeno que conduce a la expresión del gen atrógeno operativamente unido al promotor, además de las proteínas codificadas por las secuencias codificantes de la construcción indicadora. Así, el inicio de la atrofia de células musculares puede monitorizarse midiendo la actividad de la enzima indicadora secretada, por ejemplo, en líquidos corporales, tales como sangre, y/o por la expresión de la primera proteína ópticamente detectable en células musculares. En algunas realizaciones, el modelo animal y la célula descritos en el presente documento pueden usarse para monitorizar el inicio de la atrofia de células musculares. En algunas realizaciones, el modelo animal y la célula descritos en el presente documento pueden usarse para monitorizar la progresión de la atrofia de células musculares.

En ciertas realizaciones, la construcción indicadora comprende además una tercera secuencia codificante. La tercera secuencia codificante puede codificar una segunda proteína ópticamente detectable, por ejemplo. La segunda proteína ópticamente detectable puede proporcionar una forma adicional de monitorizar el inicio y/o la progresión de la atrofia de células musculares. Un esquema de un ejemplo de esta realización se proporciona en la Fig. 4. La tercera secuencia codificante también está operativamente unida al promotor atrógeno, de forma que la activación del promotor atrógeno produzca la producción de la proteína codificada por la tercera secuencia codificante.

En otras realizaciones, la tercera secuencia codificante puede codificar una recombinasa específica de sitio. Un ejemplo de esta realización se ilustra esquemáticamente en la Fig. 1B. El inicio de la atrofia muscular produce la producción de recombinasa específica de sitio. Numerosas recombinasas específicas de sitio, tales como recombinasas CRE, son conocidas para un experto en la materia. Con referencia a la Fig. 1B, la célula puede comprender además una secuencia codificante interrumpida de una segunda proteína ópticamente detectable operativamente unida a un promotor constitutivamente activo, tal como un promotor de CMV. La secuencia codificante interrumpida comprende una secuencia de interrupción flanqueada por sitios de direccionamiento de recombinasa específica de sitio. Como consecuencia de la presencia de la secuencia de interrupción, en este caso, el codón de terminación/STOP, la secuencia codificante interrumpida no codifica la segunda proteína ópticamente detectable. La activación del promotor atrógeno conduce a la producción de recombinasa específica de sitio, que delecta la secuencia de interrupción. Así, las células en las que la atrofia de células musculares se inicia llegan a marcarse por la expresión de la segunda proteína ópticamente detectable. Como esta segunda proteína ópticamente detectable se expresa de un promotor constitutivamente activo, las células musculares que experimentan atrofia llegan a marcarse permanentemente por la expresión de esta proteína.

En algunas realizaciones, las secuencias codificantes presentes en la construcción indicadora se separan por secuencias que proporcionan la separación de las proteínas codificadas por las secuencias codificantes. Por ejemplo, cuando las secuencias codificantes forman un único ORF, puede estar presente una secuencia de derivación traduccional o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un sitio de escisión de proteasa, en marco, en el extremo de la primera secuencia codificante y el principio de la siguiente secuencia codificante. La traducción de este ORF único produciría la producción de una poliproteína, es decir, en este ejemplo, dos proteínas unidas por un sitio de escisión de proteasa. Estas dos proteínas se separarían por escisión por una proteasa compatible. En realizaciones donde una secuencia de derivación traduccional está presente entre las dos secuencias codificantes, se producirían proteínas separadas durante la traducción.

En una realización donde una secuencia de derivación traduccional está presente entre la primera y segunda secuencia, la primera secuencia codificante puede unirse a, por ejemplo, una secuencia de IRES u otra secuencia de derivación traduccional. En una realización alternativa, cada una de la secuencia codificante puede estar operativamente unida a, por ejemplo, una secuencia de IRES.

La construcción indicadora introducida en la célula por cualquier método conocido, por ejemplo, por transfección por un vector viral, por ejemplo, un vector lentiviral o retroviral. En ciertos casos, la construcción puede insertarse en el gen atrógeno mediante recombinación homóloga. En ciertos casos, la presencia de la construcción indicadora no rompe la capacidad de la célula a la atrofia en respuesta a un estímulo inductor de atrofia. En ciertas realizaciones, la construcción indicadora en el gen atrógeno no afecta la expresión y/o estabilidad de la proteína codificada por el gen atrógeno. En algunos casos, una célula no modificada y una célula en la que una construcción indicadora está presente el gen atrógeno puede ser sustancialmente similar en términos de niveles de expresión de la proteína codificada por el gen atrógeno y/o en términos de su respuesta a condiciones que estimulan la atrofia muscular. En ejemplos particulares, un animal transgénico que comprende la célula objeto, descrita anteriormente, puede ser indistinguible de un animal no mutante en términos de la expresión de la proteína codificada por el gen atrógeno y en términos de su fenotipo de atrofia muscular. En ciertos casos, la construcción indicadora puede retener opcionalmente la secuencia codificante del marcador de selección usado para el direccionamiento de la construcción indicadora al gen atrógeno.

Genes atrógenos útiles en ciertas realizaciones desveladas en el presente documento incluyen genes que se expresan tras el inicio de la atrofia muscular antes de un fenotipo inducido por atrofia detectable. En algunas realizaciones, los genes atrógenos son genes que se expresan tras el inicio de la atrofia muscular inducida mediante una variedad de estímulos, que incluyen, pero no se limitan a, ayunas, caquexia en cáncer, diabetes, exposición a glucocorticoides, insuficiencia renal, etc. Así, en algunas realizaciones, el gen atrógeno es un gen atrógeno universal

ya que es común a la atrofia muscular inducida mediante una variedad de estímulos diferentes. En ciertos ejemplos, el gen atrógeno es específico para la atrofia muscular inducida por un estímulo particular, por ejemplo, el gen atrógeno se expresa solo en atrofia muscular producida por ayunas pero no en atrofia muscular producida por cáncer, enfermedad renal, etc.

5 En ciertos casos, la expresión del gen atrógeno se induce al principio del programa de atrofia muscular, antes de la proteólisis de músculo dependiente de la ubiquitina-proteosoma, que puede evaluarse evaluando la morfología celular, masa muscular, área en sección transversal de fibra, contenido de proteína o expresión génica, etc. En ciertos casos, un gen atrógeno puede caracterizarse por tener una proteína codificada o ARNm que: a) se induce al menos 6 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 30 horas, o más, antes de que un fenotipo de atrofia muscular, tal como pérdida de peso muscular, resecamiento de células musculares, disminución en el tamaño de fibra, etc., sea detectable en un roedor, b) se induce al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, o más, en comparación con un control que no se expone a condiciones de estimulador de atrofia, c) se induce mediante atrofia, y d) contribuye a la atrofia de células musculares, etc. Genes a modo de ejemplo que no son considerados genes atrógenos son genes que se inducen como máximo 2 veces, o como máximo 3 veces, o como máximo 4 veces, o menos, durante la atrofia muscular. Por ejemplo, en ciertos casos, un gen que codifica poliubiquitina que se induce 2-4 veces, o un gen que codifica E2_{14k} que se induce 2-3 veces, durante la atrofia muscular, puede no considerarse un gen atrógeno

20 En ciertas realizaciones, el gen atrógeno puede codificar una ubiquitina ligasa E3. En realizaciones particulares, el gen atrógeno puede ser la atrogina-1 de Ub ligasa (E3), también llamada caja F de atrofia muscular (MAFbx). En ciertas realizaciones, el gen atrógeno puede ser 1 de dedo RING muscular (MuRF1), que también es una ligasa E3. MAFbx y MuRF1 se identificaron como marcadores/mediadores universales de atrofia muscular ya que la expresión de estos genes se reguló por incremento en una variedad de modelos animales de atrofia muscular y animales que carecen de un gen MAFbx o MuRF1 funcional fueron resistentes a la atrofia muscular inducida por denervación (Bodina S.C. et al., Science 294, 1704-1708, 2001, Gomes M.D. et al., Proc. Natl. Acad. Si. USA 98, 14440-14445, 2001). Estos genes se regulan pronto por incremento durante el proceso de atrofia y al menos en el modelo animal de atrofia inducida en ayunas, el aumento en MAFbx precede a la pérdida de peso muscular.

30 En ciertas realizaciones, el gen atrógeno puede ser metalotioneína-1L, metalotioneína-1B o FoxO1. Estos genes, además de desempeñar una función en iniciar la atrofia de células musculares, también pueden desempeñar una función en el mantenimiento de músculo en un estado atrofizado. Estos genes se describen en, por ejemplo, Sacheck J.M. et al., FASEB J., 21, 140-155, 2007. En ciertos aspectos, el gen atrógeno puede ser lipina, factor de interacción de TG o AMP desaminasa. Estos genes se regulan por incremento al inicio del programa de atrofia de células musculares.

35 Estos y otros genes atrógenos han sido descritos en varias publicaciones de investigación y revisiones, por ejemplo, en Sacheck J.M. et al., FASEB J., 21, 140-155, 2007; Lecker S.H. et al. FASEB J., 18, 39-51, 2004; Jagoe R.T. et al. FASEB J. 16, 1697-1712, 2002, Gomes M.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 14440-14445, 2001; Bodina S.C. et al., Science 294, 1704-1708, 2001, etc.

45 Genes atrógenos adicionales pueden identificarse por métodos muy conocidos para un experto en la materia. Por ejemplo, pueden usarse micromatrices de ADNc para comparar cambios en la expresión de ARNm específicos en músculos que se atrofian de diferentes causas para identificar genes cuya expresión cambia en músculo que se atrofia de causas diferentes, además de para identificar genes cuya expresión cambia solo en músculo que se atrofia de una causa particular. Con el fin de identificar genes atrógenos cuyo cambio de expresión precede a la atrofia de células musculares, puede recogerse ARNm de células musculares relativamente pronto después de inducir la atrofia muscular, tal como en el plazo de 12 h, 24 h, 48 h, 60 h, 72 h. Alternativamente, el tiempo óptimo para recoger ARNm puede determinarse empíricamente, por ejemplo, determinando cuando un fenotipo de atrofia de células musculares, tal como disminución en la masa muscular, tamaño de fibra, área en sección transversal de la fibra, llega a ser evidente. Se conocen diversas formas de inducir atrofia muscular, además de diversos modelos de atrofia muscular y se describen en más detalle en las secciones posteriores.

55 En algunas realizaciones, la construcción indicadora puede estar presente en dos genes atrógenos endógenos, donde ambos genes atrógenos están regulados por incremento tras el inicio de la atrofia de células musculares. En ciertas otras realizaciones, dos o más copias de una construcción indicadora pueden estar presentes en la región UTR 3' de un gen atrógeno. En ciertos aspectos, una construcción indicadora puede estar presente en la UTR 5' de un gen atrógeno. En ciertas realizaciones, un gen atrógeno puede ser un gen atrógeno no mutante o que existe de forma natural. En ciertas realizaciones, el gen atrógeno puede modificarse, por ejemplo, por una mutación, tal como sustitución, delección, adición de uno o más nucleótidos. Las secuencias de estos genes, que incluye las UTR 3', están disponibles en varias bases de datos públicas tales como NCBI, base de datos del genoma de rata, Ensembl, etc. En casos donde la UTR 3' de un gen atrógeno no se ha caracterizado, un experto en la materia conoce numerosos métodos de identificación de la UTR 3' de un gen, por ejemplo, por secuenciación de producto de RT-PCR de ARNm de un gen atrógeno.

65

En ciertos casos, la construcción indicadora se inserta en el gen atrógeno de forma que la construcción indicadora esté operativamente unida al promotor atrógeno. En ciertas realizaciones, la construcción indicadora también puede incluir un IRES o alguna forma de reinicio traduccional que permitiría la traducción de una región de ARN mensajero (ARNm) tras un codón STOP. En ciertas otras realizaciones, la construcción indicadora puede insertarse en marco con el ORF del gen atrógeno, por ejemplo, delecionando el codón STOP del gen atrógeno. En este caso, no se requiere una secuencia que proporcionaría traducción independiente de la terminación de 5' debido a que el ARNm tendría un único marco de lectura abierto que codificaría una poliproteína. En un caso tal, la inclusión de un sitio de escisión de proteasa o una secuencia de derivación traduccional entre el codón que codifica el último aminoácido de la proteína atrógena y el codón que codifica el primer aminoácido de la enzima indicadora secretada proporciona separación de la proteína atrógena de enzima indicadora secretada. En ciertas realizaciones, cada una de las secuencias codificantes presentes en la construcción indicadora termina en un codón STOP. En este caso, puede incluirse una secuencia de IRES entre cada secuencia codificante para proporcionar la iniciación traduccional.

Como se observa anteriormente, en algunos casos, una construcción indicadora puede comprender una secuencia de derivación traduccional presente entre dos secuencias codificantes. Las secuencias de derivación traduccional son muy conocidas en la técnica y se tratan en varias referencias, por ejemplo, Trichas G. et al., BMC Biology, 6: 40, 2008, de Felipe P., Genet. Vaccines Ther. 2(1): 13, 2004, El Amrani A. et al., Plant Physiol. 135(1):16-24, 2004, etc. Las secuencias de derivación traduccional proporcionan una forma de separación de varias proteínas codificadas a partir de un único ARNm, por ejemplo, en una construcción policistónica. Secuencias de derivación traduccional tales como aquellas que codifican péptidos 2A producen la "escisión" co-traduccional de proteínas. Se ha demostrado que las secuencias de derivación traduccional funcionan en varias células eucariotas, además de en mamíferos transgénicos. Un ejemplo de secuencias de derivación traduccional se proporciona en la Fig. 3.

En algunas realizaciones, la construcción indicadora puede comprender una primera secuencia codificante de una primera proteína ópticamente detectable y una segunda secuencia codificante de una enzima indicadora secretada. Pueden usarse varias enzimas indicadoras secretadas, tales como fosfatasa alcalina secretada (SEAP). Puede usarse una enzima que puede modificarse, por ejemplo, mediante la adición de un péptido señal de secreción y ensayarse por un ensayo fiable. Se ha usado ampliamente SEAP para medir la actividad de promotor/potenciador y se ha usado como indicador *in vivo*, véase, por ejemplo, Gene 66, 1-10, 1988, Mets. Enzymol. 216, 362-368, 1992, Nilsson E.E., et al., Cancer Chemother. Pharmacol., 49: 93-100, 2002, Westfall S.D. y Skinner M.K., Mol Cancer Ther 2005, 4(11), etc. Están disponibles kits e instrucciones para medir SEAP, por ejemplo, de Applied Biosystems, Clontech, etc.

En la invención, la primera proteína ópticamente detectable es una proteína fluorescente o una luciferasa. En algunos casos, la construcción indicadora puede comprender además una tercera secuencia codificante de una segunda proteína ópticamente detectable, en la que el inicio de la atrofia muscular produce la producción de la proteína. En esta realización, puede usarse cualquier combinación de primera y segunda proteína ópticamente detectable, a condición de que las dos proteínas sean ópticamente distinguibles. Así, por ejemplo, la primera proteína ópticamente detectable puede ser una primera proteína fluorescente y la segunda proteína ópticamente detectable puede ser una segunda proteína fluorescente que es ópticamente distinguible de la primera proteína fluorescente, por ejemplo, proteína verde fluorescente y proteína roja fluorescente. En otras realizaciones, la primera proteína ópticamente detectable puede ser una proteína fluorescente y la segunda proteína ópticamente detectable puede ser una luciferasa, o viceversa, donde la señal óptica producida por la actividad de luciferasa es distinguible de la señal óptica producida por la proteína fluorescente, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y proteína roja fluorescente. En realizaciones alternativas, la primera y la segunda proteínas ópticamente detectables pueden ser luciferasas que son ópticamente distinguibles, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa de escarabajo click. Ejemplos no limitantes de proteínas fluorescentes incluyen mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, mOrange, proteína amarilla fluorescente, proteína verde fluorescente, proteína roja fluorescente, mCitrine, Venus e YPet, proteína cian fluorescente, T-sapphire, Katusha, DsRed-Express, proteína fluorescente en el rojo lejano FP635, etc.

La luciferasa usada en la presente divulgación puede derivarse de renilla (acceso de proteína N.º CAA01908), luciérnaga (acceso de proteína N.º CAA59282), escarabajo click (acceso de proteína N.º AAQ19142), luciferasa de G. princeps (GLUC), u otras fuentes de luciferasa. La luciferasa usada en la presente divulgación cubre versiones mutadas y modificadas de otro modo tales como luciferasas de codón optimizado de mamífero. Se han descrito métodos de uso de luciferasas para la obtención de imágenes en tiempo real de la expresión de luciferasa en animales vivos (L. F. Greer, et al., Luminiscence 17: 43-74, 2002). Se ha usado luciferasa, de diversas fuentes, en diversos ensayos y capacidades de elaboración de informes. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 6.387.675 desvela el uso del gen de luciferasa de escarabajo click, *P. plagiophthalmus*, en células eucariotas para biodetección.

En algunas realizaciones, la construcción indicadora puede insertarse en un genoma, por ejemplo, el gen atrógeno endógeno mediante recombinación homóloga. Métodos para llevar a cabo la recombinación homóloga son muy conocidos en la técnica. En tales métodos, se construye un vector de direccionamiento y se introduce en una célula de interés. El vector normalmente contiene un casete de inserción de una secuencia de ácidos nucleicos exógena que va a insertarse en el genoma y un marcador de selección positivo. Este casete de inserción está flanqueado por regiones de homología para el gen diana. El vector también tiene un marcador de selección negativo, localizado

fuera de las regiones de homología. Las regiones de homología son secuencias genéticas complementarias a sitios específicos sobre el genoma donde se desea el direccionamiento. El vector se hibrida con ADN genómico en estas regiones de homología, y en un pequeño porcentaje de células hay una recombinación de entrecruzamiento doble entre el ADN genómico y el vector. Un entrecruzamiento intercambia información genética dentro de las regiones de homología, sustituyendo el casete de inserción para la región genómica diana. Esta tecnología se aprovecha del proceso de recombinación para intercambiar la secuencia endógena por la exógena. La construcción puede integrarse en el genoma de la célula usando cualquier método. En ciertas realizaciones, pueden emplearse nucleasas de dedos de cinc, como se describe en Geurts et al (Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*. 2009 325:433); Durai et al (Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2005 33:5978-90) y Porteus et al. (Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol*. 2005 23:967-73).

La célula objeto, descrita anteriormente, puede ser una célula ES, un mioblasto, un miotubo, fibra muscular, etc. Se conocen en la técnica varias líneas celulares, además de métodos de introducción de ácido nucleico en células. Las células madre pueden obtenerse de cualquier especie de mamífero, por ejemplo ser humano. En realizaciones a modo de ejemplo, puede usarse una línea de células de músculo, tal como SM3, Aza2, BC3H-1, BD1, BD2, BD10, C2C12, TD33, TD38, TD45, TG1, C2, HL-1, AT-1, etc.

Una célula objeto puede cultivarse *in vitro*, bajo condiciones de cultivo apropiadas. En algunas realizaciones, la célula puede cultivarse *in vivo*, por ejemplo en un órgano particular, tejido en un animal. En ciertas realizaciones, la célula puede cultivarse *ex vivo*, por ejemplo en un órgano particular, tejido de un animal. En otras realizaciones, la célula puede implantarse en una región particular de un animal, por ejemplo, en un músculo esquelético, produciendo un animal transgénico que comprende células que comprenden una construcción indicadora objeto que puede, en ciertas realizaciones, estar presente en gen atrógeno.

El modelo animal puede ser de mamífero, tal como, equino, bovino, porcino, canino, felino, roedor, etc. En algunas realizaciones, el mamífero es un murino, por ejemplo, un ratón o rata.

En algunas realizaciones, el modelo animal puede generarse de una célula ES. En esta realización, todas las células del animal pueden tener la construcción indicadora. Para células madre embrionarias (ES), puede emplearse una línea de células ES, o pueden obtenerse células embrionarias recientes de un hospedador, por ejemplo, ratón, rata, cobaya, etc. Tales células se cultivan en una capa nodriza de fibroblastos apropiada o se cultivan en presencia de factores de crecimiento apropiados, tales como factor inhibidor de leucemia (LIF). Cuando se han transformado las células ES, pueden usarse para producir animales de genes dirigidos. Véanse las patentes de EE.UU. 5.387.742; 4.736.866; y 5.565.186; y Larson et al. (2000) *Mol. Ther.* 2:631-639 para métodos de preparación de animales de genes dirigidos. Después de la transformación, las células se siembran en placa sobre una capa nodriza en un medio apropiado. Las células que contienen la construcción indicadora pueden detectarse empleando un medio selectivo. Después de tiempo suficiente para que las colonias crezcan, se recogen y analizan para la aparición de recombinación homóloga de la construcción. Aquellas colonias que son positivas pueden entonces usarse para la manipulación de embriones y la inyección de blastocistos. Los blastocistos se obtienen de hembras superovuladas de 4 a 6 semanas de edad. Las células ES se tripsinan, y las células modificadas se inyectan en el blastocelo del blastocisto. Después de la inyección, los blastocistos se devuelven a cada trompa de Falopio de hembras pseudopreñadas. Entonces se deja que las hembras lleguen a término y las camadas resultantes se criban para células que tienen la construcción. Proporcionando un fenotipo diferente del blastocisto y las células ES, puede detectarse fácilmente progenie quimérica. La progenie quimérica se cría adicionalmente para identificar aquella que tiene células de la línea germinal que tienen la construcción. Los animales que tienen una alteración heterocigótica se generan criando las quimeras. Normalmente se crían heterocigotos macho y hembra para generar animales homocigóticos.

En algunas realizaciones, el modelo animal se genera implantando una célula objeto en un animal. En este caso, el modelo animal es un animal transgénico que comprende células que comprenden la construcción indicadora. La célula puede ser una célula ES, un miotubo, un mioblasto, etc. La célula puede implantarse a cualquiera de los músculos de animal que incluyen, pero no se limitan a, músculo cardíaco, músculo esquelético, etc.

La atrofia de células musculares puede iniciarse por varios estímulos que incluyen, pero no se limitan a, ayunas, envejecimiento, diabetes, cáncer avanzado, insuficiencia renal, septicemia, caquexia, artritis, osteoporosis, diabetes, denervación, inmovilización, descarga muscular, lesión de médula espinal, tratamiento de glucocorticoides, y similares. *In vitro*, la atrofia de células musculares puede iniciarse por hambruna, exposición de células a, por ejemplo, glucocorticoides, o a virus.

Métodos de cribado

Se proporciona un método que usa el modelo animal descrito anteriormente para identificar agentes que modulan el inicio de la atrofia de células musculares. En realizaciones a modo de ejemplo, el método implica poner en contacto un sujeto animal, descrito anteriormente, con un agente candidato, y determinar el efecto, si lo hay, del agente candidato sobre la producción de las proteínas codificadas por la construcción indicadora. En algunas realizaciones,

el método implica poner en contacto un modelo animal de la atrofia de células musculares, que comprende la célula, con un agente candidato, y determinar el efecto, si lo hay, del agente candidato sobre la atrofia de células musculares en el animal.

5 El término "agente", como se usa en el presente documento, describe cualquier molécula, por ejemplo producto farmacéutico orgánico o inorgánico de proteína o no de proteína. Agentes de interés particular son aquellos que inhiben el inicio de la atrofia de células musculares. Se realiza una pluralidad de ensayos en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Una de estas concentraciones puede servir de control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

10 Los términos "agente candidato", "agente de prueba", "agente", "sustancia" y "compuesto" se usan indistintamente en el presente documento. Agentes candidatos engloban numerosas clases químicas, normalmente moléculas inorgánicas u orgánicas sintéticas, semi-sintéticas, o que existen de forma natural. Los agentes candidatos incluyen aquellos encontrados en las bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están comercialmente disponibles bibliotecas de compuestos sintéticos de Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, RU), ComGenex (South San Francisco, CA) y MicroSource (New Milford, CT). Alternativamente, están disponibles bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, de planta y animal de Pan Labs (Bothell, WA) o son fácilmente producibles.

15 Los agentes candidatos pueden ser compuestos orgánicos o inorgánicos pequeños que tienen un peso molecular superior a 50 e inferior a aproximadamente 2.500 Da. Los agentes candidatos pueden comprender grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlace de 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 de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes candidatos también se encuentran entre las biomoléculas que incluyen péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

20 Los agentes candidatos se obtienen de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, que incluyen expresión de oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, están disponibles bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, de planta y animal, o se producen fácilmente. Adicionalmente, bibliotecas naturales o sintéticamente producidas y compuestos se modifican fácilmente mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Pueden someterse agentes farmacológicos conocidos a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc., para producir análogos estructurales. También pueden crearse nuevos agentes terapéuticos posibles usando métodos tales como diseño de fármacos racional o modelado informático.

30 El cribado puede dirigirse a compuestos farmacológicamente activos y análogos químicos de los mismos, o a nuevos agentes con propiedades desconocidas tales como aquellos creados mediante diseño de fármacos racional.

35 Agentes que modulan el inicio de la atrofia de células musculares pueden disminuir la expresión de la enzima indicadora secretada y la primera proteína ópticamente detectable al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, o al menos el 90 %, o más, con respecto a controles que no se han expuesto al agente.

40 Agentes que modulan el inicio de la atrofia de células musculares pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias y/o dirigidas, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc., para producir análogos estructurales. Tales análogos estructurales incluyen aquellos que aumentan la biodisponibilidad, y/o citotoxicidad reducida. Aquellos expertos en la materia pueden prever y generar fácilmente una amplia variedad de análogos estructurales, y probarlos para propiedades deseadas tales como elevada biodisponibilidad y/o reducida citotoxicidad, etc.

45 Ensayos de cribado *in vivo*

50 Se proporciona un ensayo de cribado *in vivo*. En ciertas realizaciones, el ensayo comprende identificar agentes que alteran la producción de las proteínas indicadoras codificadas por la construcción indicadora presente, usando un modelo animal que comprende una célula que comprende la construcción indicadora. El método generalmente implica poner en contacto el modelo animal con un agente candidato, y determinar el efecto del agente sobre la producción de las proteínas indicadoras en comparación con la producción de las proteínas indicadoras en un animal de control no tratado con el agente.

55 El modelo animal para la atrofia de células musculares puede someterse a estímulos inductores de la atrofia antes o después de poner en contacto el animal con un agente candidato. En ciertas realizaciones, el modelo animal para la

atrofia de células musculares puede someterse a estímulos inductores de la atrofia y ponerse en contacto con un agente candidato simultáneamente.

5 Pueden usarse varias condiciones conocidas para inducir la atrofia como estímulos inductores de la atrofia, que incluyen, pero no se limitan a, administración de glucocorticoides, hambruna, insuficiencia cardíaca, denervación, inmovilización, septicemia, hepatoma de implantación, diabetes mellitus inducida por estreptozotocina, nefrectomía, etc.

10 El animal se pone en contacto con el agente candidato, por ejemplo, el agente se administra al animal por cualquier vía de administración aceptable, que incluye, pero no se limita a, oral (por ejemplo, sonda nasogástrica oral), intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutánea, intragástrica, etc., por ejemplo, cualquier vía enteral o parenteral. Se administra una dosis única, o se administran dosis múltiples durante un periodo de tiempo.

15 Como se ha indicado anteriormente, la producción de enzima indicadora secretada puede monitorizarse en líquidos corporales, tales como la sangre. Por ejemplo, puede detectarse y cuantificarse SEAP en sangre extraída en ciertos momentos de tiempo después de la administración de un agente candidato. Puede monitorizarse SEAP por métodos muy conocidos descritos en Nilsson E.E., et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 49: 93-100, 2002, Westfall S.D. y Skinner M.K., *Mol Cancer Ther* 2005, 4(11), etc., además de usando kits de, por ejemplo, Applied Biosystems, Clontech, Invivogen.

20 Se ha usado ampliamente la obtención de imágenes *in vivo* de proteínas indicadoras fluorescentes/luminiscentes. Por ejemplo, Burdette J.E. en *Journal of Mol. Endocrin.*, 40, 253-261, 2008, revisa utilizar tomografía computarizada, imagen por resonancia magnética, ultrasonografía, tomografía de emisión de positrones, tomografía computarizada por emisión de fotón único, etc., para la obtención de imágenes *in vivo*. Se han descrito métodos de uso de luciferasas para la obtención de imágenes en tiempo real de la expresión de luciferasa en animales vivos (por ejemplo, L. F. Greer, et al., *Luminescence* 17: 43-74, 2002). Se describe la obtención de imágenes *in vivo* de proteínas fluorescentes en animales vivos en, por ejemplo, Hoffman, *Cell Death and Differentiation* (2002) 9, 786-789.

30 La producción de proteína(s) indicadora(s) puede monitorizarse en diferentes momentos antes y después de someter el modelo animal a condiciones que inducen la atrofia de células musculares. Similarmente, puede determinarse el efecto de un agente candidato midiendo las proteínas indicadoras en varios momentos de tiempo. Por ejemplo, puede medirse la producción de proteína(s) indicadora(s) en el momento 0 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 120 h, 1 semana, 2 semana, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 5 meses, etc., después de poner en contacto la célula con un agente candidato en condiciones que inducen la atrofia de células musculares. En ciertas realizaciones, la medición de las proteínas indicadoras puede realizarse midiendo la expresión del (de los) gen(es) atrógeno(s), además de medir el tamaño de célula/fibra, morfología, fuerza del músculo, etc.

40 Los agentes que modulan el inicio de la atrofia de células musculares pueden disminuir la expresión de la enzima indicadora secretada y la primera proteína ópticamente detectable al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, o al menos el 90 %, o más, con respecto a controles que no se han expuesto al agente.

45 En ciertas realizaciones, un agente candidato que se encontró que era eficaz en disminuir la producción de la(s) proteína(s) indicadora(s), *in vivo* o *in vitro*, puede evaluarse adicionalmente administrándolo a un animal en condiciones que inducen la atrofia de células musculares. La eficacia del compuesto candidato puede determinarse midiendo el momento de aparición del fenotipo de atrofia de células musculares, además de la gravedad de la atrofia de células musculares. La eficacia del compuesto candidato puede determinarse midiendo el peso de músculo, fuerza del músculo, área en sección transversal de fibra, experimentos cinéticos, etc.

50 *Ensayos in vitro*

55 En algunos casos, se proporcionan métodos *in vitro* de identificación de agentes que modulan el inicio de la atrofia de células musculares. Los métodos basados en células generalmente implican poner en contacto una célula que produce proteínas indicadoras tras el inicio de la atrofia de células musculares con un agente candidato, y determinar el efecto, si lo hay, del agente candidato sobre la producción de las proteínas indicadoras en comparación con una célula de control no tratada con el agente candidato.

60 La célula puede someterse a condiciones que inducen la atrofia de células musculares, antes de, después de o simultáneo con poner en contacto la célula con un agente candidato. Condiciones que inducen atrofia de células musculares *in vitro* incluyen hambruna, exposición a glucocorticoides, infección viral, hipoxia, etc.

65 La producción de proteína(s) indicadora(s) puede monitorizarse en diferentes momentos antes y después de someter las células a condiciones que inducen la atrofia de células musculares. Similarmente, el efecto de un agente candidato puede determinarse midiendo las proteínas indicadoras en varios momentos de tiempo. Por ejemplo, la producción de proteína(s) indicadora(s) puede medirse en el momento 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h,

120 h, 1 semana, 2 semana, y hasta 1 mes, después de poner en contacto la célula con un agente candidato en condiciones que inducen la atrofia de células musculares.

5 Como se ha indicado anteriormente, el determinar la producción de enzima indicadora secretada puede ser midiendo la actividad de una enzima indicadora secretada en el medio de cultivo celular. Por ejemplo, cuando la enzima indicadora secretada es SEAP, su actividad puede ensayarse por kits disponibles de Applied Biosystems o Clontech, etc.

10 La proteína ópticamente detectable puede detectarse y su nivel cuantificarse por, por ejemplo, por un microscopio, citómetro activado por fluorescencia, fluorímetro, etc.

En ciertas realizaciones, la medición de las proteínas indicadoras puede realizarse midiendo la expresión del (de los) gen(es) atrógeno(s), además de midiendo el tamaño de célula/fibra, morfología, etc.

15 Agentes

Se proporcionan formulaciones, que incluyen formulaciones farmacéuticas, que comprenden un agente identificado por un método de cribado presentado en el presente documento. En general, una formulación comprende una cantidad eficaz de un agente. Una "cantidad eficaz" significa una dosificación suficiente para producir un resultado deseado, por ejemplo, una disminución en la producción de la enzima indicadora secretada, la primera proteína ópticamente detectable, MuRF1, o prevenir además la pérdida de masa muscular, etc.

Formulaciones

25 En los métodos objeto, el (los) agente(s) activo(s) puede(n) administrarse al hospedador usando cualquier medio conveniente capaz de producir el resultado deseado. Así, el agente puede incorporarse en una variedad de formulaciones para administración terapéutica. Más particularmente, los agentes de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas por combinación con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados, y pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semi-sólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes y aerosoles.

35 En las formas de dosificación farmacéuticas, los agentes pueden administrarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, o también pueden usarse solos o en asociación apropiada, además de en combinación, con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y excipientes son simplemente a modo de ejemplo y de ninguna forma limitantes.

40 Para preparaciones orales, los agentes pueden usarse solos o en combinación con aditivos apropiados para preparar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa de sodio; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y si se desea, con diluyentes, agentes de tamponamiento, agentes humidificantes, conservantes y aromatizantes.

45 Los agentes pueden formularse en preparaciones para inyección disolviendo, suspendiendo o emulsionándolos en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes.

50 Los agentes pueden utilizarse en la formulación en aerosol para ser administrados mediante inhalación. Los compuestos de la presente invención pueden formularse en propulsores aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

55 Pueden proporcionarse formas de dosificación unitaria para administración por vía oral tales como jarabes, elixires y suspensiones en las que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharilla de café, cucharada, comprimido, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más inhibidores. Similarmente, formas de dosificación unitaria para inyección tal como administración intravenosa, intramuscular pueden comprender el (los) inhibidor(es) en una composición como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 El término "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de los compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las novedosas formas de dosificación unitaria de la presente invención dependen del

compuesto particular empleado y el efecto que va a lograrse, y la farmacodinámica asociada a cada compuesto en el hospedador.

5 Formulaciones intranasales normalmente incluirán vehículos que ni producen irritación a la mucosa nasal ni perturban significativamente la función ciliar. Pueden emplearse diluyentes tales como agua, acuosa solución salina u otras sustancias conocidas con la invención objeto. Las formulaciones nasales también pueden contener conservantes tales como, pero no se limitan a, clorobutanol y cloruro de benzalconio. Un tensioactivo puede estar presente para potenciar la absorción de las proteínas objeto por la mucosa nasal.

10 Un agente de la invención puede administrarse como inyectables. Normalmente, las composiciones inyectables se preparan como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o el principio activo encapsularse en vehículos de liposoma.

15 Vehículos de excipiente adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, el vehículo puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como humectantes o emulsionantes o agentes de tamponamiento del pH. Se conocen métodos de preparación actuales de tales formas de dosificación, o serán evidentes, para aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 17^a
20 edición, 1985. La composición o formulación que va a administrarse contendrá, en cualquier caso, una cantidad del agente adecuada para lograr el estado deseado en el sujeto que está tratándose.

25 Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, excipientes o diluyentes, están fácilmente disponibles para el público. Además, sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste del pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares, están fácilmente disponibles para el público.

Dosificaciones

30 Aunque la dosificación usada variará dependiendo de los objetivos clínicos a lograr, un intervalo de dosificación adecuado es uno que proporciona hasta aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1.000 µg, o aproximadamente 10.000 µg de un agente que produce un resultado deseado puede administrarse en una dosis única. Alternativamente, puede considerarse una dosificación diana de un agente que produce un resultado deseado que está aproximadamente en el intervalo de aproximadamente 0,1-1000 µM, aproximadamente 0,5-500 µM,
35 aproximadamente 1-100 µM, o aproximadamente 5-50 µM en una muestra de sangre del hospedador extraída en el plazo de las primeras 24-48 horas después de la administración del agente.

40 Aquellos expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del compuesto específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Dosificaciones preferidas para un compuesto dado son fácilmente determinables por aquellos expertos en la materia mediante una variedad de medios.

Vías de administración

45 Un agente que produce un resultado deseado se administra a un individuo usando cualquier método y vía disponible adecuado para la administración de fármaco, que incluye métodos *in vivo* y *ex vivo*, además de vías de administración sistémicas y localizadas.

50 Vías de administración convencionales y farmacéuticamente aceptables incluyen administración intranasal, intramuscular, intratraqueal, intratumoral, subcutánea, intradérmica, tópica, intravenosa, rectal, nasal, oral y otras vías de administración parenteral. Las vías de administración pueden combinarse, si se desea, o ajustarse dependiendo del agente y/o el efecto deseado. La composición puede administrarse en una dosis única o en múltiples dosis.

55 El agente puede administrarse a un hospedador usando cualquier método convencional disponible y vías adecuadas para la administración de fármacos convencionales, que incluyen vías sistémicas o localizadas. En general, las vías de administración contempladas en el presente documento incluyen, pero no se limitan necesariamente a, vías enterales, parenterales o por inhalación.

60 Vías de administración parenterales distintas de administración por inhalación incluyen, pero no se limitan necesariamente a, vías tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraesternal e intravenosa, es decir, cualquier vía de administración distinta de a través del canal alimentario. La administración parenteral puede llevarse a cabo para efectuar la administración sistémica o local del agente. Donde se desea administración sistémica, la administración normalmente implica administración invasiva o tópica o a la mucosa o absorbida por vía sistémica de preparaciones farmacéuticas.
65

El agente también puede administrarse al sujeto por administración enteral. Vías de administración enterales incluyen, pero no se limitan necesariamente a, administración oral y rectal.

Métodos de administración del agente a través de la piel o mucosa incluyen, pero no se limitan necesariamente a, administración tópica de una preparación farmacéutica adecuada, transmisión transdérmica, inyección y administración epidérmica. Para transmisión transdérmica, promotores de absorción o iontoforesis son métodos adecuados. La transmisión iontoforética puede llevarse a cabo usando "parches" comercialmente disponibles que administran su producto continuamente mediante pulsos eléctricos a través de piel intacta durante periodos de varios días o más.

Una variedad de hospedadores (en el que el término "hospedador" se usa indistintamente en el presente documento con los términos "sujeto" y "paciente") son tratables según los métodos objeto. Generalmente, tales hospedadores son "mamíferos" o "de mamífero", donde estos términos se usan ampliamente para describir organismos que están dentro de la clase mammalia, que incluye los órdenes carnívoros (por ejemplo, perros y gatos), rodentia (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas) y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos). En muchas realizaciones, los hospedadores pueden ser seres humanos.

Sistema

Se proporciona un sistema para monitorizar el inicio y/o la progresión de la atrofia de células musculares. Este sistema puede comprender dos animales transgénicos que pueden aparearse para proporcionar progenie que comprende células que comprenden una construcción indicadora que puede o puede no estar presente en UTR 3' de un gen atrógeno y una secuencia codificante interrumpida de una segunda proteína ópticamente detectable. La construcción indicadora, como se ha descrito en algunas realizaciones anteriormente, puede comprender una primera secuencia codificante de una enzima indicadora secretada, una segunda secuencia codificante de una primera proteína ópticamente detectable y una tercera secuencia codificante de una recombinasa específica de sitio (SSR). La secuencia codificante interrumpida, como se ha descrito anteriormente, no puede codificar la segunda proteína ópticamente detectable debido a la presencia de una secuencia de interrupción, por ejemplo, donde la secuencia de interrupción conduce a una terminación prematura de la traducción. Esta secuencia de interrupción está flanqueada por sitios que se dirigen a recombinasa específica de sitio (SSRTS) que son compatibles con la recombinasa específica de sitio expresada bajo el control del promotor atrógeno. El inicio de la atrofia de células musculares en la progenie produce la producción de SSR que escinde la secuencia de interrupción dejando una única copia del SSRTS en la secuencia codificante de la segunda proteína ópticamente detectable. La secuencia codificante modificada resultante puede entonces codificar la segunda proteína ópticamente detectable. La secuencia codificante modificada está operativamente unida a un promotor constitutivamente activo. Así, una vez la secuencia de interrupción se ha escindido por la SSR producida tras el inicio de la atrofia de células musculares, todas las células en las que la atrofia se inició están marcadas por la producción de la segunda proteína ópticamente detectable. Así, las células en las que se indujo la atrofia de células musculares se marcan permanentemente. La producción continuada de la segunda proteína ópticamente detectable es así independiente de continuar la atrofia muscular a diferencia de la producción de la primera proteína ópticamente detectable, cuya producción disminuiría tras la inhibición de la atrofia de células musculares. Este sistema de marcado proporciona una forma de seguir músculos específicos durante el cribado para agentes candidatos que modula la atrofia de células musculares. Ejemplos de animales útiles para poner en práctica los métodos presentados en el presente documento, genes atrógenos, construcciones indicadoras y primera y segunda proteínas ópticamente detectables se han tratado en las secciones precedentes. El promotor constitutivo puede ser un promotor de citomegalovirus (CMV), virus de tumor mamario de ratón (MMTV), virus del sarcoma de Rous (RSV) o adenovirus, etc. Promotores a modo de ejemplo incluyen el promotor del gen temprano inmediato de CMV humano (Cell 41:521-530, 1985); el promotor de la repetición terminal larga (LTR) de VSR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777-6781, 1982); promotor temprano de SV40; y el promotor tardío principal de adenovirus.

En ciertas realizaciones, la progenie producida del apareamiento de los dos animales transgénicos de este sistema puede usarse para cribar agentes que modulan la atrofia de células musculares. En realizaciones particulares, la progenie puede usarse para caracterizar además el proceso de atrofia muscular por, por ejemplo, obtención de imágenes de las células musculares permanentemente marcadas durante el inicio y la progresión de la atrofia muscular. En realizaciones a modo de ejemplo, el perfil de expresión de estas células musculares permanentemente marcadas puede determinarse aislando estas células de la progenie.

Utilidad

Los modelos *in vivo* e *in vitro* presentados en el presente documento proporcionan métodos de identificación y prueba de agentes que pueden disminuir la atrofia de células musculares. Estos agentes pueden usarse en formulaciones que pueden usarse para tratar sujetos con atrofia de células musculares. Además, estos agentes pueden administrarse profilácticamente a sujetos en riesgo de desarrollar atrofia de células musculares. Un sujeto que puede beneficiarse de un agente identificado por los métodos proporcionados en el presente documento puede tener o estar en riesgo de desarrollar la atrofia de células musculares producida por una variedad de estímulos. Estos estímulos incluyen, pero no se limitan a, ayunas, envejecimiento, cáncer avanzado, insuficiencia renal,

septicemia, caquexia, artritis, osteoporosis y diabetes. La atrofia de los músculos también puede ser un resultado de su desuso o denervación, por ejemplo, inmovilización, descarga muscular, lesión de médula espinal, etc. En ciertas realizaciones, el sujeto puede tener un problema de salud que se agrava por la atrofia de células musculares, tal como VIH, insuficiencia cardíaca crónica, enfermedad renal crónica, cirrosis hepática, lesiones por quemaduras, osteoporosis, artritis, etc. Pueden usarse métodos de uso de las células y modelos animales para detectar compuestos candidatos que inhiben la atrofia de células musculares para identificar agentes que mejoran el contenido de proteína, diámetro de fibra, producción de fuerza y resistencia a la fatiga de músculos en sujetos con la atrofia de células musculares. En una realización, un compuesto identificado por el método descrito anteriormente puede emplearse para tratar o prevenir la atrofia del diafragma durante el soporte por respirador después de cirugía, que se produce muy rápidamente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar además ciertas realizaciones y aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Generación de la construcción indicadora 1

Se genera un plásmido que contiene una construcción indicadora mostrada en la Fig. 2 por técnicas de biología molecular convencionales. Se clonan el ORF para la fosfatasa alcalina secretada (SEAP), resistencia a higromicina, turboFP635 y luciferasa (hluc2CP) en la dirección 3' de una secuencia de IRES de VHC, separada por secuencias de derivación traduccional de FMDV 2A. Las secuencias de derivación traduccional permiten que ORF individuales se resuelvan sin la necesidad de proteasas. Se muestran secuencias de unión 2A.1, 2A.2 y 2A.3 con conectores flexibles en la Fig. 3.

El plásmido mostrado en la Fig. 2 se modifica clonando en secuencias genómicas de ratón flanqueantes y elementos apropiados para permitir la activación génica por recombinación homóloga. Secuencias flanqueantes de la región UTR 3' del gen MuRF1 de ratón para mediar en la recombinación homóloga se clonan antes de la secuencia de IRES de VHC y después de la secuencia de poli A sintética. Se incluye una secuencia de nucleótidos que codifica timidina cinasa como marcador de selección negativo.

El plásmido de activación resultante se transfecta en células madre embrionarias (ES). Las células que crecen en presencia de higromicina y ganciclovir se seleccionan como células en las que la construcción indicadora está correctamente dirigida. El direccionamiento correcto de la construcción indicadora en la región UTR 3' del gen MuRF1 se confirma por secuenciación.

El plásmido de activación que contiene la construcción indicadora con las secuencias flanqueantes de la región UTR 3' del gen MuRF1 de ratón y una secuencia de nucleótidos que codifica timidina cinasa como marcador de selección negativo también se transfecta en miotubos murinos (por ejemplo, línea C2C12) y mioblastos para establecer líneas celulares resistentes a higromicina y ganciclovir. El direccionamiento correcto de la construcción indicadora en estas líneas celulares se confirma por secuenciación e induciendo atrofia poniendo en contacto estas células con un glucocorticoide. Si la construcción indicadora es correctamente dirigida, estas células deberían expresar MuRF1, SEAP, turboFP635 y luciferasa.

Ejemplo 2

Cribado de inhibidores de la atrofia de células musculares

Se usa la línea celular de miotubos generados en el Ejemplo 1 para cribar compuestos candidatos que pueden inhibir la atrofia muscular. La línea celular de miotubos que contiene la construcción indicadora en la región UTR 3' del gen MuRF1 se pone en contacto con un glucocorticoide, tal como dexametasona, y se miden los niveles de SEAP en el medio de cultivo y el nivel de expresión de FP635. Las células que han iniciado atrofia muscular muestran elevados niveles de expresión de SEAP y FP635 en comparación con células no puestas en contacto. Estas células se ponen entonces en contacto con los compuestos candidatos y se monitorizan los niveles de expresión de los indicadores, es decir, SEAP y FP635 durante un periodo de tiempo. Una disminución en los niveles de expresión de los indicadores en comparación con las células puestas en contacto con dexametasona y un compuesto de control negativo, tal como DMSO, indica que el compuesto candidato inhibe la atrofia muscular.

Ejemplo 3

Modelo animal para atrofia de células musculares 1

Se usan las células ES con la construcción indicadora correctamente dirigida en el Ejemplo 1 para generar líneas transgénicas de ratón usando procedimientos convencionales. La región genómica de células en líneas de ratón

generadas de tales células ES se representa en la Fig. 4. Las líneas de ratón se administran con dexametasona para inducir la atrofia muscular. Los músculos en los que la atrofia se inicia se monitorizan por obtención de imágenes *in vivo* de cualquiera de la proteína fluorescente FP635 o de actividad de luciferasa después de la administración de luciferina. El inicio de la atrofia muscular también puede monitorizarse midiendo niveles de SEAP en sangre. La Fig. 4 muestra que una línea de ratón transgénico generada a partir de las células ES del Ejemplo 1 cuando se somete a estímulos inductores de atrofia muscular tendría niveles detectables de SEAP en la sangre y expresaría FP635 en las células musculares en las que se inicia la atrofia. Adicionalmente, la administración de luciferina conduciría a la detección de la expresión de luciferasa en células en las que se inicia la atrofia muscular. La fluoresceína de FP635 o luminiscencia de actividad de luciferasa se detectarían por obtención de imágenes *in vivo* del animal completo como se muestra en la Fig. 4. Pueden tomarse mediciones en varios momentos de tiempo en el mismo animal ya que estos métodos no requieren sacrificar el animal. Los niveles de expresión de MuRF1 también se monitorizan para confirmar que MuRF1 está siendo expresado por ratones en los que se induce atrofia muscular.

Ratones en los que se inicia atrofia muscular se administran tanto con compuestos candidatos como compuestos que inhibieron la atrofia muscular en miotubos en el Ejemplo 2. Una reducción en los niveles de expresión de FP635 o luciferasa o SEAP indica que un compuesto candidato inhibe la atrofia de células musculares *in vivo*.

Ejemplo 4

Generación de la construcción indicadora 2

Se modifica el plásmido mostrado en la Fig. 2 reemplazando el ORF de hluc2CP con un ORF que codifica la recombinasa CRE y clonando en secuencias genómicas de ratón flanqueantes y elementos apropiados para permitir la activación génica por recombinación homóloga. Se clonan secuencias flanqueantes de la región UTR 3' del gen MuRF1 de ratón para mediar en la recombinación homóloga antes de la secuencia de IRES de VHC y después de la secuencia de poli A sintética. Se incluye una secuencia de nucleótidos que codifica timidina cinasa como marcador de selección negativo.

El plásmido de activación resultante se transfecta en células ES. Se seleccionan las células que crecen en presencia de higromicina y ganciclovir como células en las que la construcción indicadora está correctamente dirigida. El direccionamiento correcto de la construcción indicadora en la región UTR 3' del gen MuRF1 se confirma por secuenciación.

Ejemplo 5

Modelo animal para atrofia de células musculares 2

Se usan las células ES con la construcción indicadora correctamente dirigida generada en el Ejemplo 4 para generar líneas de ratón transgénico usando procedimientos convencionales. La región genómica de células en líneas de ratón generadas a partir de tales células ES se representa en la Fig. 5. Estas líneas de ratón se cruzan con una línea de ratón transgénico que tiene una construcción en la que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) se interrumpe por la presencia de codones STOP que están flanqueados por secuencias de lox. Los ratones producidos a partir de este cruce tienen una construcción indicadora, que codifica SEAP, resistencia a higromicina, turboFP635 y CRE, insertada en la UTR 3' del gen MuRF1 y una copia de una construcción en la que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica GFP está interrumpida por la presencia de codones STOP que están flanqueados por secuencias de lox. Estos ratones se administran con dexametasona para inducir atrofia muscular. Los músculos en los que la atrofia se inicia expresan CRE. CRE recombina los sitios de lox que flanquean los codones STOP produciendo la escisión de los codones STOP y la expresión de GFP. Como GFP se expresa a partir de un promotor constitutivo, los músculos en los que se inició la atrofia se marcan permanentemente por la expresión de GFP. Así, la progresión de la atrofia muscular después de la inducción de atrofia puede monitorizarse por obtención de imágenes *in vivo* de cualquiera de la proteína fluorescente FP635 o de GFP. A medida que progresa la atrofia muscular hay un aumento en los niveles de expresión de FP635 y SEAP. Los ratones se administran tanto con compuestos candidatos como compuestos que inhibieron la atrofia de células musculares en miotubos en el Ejemplo 2. Una reducción en los niveles de expresión de FP635 o SEAP indica que un compuesto candidato inhibe la atrofia de células musculares *in vivo*. El grado de atrofia muscular progresiva se mide por el área de tejido de músculo que expresa GFP. El área disminuye a medida que progresa la atrofia. Sin embargo, si un compuesto inhibe la atrofia de células musculares, éste área sigue siendo igual o puede incluso aumentar en tamaño. Así, la GFP sirve como una forma de medir la recuperación de los músculos después de que se haya inhibido la atrofia. Un esquema de este sistema se muestra en la Fig. 5. La Fig. 5 muestra la construcción indicadora insertada en la región UTR 3' del gen MuRF1 de ratón. La activación del promotor de MuRF1 por estímulos inductores de atrofia muscular produce la expresión de SEAP, FP635 y CRE. CRE recombina los sitios de lox que flanquean los codones de terminación que interrumpen ORF para GFP, conduciendo a la expresión de GFP. Así, los músculos en los que se inicia la atrofia se detectan por expresión de FP635 y GFP. Cuando se inactiva el promotor de MuRF1, por ejemplo, debido a la inhibición de atrofia muscular, FP635 no es detectable pero GFP

continúa expresándose (mostrado en verde), mientras que las células musculares en las que el promotor de MuRF1 es activo expresarían tanto FP635 como GFP (mostrado en rojo).

- 5 El volumen directo de músculos marcados con GFP puede medirse usando técnicas de obtención de imágenes de animales enteros tales como tomografía 3D como se representa en la Fig. 6. La Fig. 6 muestra que la tomografía 3D puede usarse para detectar luminiscencia o fluorescencia.

REIVINDICACIONES

1. Un modelo animal no humano para atrofia de células musculares que comprende:
- 5 células musculares que comprenden un genoma nuclear que comprende un gen atrógeno biológicamente activo que codifica una proteína funcional, cuya expresión se induce en células musculares expuestas a un estímulo inductor de atrofia, en enlace operativo con una construcción indicadora presente en la región no traducida (UTR) 3' o UTR 5' de dicho gen atrógeno, comprendiendo dicho indicador:
- 10 i. una primera secuencia codificante de una proteína detectable fluorescente o luminiscente; y
 ii. una segunda secuencia codificante de una enzima indicadora secretada;
- en el que dicha enzima indicadora secretada y dicha proteína detectable se inducen por atrofia de células musculares y la producción de dicho indicador secretado de dicho animal no humano puede monitorizarse de forma no invasiva en fluidos corporales y dicha proteína detectable de dicho animal no humano puede monitorizarse por obtención de imágenes *in vivo*.
- 15
2. El modelo animal no humano de la reivindicación 1, en el que la inducción de dicho gen atrógeno por atrofia de células musculares produce la secreción de dicha enzima indicadora secretada en la circulación sanguínea de dicho animal.
- 20
3. El modelo animal no humano de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho gen atrógeno biológicamente activo es endógeno a dicha célula.
- 25
4. El modelo animal no humano de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho gen atrógeno biológicamente activo es no endógeno a dicha célula.
- 30
5. El modelo animal no humano de la reivindicación 4, en el que dicha célula comprende además un gen atrógeno endógeno, y dicho gen atrógeno activo biológico está comprendido en una construcción recombinante que está presente en un locus diferente al gen atrógeno endógeno.
- 35
6. El modelo animal no humano de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha construcción indicadora codifica una secuencia de derivación traduccional que está presente entre dicha primera secuencia codificante y dicha segunda secuencia codificante.
- 40
7. El modelo animal no humano de la reivindicación 6, en el que dicha secuencia de derivación traduccional es la secuencia de la derivación traduccional FMDV 2A.
- 45
8. El modelo animal no humano de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicha construcción indicadora codifica una secuencia de derivación traduccional que une el exón final de dicho gen atrógeno con dicha primera secuencia codificante.
- 50
9. El modelo animal no humano de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicha construcción indicadora comprende un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y está presente en la UTR 3' de dicho gen atrógeno.
- 55
10. El modelo animal no humano de la reivindicación 9, en el que dicha construcción indicadora codifica una secuencia de derivación traduccional que está presente entre dicha primera secuencia codificante y dicha segunda secuencia codificante.
- 60
11. Un método de cribado de agentes candidatos que modula la atrofia de células musculares que comprende:
- a) poner en contacto un modelo animal no humano de la reivindicación 1 con un agente candidato en condiciones que inducen la atrofia de células musculares; y
- b) determinar si dicho agente candidato altera la producción de dicha enzima indicadora secretada y dicha proteína detectable por dicho modelo animal no humano.
12. El método de la reivindicación 11, en el que dichas condiciones que inducen atrofia de células musculares comprenden poner en contacto dicha célula con un agente inductor de atrofia de células musculares.
13. El método de la reivindicación 11 que comprende además medir la actividad de la enzima indicadora secretada en la sangre del animal y obtener imágenes de dicho animal para detectar la expresión de la proteína detectable.

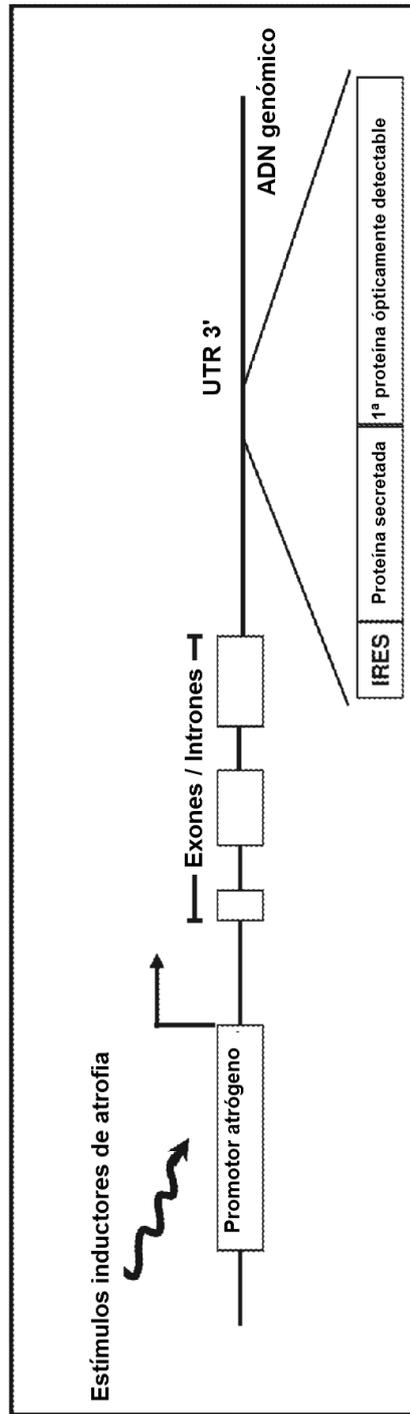


Fig. 1A

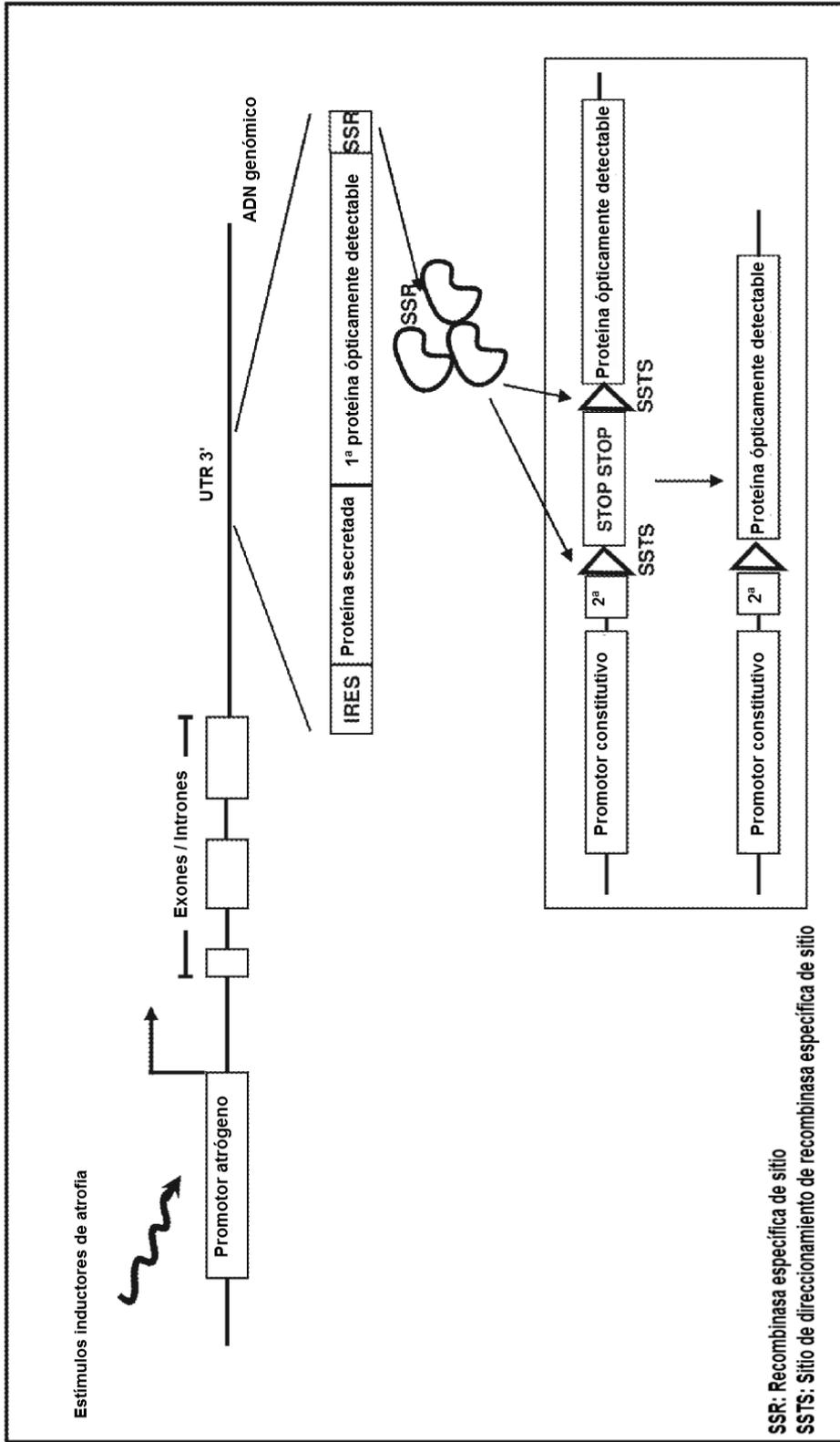


Fig. 1B

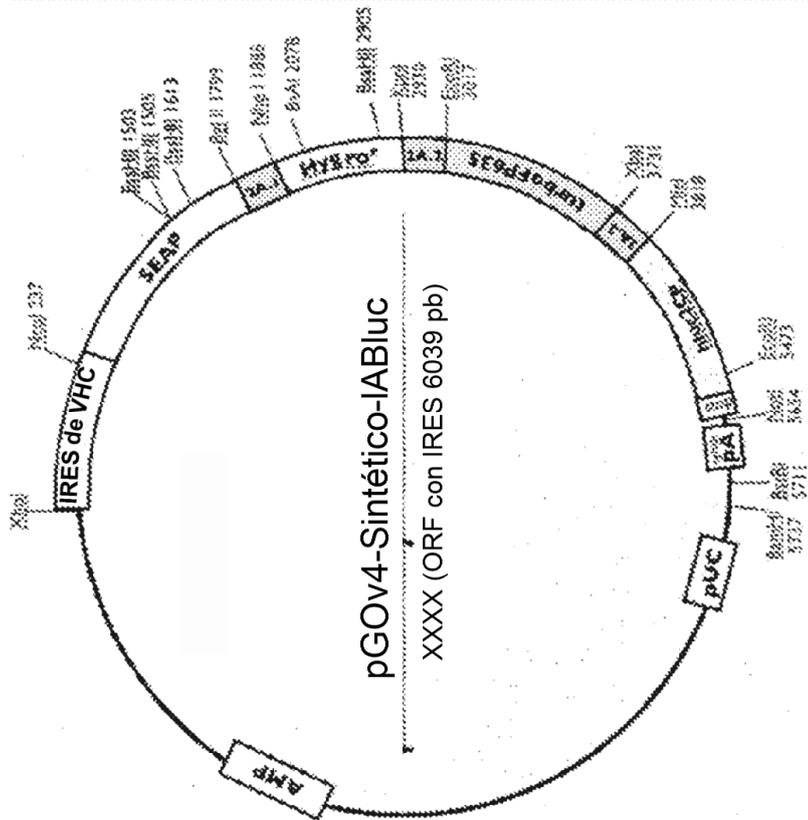


Fig. 2

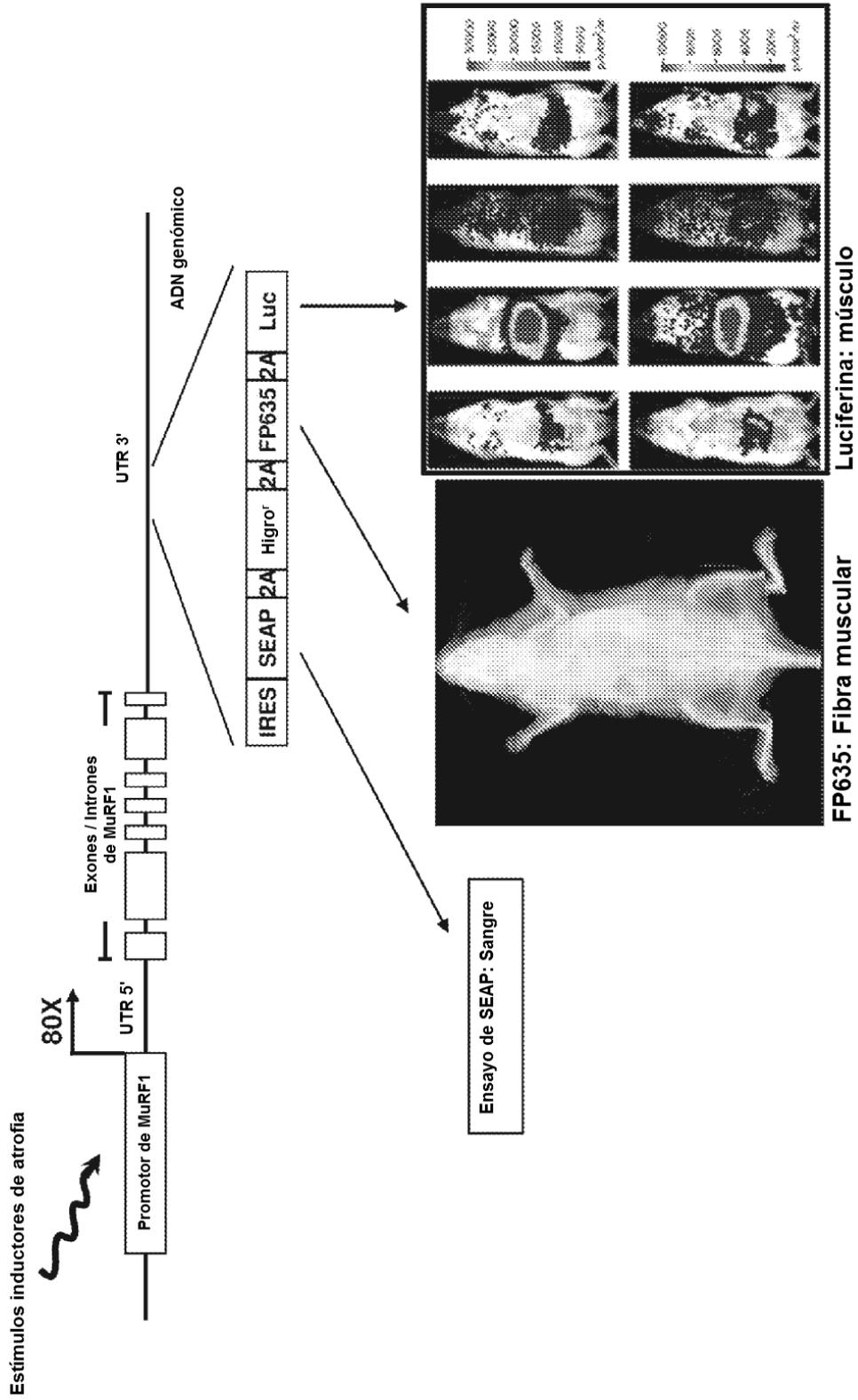


Fig. 4

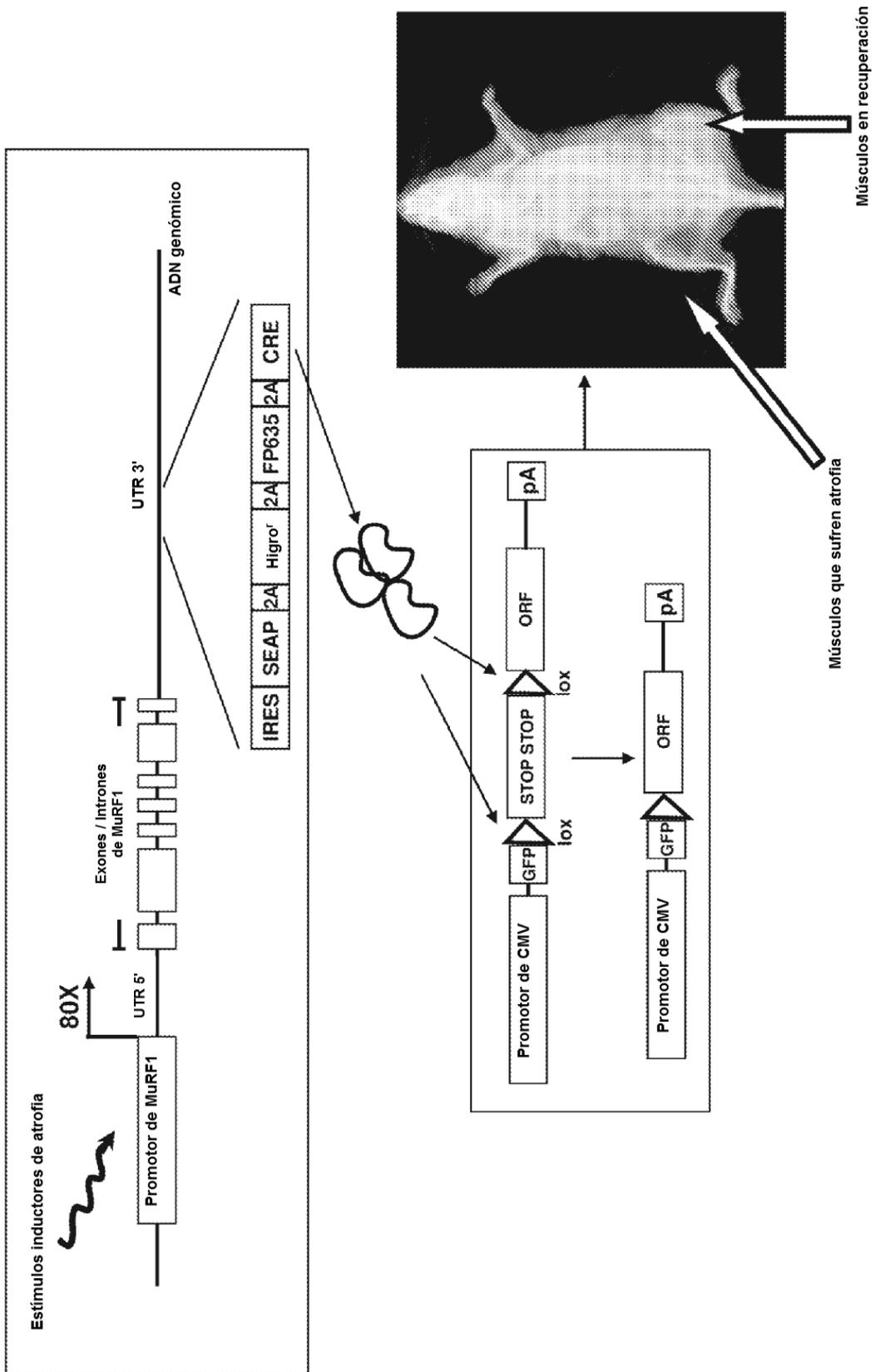


Fig. 5

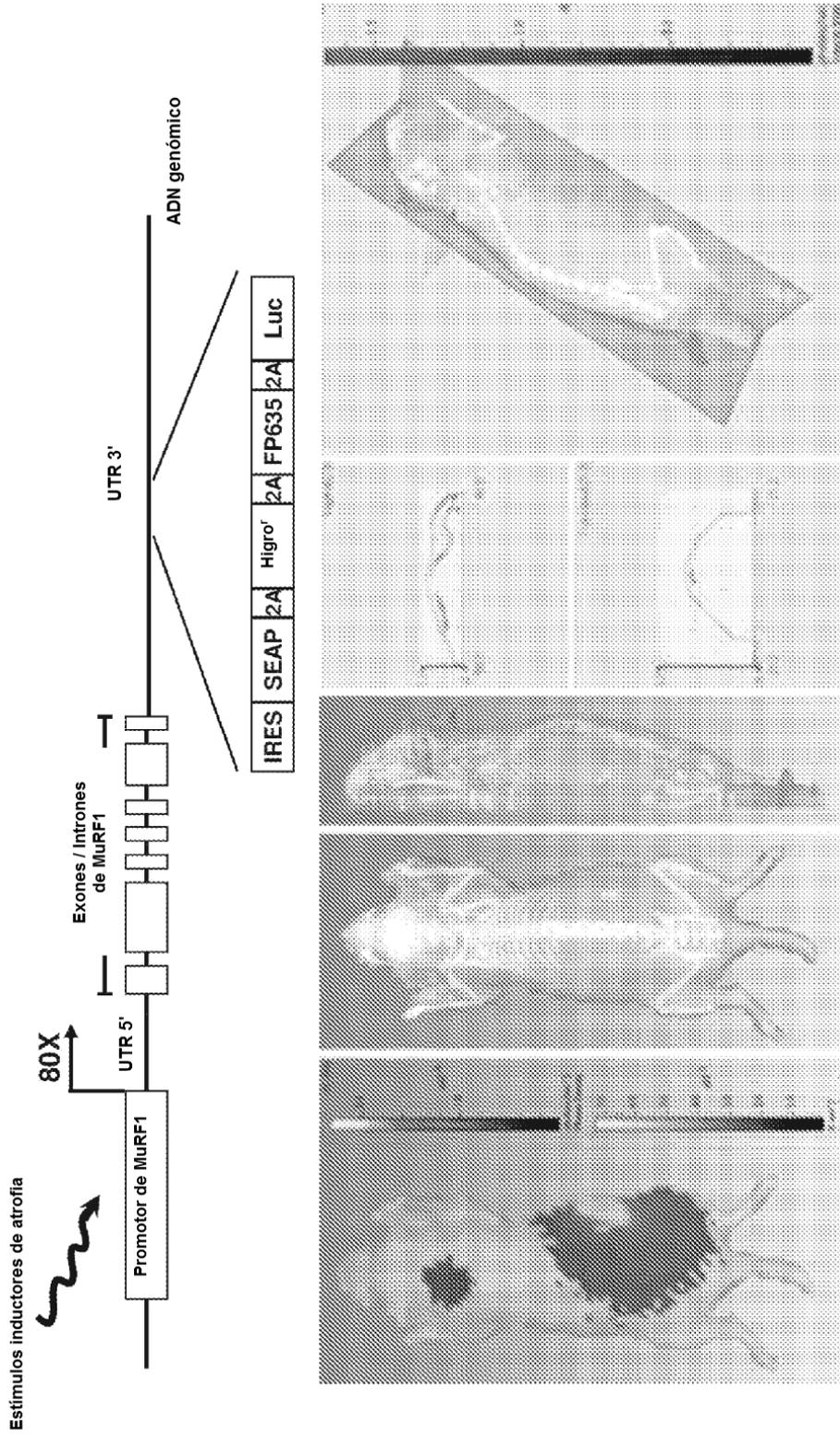


Fig. 6

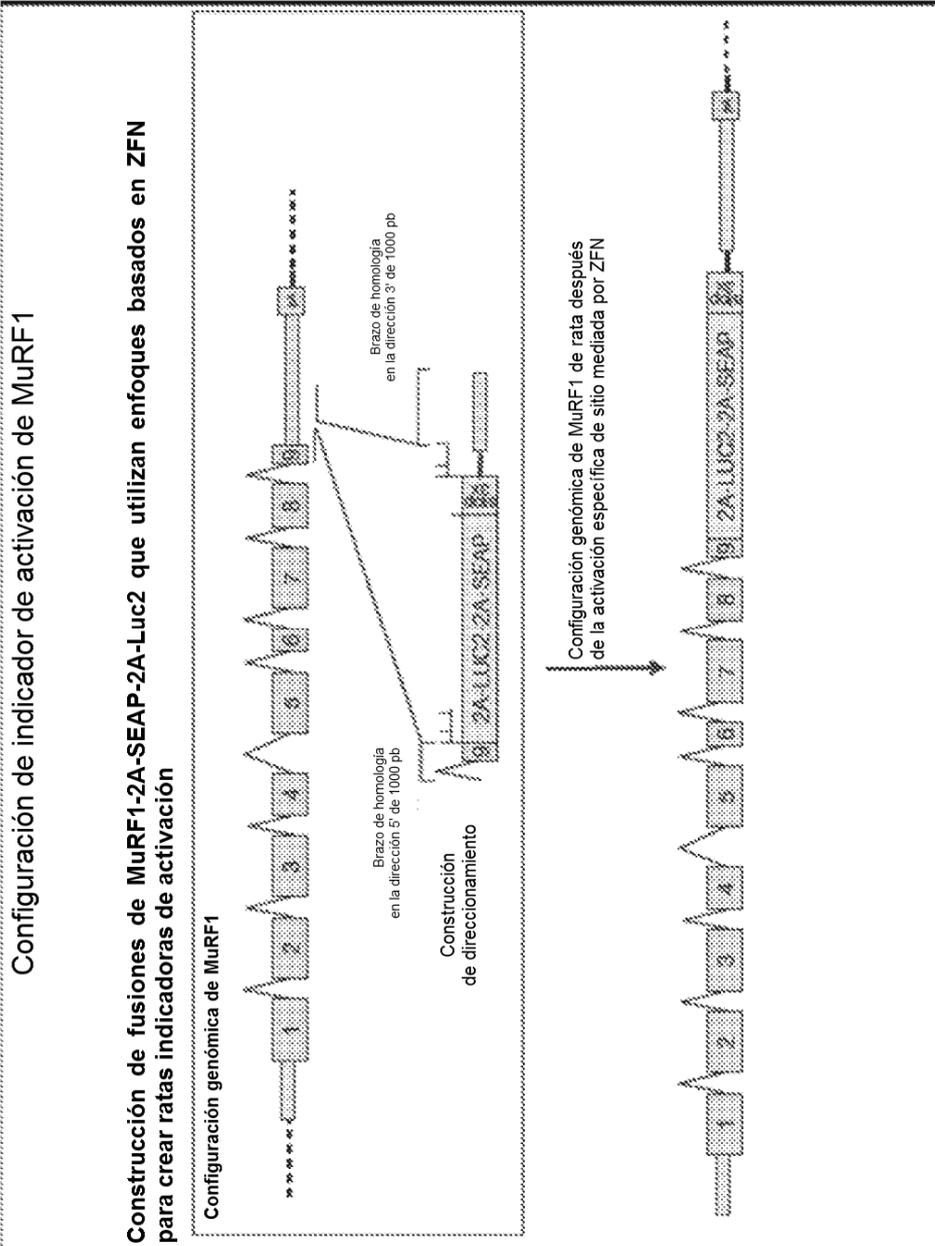


Fig. 7

Configuración de indicador de activación de atrogina-1

Construcción de fusiones de atrogina-1-2A-SEAP-2A-Luc2 que utilizan enfoques basados en ZFN para crear ratas indicadoras de activación

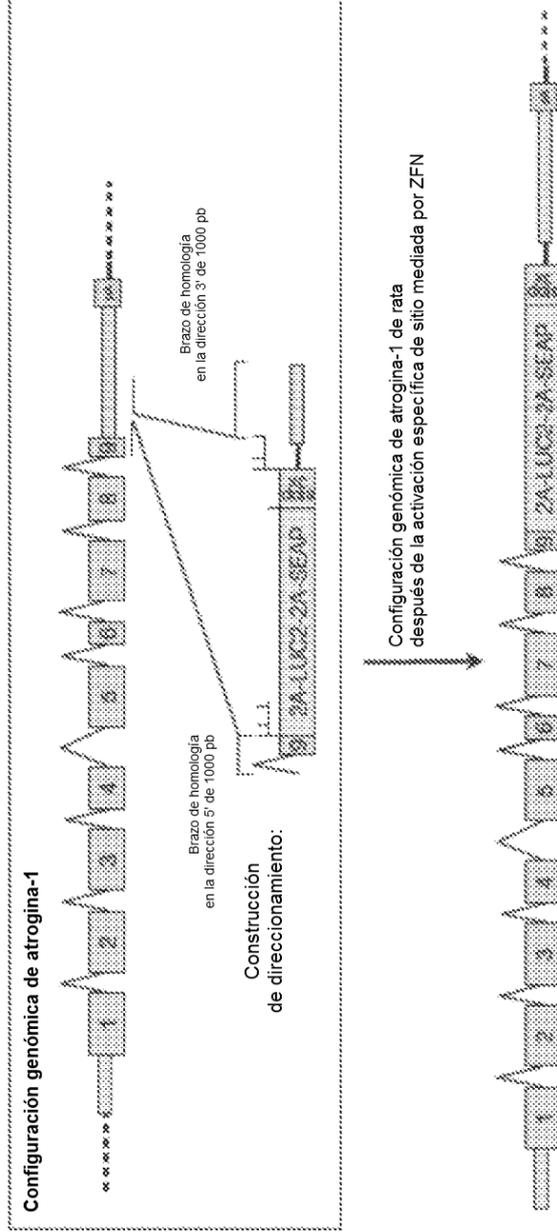


Fig.8

Configuración de indicador transgénico de MuRF1

Construcción de clones de BAC MuRF1-IRES de VHC de UTR 3'-SEAP-2A-Luc2 para su uso en la creación de ratas transgénicas indicadoras

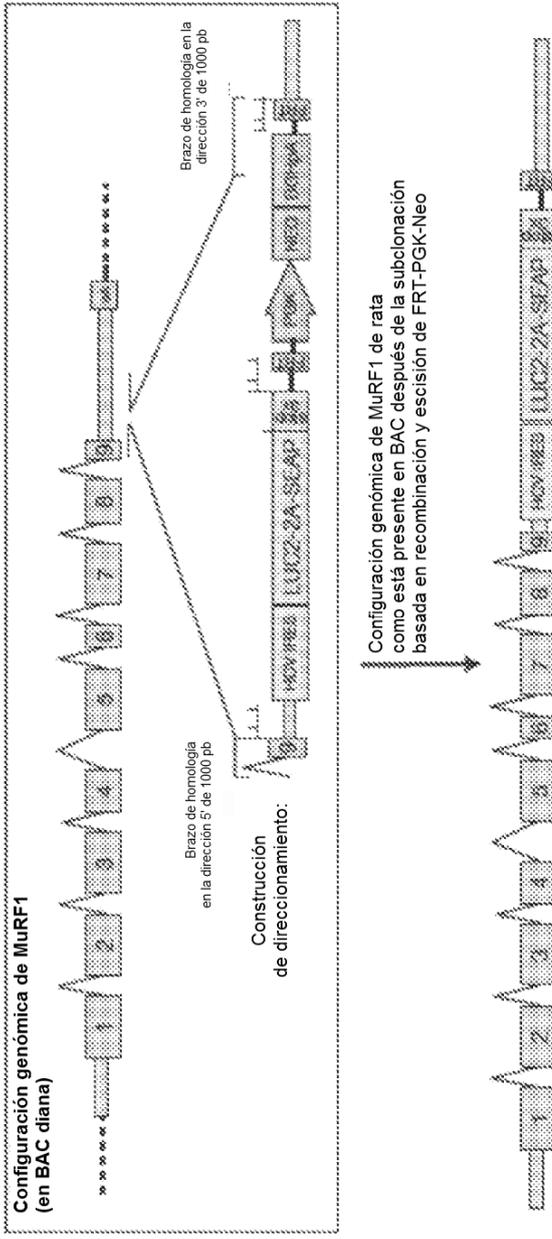


Fig. 9