

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 849**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68	(2006.01)	G01N 33/50	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01)		
C12N 1/15	(2006.01)		
C12N 1/19	(2006.01)		
C12N 1/21	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		
C12N 9/12	(2006.01)		
C12N 15/09	(2006.01)		
C12Q 1/68	(2008.01)		
G01N 33/15	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2015 PCT/JP2015/060671**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15152413**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2015 E 15772611 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 3128326**

54 Título: **Biomarcador para el diagnóstico de envejecimiento o amiotrofia**

30 Prioridad:

03.04.2014 JP 2014077086

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

27.04.2018

73 Titular/es:

**TOKYO METROPOLITAN GERIATRIC HOSPITAL
AND INSTITUTE OF GERONTOLOGY (100.0%)
35-2 Sakae-cho Itabashi-ku
Tokyo173-0015, JP**

72 Inventor/es:

SHIGEMOTO, KAZUHIRO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 665 849 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

Biomarcador para el diagnóstico de envejecimiento o amiotrofia

Campo técnico

La presente invención se refiere a un biomarcador para el diagnóstico de envejecimiento o amiotrofia.

5 Antecedentes de la técnica

Con la llegada de una sociedad súper envejecida, se busca un biomarcador válido para prevenir el estado de las necesidades de cuidados de larga duración causadas por una disminución en el rendimiento de locomoción y amiotrofia, pero no se ha proporcionado ningún biomarcador fundamental. En particular, desde que la amiotrofia ha progresado, es imposible tratarla, se requiere un biomarcador para un diagnóstico y tratamiento precoces. Además, también se requiere un biomarcador para enfermedades neuromusculares incurables que conducen a amiotrofia con el fin de desarrollar una terapia válida y un agente terapéutico válido.

10 Sin embargo, en el campo clínico actual o en el campo de la atención preventiva, un diagnóstico se realiza en base a las mediciones de fuerza muscular, masa muscular y rendimiento del ejercicio, así como una puntuación sobre la actividad diaria mediante una entrevista. Dado que estos procedimientos tienen una escasa eficacia en el diagnóstico precoz antes de la progresión de la amiotrofia, es necesario desarrollar un biomarcador capaz de prevenir o tratar la amiotrofia, mediante un diagnóstico precoz de los cambios en los músculos.

15 Por ejemplo, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se diagnostica basándose en los síntomas clínicos característicos, y además de esto, se ha demostrado que los exámenes, tales como electromiografía de aguja, estimulación magnética transcraneal (EMT) y neuroimagen, son válidos para soportar el diagnóstico. Además, se ha considerado que un biomarcador es válido para un diagnóstico precoz de ELA, así como una reducción en el número de sujetos en un ensayo clínico, una reducción del periodo, y un juicio objetivo de la eficacia del fármaco, y por lo tanto, la identificación ha sido examinada utilizando un líquido cefalorraquídeo o plasma derivado de pacientes con ELA, pero no existe ningún biomarcador que demostrara ser útil en ELA (literatura no patente 1).

20 Aunque un autoanticuerpo se utiliza en el diagnóstico definitivo de la miastenia gravis, no es válido para un juicio de la efectividad o los efectos secundarios de una terapia, así como la evaluación de la gravedad. Además, la electromiografía de fibra única es una buena indicación para el diagnóstico de los síntomas en el momento de la medición, pero no es válida para el pronóstico después del tratamiento. Por lo tanto, se requiere un biomarcador que pueda ser utilizado comúnmente en un modelo animal de miastenia gravis y en un paciente, y que se pueda utilizar para evaluar objetivamente los efectos terapéuticos (literatura no patente 2).

30 Los marcadores inflamatorios, tales como TNF- α e IL-6 se notificaron como biomarcadores para la sarcopenia (literaturas no patente 3-6). Sin embargo, puesto que tienen una especificidad deficiente, es difícil utilizarlos para un diagnóstico y tratamiento precoces de amiotrofia.

Listado de referencias

Literatura de patente

- 35 [Literatura no patente 1] Costa J, Gomes C, de Carvalho M, *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010; 9: 764-778.
 [Literatura no patente 2] Kaminski H, Kusner L, Wolfe G, y col., *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1275(1): 101-106.
 [Literatura no patente 3] Visser M, Pahor M, Taaffe DR, y col., *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; 57: M326-332.
 [Literatura no patente 4] Payette H, Roubenoff R, Jacques PF, y col., *J Am Geriatr Soc* 2003; 51: 1237-1243.
 [Literatura no patente 5] Schaap LA, Pluijm SM, Deeg DJ, y col., *Am J Med* 2006; 119: 526 e529-517.
 40 [Literatura no patente 6] Schaap, LA, Pluijm SM, Deeg DJ, y col., *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009; 64: 1183-1189.
 [Literatura no patente 7] Jorgensen, LH, y col., *Am J Pathol*, 2007; 171(5): 1599-1607.

Sumario de la invención

Problema técnico

45 Bajo estas circunstancias, un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo biomarcador para el diagnóstico de envejecimiento o amiotrofia, y otro objeto es, en base al biomarcador, proporcionar un procedimiento para determinar el estado de envejecimiento o amiotrofia, un procedimiento para determinar la eficacia de los efectos terapéuticos o preventivos sobre el envejecimiento o la amiotrofia, y un procedimiento para identificar sistemáticamente un agente terapéutico o preventivo para el envejecimiento o la amiotrofia.

50 Solución al problema

Se sabe que una proteína MuSK de tipo receptor (quinasa específica de músculo), que es una tirosina quinasa que se expresa en el lado muscular (es decir, la membrana postsináptica) de las sinapsis neuromusculares (uniones

neuromusculares) es una proteína esencial para la formación de sinapsis neuromusculares, y también desempeña un papel importante en el mantenimiento funcional de las sinapsis neuromusculares. El inventor descubrió que una proteína MuSK secretada, que se generó por una transcripción que pasa a través de una señal de corte y empalme en un exón aguas arriba de un dominio de unión a membrana de la proteína MuSK de tipo receptor, se expresó en el músculo esquelético y se notificó que la miastenia gravis ocurrió por inmunización de un ratón con la MuSK secretada (los detalles se describen a continuación). Sin embargo, la función de la MuSK secretada *in vivo* era desconocida hasta ahora.

El inventor midió el nivel de expresión de ARNm para la MuSK secretada y la MuSK de tipo receptor en un músculo esquelético de ratón (Ejemplo 3), y la cantidad de una proteína MuSK que estaba presente en un estado libre en un suero de ratón (Ejemplo 4), y se confirmó que el nivel de expresión de ARNm para la MuSK secretada, y la cantidad de la proteína MuSK en sangre aumentó con la edad; y que el nivel de expresión de ARNm para la MuSK secretada, el nivel de expresión de ARNm para la MuSK de tipo receptor, y la cantidad de la proteína MuSK en sangre aumentó en ratones en los que defectos morfológicos y funcionales de las sinapsis neuromusculares se hallaban en curso (un ratón escindido de nervio motor o un ratón inmovilizado con yeso). Además, en un modelo de ratón con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y un modelo de ratón con miastenia gravis (MG), el inventor confirmó que, en el primero (ratón con ELA), se observó un aumento en la cantidad de la proteína MuSK libre contenida en un suero antes de la aparición, y se observó un aumento adicional según el progreso de la enfermedad (Ejemplo 6); y que, en el último (ratón con MG), se observó un aumento en la cantidad de la proteína MuSK libre contenida en un suero según la aparición (Ejemplo 7). A partir de estos hallazgos, el inventor ha descubierto que el ARNm para la MuSK secretada, el ARNm para la MuSK de tipo receptor, o la proteína MuSK libre en sangre puede utilizarse como un biomarcador para el envejecimiento, como un indicador que muestra la función de sinapsis neuromuscular, o un biomarcador que permite un diagnóstico precoz para la amiotrofia.

Además, el inventor midió las cantidades de la proteína MuSK libre en sueros recogidos de pacientes con miastenia gravis (en el que una disminución de la fuerza muscular y amiotrofia leve o moderada fueron causadas por un autoanticuerpo contra un receptor de la acetilcolina (un receptor para un transmisor expresado en el lado muscular de una sinapsis neuromuscular)) y pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (en los que la amiotrofia había progresado altamente) (Ejemplo 5); confirmó que la cantidad de la proteína MuSK en la sangre del paciente con esclerosis lateral amiotrófica (en el que las sinapsis neuromusculares desaparecieron y la amiotrofia fue causada debido a la muerte celular de los nervios motores) se redujo notablemente (desapareció esencialmente) en comparación con las personas sanas; y ha descubierto que la MuSK libre en sangre puede utilizarse como un biomarcador para la amiotrofia severa.

Además, el inventor confirmó, a partir de un suero recogido de ratones con ELA (Ejemplo 8) y un sobrenadante de cultivos de una estirpe celular C2C12 de mioblastos cultivados de ratón (Ejemplo 9), que una proteína MuSK libre (una proteína MuSK truncada) que se escindió de la proteína MuSK de tipo receptor por una proteasa y se liberó en un sobrenadante de cultivos se incluyó en la proteína MuSK libre. El inventor confirmó que la cantidad de la proteína MuSK libre en el sobrenadante de cultivos de una estirpe celular C2C12 de mioblastos cultivados de ratón se redujo mediante la adición de GM6001, un inhibidor de ADAM, al medio de cultivo (Ejemplo 10), y descubrió que un agente terapéutico o preventivo para el envejecimiento o para la amiotrofia puede identificarse sistemáticamente mediante la medición de la cantidad de la proteína MuSK libre o de ARNm contenidos en una muestra recogida de un modelo animal, o un sobrenadante de cultivos de una estirpe celular. El inventor confirmó que GM6001, un inhibidor de ADAM, exhibía una actividad creciente de un agrupamiento del receptor de la acetilcolina (AChR), que era un indicador de sinaptogénesis, contra células miotubo C2C12 de ratón (Ejemplo 11), y confirmó que las sustancias seleccionadas por el sistema de identificación sistemática exhibían en realidad una actividad para promover la sinaptogénesis, y por lo tanto, podrían ser candidatos para el agente terapéutico o preventivo para el envejecimiento o la amiotrofia.

La presente invención se basa en estos hallazgos.

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación se refiere a:

[15a] un procedimiento de tratamiento o prevención del envejecimiento o amiotrofia, comprendiendo dicho procedimiento la administración a un sujeto en necesidad del mismo, de una sustancia capaz de reducir una cantidad de una proteína MuSK libre, o un nivel de expresión de un ARNm para una MuSK secretada, o una sustancia capaz de aumentar el agrupamiento del receptor de la acetilcolina (AChR), en una cantidad eficaz correspondiente;

[15b] uso de una sustancia capaz de reducir una cantidad de una proteína MuSK libre, o un nivel de expresión de un ARNm para una MuSK secretada, o una sustancia capaz de aumentar el agrupamiento del receptor de la acetilcolina (AChR), en la fabricación de un agente terapéutico o preventivo para el envejecimiento o la amiotrofia; y

[15c] una sustancia capaz de reducir una cantidad de una proteína MuSK libre, o un nivel de expresión de un ARNm para una MuSK secretada, o una sustancia capaz de aumentar el agrupamiento del receptor de la acetilcolina (AChR), para el tratamiento o prevención del envejecimiento o amiotrofia.

El término "amiotrofia", como se utiliza en la presente memoria, incluye, por ejemplo, sarcopenia, miastenia gravis

(incluyendo anticuerpos anti-MuSK positivos para miastenia gravis, anticuerpos anti-receptor de la acetilcolina (AChR) positivos para miastenia gravis, anticuerpos anti-LRP4 (proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR)) positivos para miastenia gravis, y autoanticuerpos negativos para miastenia gravis conocidos, enfermedad neuromuscular incurable, atrofia muscular por desuso, daño del nervio motor, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, obesidad sarcopénica, arteriosclerosis con amiotrofia, amiotrofia asociada con enfermedad vascular cerebral, amiotrofia diabética de tipo I o tipo II, daño muscular y reconstrucción del tejido muscular después de una lesión o tratamiento quirúrgico.

La sarcopenia es una condición patológica de una disminución de la fuerza muscular que conduce a una disminución en el rendimiento de locomoción y finalmente amiotrofia, debido al envejecimiento. Aunque la causa es desconocida, la progresión de las condiciones patológicas resulta en defectos funcionales y morfológicos en las sinapsis neuromusculares (una unión entre una neurona y un músculo). Se ha revelado a partir de experimentos de ratones envejecidos que la estructura de las sinapsis neuromusculares se mejora por la restricción calórica y el ejercicio (Valdez G, Tapia JC, Kang H, y col. *PNAS* 2010; 107: 14863-14868).

En miastenia gravis, un defecto morfológico en las sinapsis neuromusculares y una disminución de la neurotransmisión ocurren debido a un autoanticuerpo contra una sinapsis neuromuscular, y se producen una disminución de la fuerza muscular y amiotrofia. Se han descubierto un receptor de la acetilcolina (AChR), MuSK y LRP4 como autoanticuerpos que causan miastenia gravis, pero la miastenia gravis aún sigue siendo inexplicable.

Las enfermedades neuromusculares incurables incluyen enfermedades de la neurona motora (incluyendo esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal y atrofia muscular espinal y bulbar), polimiositis, síndrome de Guillain-Barré, miastenia congénita, distrofia muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina y miopatía de almacenamiento de lípidos. Las causas de estas enfermedades en las que se desarrolla la amiotrofia son diferentes, pero en el proceso que conduce a la amiotrofia, los defectos funcionales y morfológicos en las sinapsis neuromusculares resultan en una atenuación de la neurotransmisión y se produce un empeoramiento en una disminución de la fuerza muscular y la amiotrofia.

La atrofia muscular por desuso es una amiotrofia acompañada por defectos funcionales y morfológicos en las sinapsis, causada por un tratamiento a largo plazo en un lecho de enfermo o inmovilización con yeso. Se reveló que las sinapsis neuroesqueléticas se mantuvieron por señales recíprocas de transmisión de los terminales muscular y neuronas motoras (Yumoto N, Kim N, Burden SJ. *Nature* 2012; 489:438-442). En las personas sanas, la plasticidad de las sinapsis se mantiene, y la función y estructura de las sinapsis puede ser restaurada por la capacidad de regeneración de las sinapsis. Se reveló, utilizando ratas sanas, que una disminución en la estructura sináptica se indujo por ejercicio insuficiente (Deschenes MR, Tenny KA, Wilson MH. *Neuroscience* 2006; 137:1277-1283).

La expresión "amiotrofia leve o moderada", como se utiliza en la presente memoria, significa el estado en el que se observa un defecto funcional de sinapsis neuroesquelética (por ejemplo, una disminución de la transmisión de señales), pero se mantiene la reactividad del músculo esquelético (por ejemplo, la regeneración o mantenimiento de sinapsis neuromuscular).

La expresión "amiotrofia severa", como se utiliza en la presente memoria, significa el estado en el que se pierde la función de las sinapsis neuroesqueléticas y se pierde la reactividad del músculo esquelético.

Efectos ventajosos de la invención

Según la presente invención, se puede proporcionar un nuevo biomarcador para el diagnóstico de envejecimiento o amiotrofia.

Según el biomarcador de la presente invención, un procedimiento para determinar el estado de envejecimiento o amiotrofia, un procedimiento para determinar la eficacia de los efectos terapéuticos o preventivos (por ejemplo, una terapia de medicamentos, una terapia de ejercicio o una terapia nutricional) sobre el envejecimiento o amiotrofia, y un procedimiento de identificación sistemática de un agente terapéutico o preventivo para el envejecimiento o la amiotrofia.

Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] La Fig. 1 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos mediante la medición de los niveles de expresión de ARNm de una MuSK secretada y una MuSK de tipo receptor en músculos esqueléticos de ratones C57BL/6 de 6 meses de vida, ratones de 6 meses de vida después de 11 días de inmovilización con yeso, ratones de 6 meses vida después de 11 días de la escisión del nervio ciático y ratones de edad avanzada de 29 meses de vida.

[Fig. 2] La Fig. 2 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos por la medición de la cantidad de una proteína MuSK libre contenida en sueros de ratón de ratones 8 meses de vida (control), ratones viejos de 20 meses de vida, ratones viejos de 27 meses de vida, ratones viejos de 32 meses de vida y ratones de 6 meses de vida después de 11 días de la escisión del nervio ciático.

[Fig. 3] La Fig. 3 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos por la medición de la cantidad de una

proteína MuSK libre contenida en sueros de pacientes recogidos de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA, N = 8) y pacientes con miastenia gravis (MG, N = 3).

[Fig. 4] La Fig. 4 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos por la medición de la cantidad de una proteína MuSK libre contenida en el suero de los modelos de ratones de tipo silvestre (control) y ratones con ELA (G93A-SOD1), antes de la aparición (4 semanas de vida, 6 semanas de vida, 8 semanas de vida y 10 semanas de vida).

[Fig. 5] La Fig. 5 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos por la medición de la cantidad de una proteína MuSK libre contenida en el suero de los modelos de ratones de tipo silvestre (control) y ratones con ELA (G93A-SOD1), con las 10 semanas de vida, 14 semanas de vida, 18 semanas de vida, y en el momento de la muerte.

[Fig. 6] La Fig. 6 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos por la medición de la cantidad de una proteína MuSK libre contenida en el suero de los modelos de ratones de tipo silvestre (control) y ratones (EAMG) con miastenia gravis (MG), de 6 semanas de vida a 8 semanas de vida.

[Fig. 7] La Fig. 7 es una fotografía, en lugar de dibujos, que muestra los resultados de transferencia Western (anticuerpo monoclonal de ratón anti-MuSK de conejo) de un inmunoprecipitado obtenido al exponer un suero recogido a partir de modelos de ratón con ELA con un fraccionamiento por sulfato de amonio, seguido al llevar a cabo la inmunoprecipitación utilizando anticuerpos monoclonales dirigido contra el dominio extracelular anti-MuSK de ratón.

[Fig. 8] La Fig. 8 es una fotografía, en lugar de dibujos, que muestra los resultados de transferencia Western (anticuerpo monoclonal de ratón anti-MuSK de conejo) de una fracción purificada obtenida al exponer un sobrenadante de cultivos de una estirpe celular C2C12 de mioblastos cultivados de ratón con un fraccionamiento por sulfato de amonio, seguido al llevar a cabo la purificación utilizando una columna de anticuerpos anti-MuSK de ratón.

[Fig. 9] La Fig. 9 es una fotografía, en lugar de dibujos, que muestra los resultados de tinción CBB de la fracción purificada obtenida al exponer un sobrenadante de cultivos de una estirpe celular C2C12 de mioblastos cultivados de ratón con un fraccionamiento por sulfato de amonio, seguido al llevar a cabo la purificación utilizando una columna de anticuerpos anti-MuSK de ratón.

[Fig. 10] La Fig. 10 muestra esquemáticamente los resultados de una comparación de secuencias de aminoácidos obtenidas mediante el análisis de bandas 1-5 (una región de 85 kDa a 50 kDa) mostradas en la Fig. 9 por LC-MS/MS, con la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11) de un dominio extracelular de una proteína MuSK de tipo receptor de ratón.

[Fig. 11] La Fig. 11 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos por la medición de la cantidad de una proteína MuSK libre contenida en un sobrenadante de cultivos, tras cultivar la estirpe celular C2C12 de mioblastos cultivados de ratón en presencia de GM6001, un inhibidor de ADAM.

[Fig. 12] La Fig. 12 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos por un cultivo de estirpe celular C2C12 de mioblastos cultivados de ratón en presencia de GM6001, un inhibidor de ADAM, seguido por la realización de la tinción del agrupamiento del receptor de la acetilcolina (AChR).

Descripción de realizaciones

(1) Biomarcador y procedimiento de determinación del estado de envejecimiento o amiotrofia, y procedimiento de determinación de la eficacia de los efectos terapéuticos o preventivos sobre el envejecimiento o la amiotrofia de la presente invención.

Una proteína MuSK secretada (quinasa específica de músculo), o un producto génico (ARNm) de la misma se utiliza como biomarcador en la presente invención. La proteína MuSK incluye una proteína MuSK de tipo receptor, cuya función ha sido bien analizada, y una proteína MuSK secretada, cuya función se desconoce en el cuerpo vivo. La proteína MuSK secretada, o una proteína MuSK que está presente en un estado libre en los fluidos corporales, tales como sangre, se utiliza en la presente invención.

La proteína MuSK de tipo receptor es una tirosina quinasa, que se expresa en el lado muscular (es decir, la membrana postsináptica) de las sinapsis neuromusculares (Valenzuela DM, Stitt TN, DiStefano PS, y col. *Neuron* 1995; 15: 573-84., y Ganju P, Walls E, Brennan J, Reith AD. *Oncogene* 1995; 11: 281-90), y una proteína funcional esencial para la formación de sinapsis neuromusculares (DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, y col. *Cell* 1996; 85: 501-12). La agrina, que es un proteoglicano de sulfato de heparina liberado de las terminaciones nerviosas motoras, se une a Lrp4 (proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR)), que se expresa en la membrana postsináptica, para activar MuSK (Zhang B, Luo S, Wang Q, Suzuki T, Xiong WC, Mei L. *Neuron* 2008; 60: 285-97). La señalización de la agrina-Lrp4-MuSK desempeña un papel importante en el mantenimiento de las sinapsis neuromusculares.

Por otra parte, la proteína MuSK secretada es una tirosina quinasa, que se genera por una transcripción que pasa a través de una señal de corte y empalme en un exón aguas arriba de su dominio de unión a membrana. La secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de una MuSK secretada de ratón se notificaron por el presente inventor y sus compañeros (GenBank: AY360453.1), pero la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 1) y las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NOS: 2 y 12) de MuSK secretada humana se han descubierto ahora por vez primera. Aunque la función de la MuSK secretada en el cuerpo vivo es desconocida, el presente inventor y sus compañeros notificaron que la miastenia gravis es causada por la inmunización de un ratón con MuSK

secretada de ratón (Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, y col. *J Clin Invest* 2006; 116: 1016-24).

La expresión "proteína MuSK secretada", como se utiliza en la presente memoria, significa en un sentido estricto, una proteína MuSK de tipo no receptor que se genera por una transcripción que pasa a través de una señal de corte y empalme en un exón aguas arriba del dominio de unión a membrana, y significa, en un sentido amplio, una proteína MuSK que está presente en un estado libre en fluidos corporales (por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, orina, ascitis, derrame pleural, o similares, en particular, sangre). Ejemplos de la proteína MuSK que está presente en un estado libre en los fluidos corporales incluyen la proteína MuSK secretada (en un sentido estricto), y una proteína (una proteína MuSK truncada) que consiste en una porción del dominio extracelular (o su fragmento parcial), que se genera mediante la escisión de la proteína MuSK de tipo receptor en el dominio extracelular y en el dominio de unión a membrana, por un mecanismo en el cuerpo vivo (por ejemplo, por escisión enzimática *in vivo*). En la presente invención, la proteína MuSK secretada (en un sentido estricto) puede ser utilizada como biomarcador en una realización, y la proteína MuSK secretada (en un sentido estricto) puede ser utilizada como biomarcador en otra realización. La proteína MuSK secretada (en un sentido estricto) se refiere a veces y simplemente como "la proteína MuSK secretada". La proteína MuSK secretada (en un sentido amplio) se refiere en ocasiones como "la proteína MuSK que está presente en un estado libre", o se refiere a veces y simplemente como "la proteína MuSK libre".

La proteína MuSK secretada (en un sentido estricto) se puede analizar utilizando un anticuerpo que reconoce una secuencia parcial en el lado C-terminal específico para la proteína MuSK secretada (por ejemplo, los aminoácidos 452-464 de la SEQ ID NO: 2 (humano), los aminoácidos 374-386 de la SEQ ID NO: 12 (humano), o los aminoácidos 452-464 de la SEQ ID NO: 4 (ratón)).

La proteína MuSK secretada (en un sentido amplio) se puede analizar utilizando un anticuerpo que reconoce una secuencia común a la proteína MuSK de tipo receptor y a la proteína MuSK secretada (por ejemplo, los aminoácidos 1-451 de la SEQ ID NO: 2 (humano), los aminoácidos 1-373 de la SEQ ID NO: 12 (humano), o los aminoácidos 1-451 de la SEQ ID NO: 4 (ratón)), en el dominio extracelular.

El biomarcador de la presente invención se puede utilizar como un biomarcador para la determinación del estado de envejecimiento o amiotrofia. La "determinación del estado de envejecimiento o amiotrofia", como se utiliza en la presente memoria, incluye, por ejemplo, una determinación del grado de envejecimiento, un diagnóstico precoz de la amiotrofia, una detección de la amiotrofia severa, una medición de la cantidad producida de un autoantígeno (MuSK secretada o MuSK de tipo receptor, MuSK particularmente secretada), una diferenciación de una enfermedad específica (por ejemplo, una diferenciación entre esclerosis lateral amiotrófica y miastenia gravis), y similares.

En la presente invención, como se muestra en el Ejemplo 3 descrito a continuación, el ARNm para MuSK de tipo receptor y el ARNm para MuSK secretada se expresan en el músculo esquelético. Considerando que la expresión del ARNm de la MuSK de tipo receptor no se ve afectada por el envejecimiento, la expresión de ARNm de la MuSK secretada aumenta debido al envejecimiento, y por lo tanto, el ARNm para MuSK secretada puede ser utilizado como un biomarcador para el envejecimiento. Además, como se muestra en el mismo Ejemplo, en la fase temprana de la amiotrofia causada por escisión del nervio o inmovilización con yeso, tanto el ARNm para MuSK de tipo receptor como el ARNm para MuSK secretada aumentan en el músculo esquelético, y por lo tanto, estos ARNm se pueden utilizar como un biomarcador para el diagnóstico precoz de la amiotrofia.

Como se muestra en el Ejemplo 4, la proteína MuSK secretada, es decir, la MuSK libre, se expresa en la sangre, y la cantidad de la proteína MuSK secretada aumenta debido al envejecimiento, y por lo tanto, la proteína MuSK secretada puede ser utilizada como un biomarcador para el envejecimiento. Además, como se muestra en el mismo Ejemplo, en la fase temprana de la amiotrofia causada por escisión del nervio, la cantidad de la proteína MuSK secretada aumenta en la sangre, y por lo tanto, la proteína MuSK secretada puede ser utilizada como un biomarcador para el diagnóstico precoz de la amiotrofia.

Es decir, en la presente invención, cuando la cantidad de la proteína MuSK secretada, es decir, la cantidad de la proteína MuSK libre, o el nivel de expresión del ARNm para la MuSK secretada (es decir, el ARNm para la MuSK de tipo no receptor; en lo sucesivo lo mismo a menos que se especifique lo contrario) muestra un valor alto, en comparación con las personas sanas o condiciones saludables, puede suponerse que el envejecimiento está en curso, que los defectos funcionales en las sinapsis neuromusculares están en curso, y que la amiotrofia está en curso.

Además, cuando, después de llevar a cabo una prevención o tratamiento para el envejecimiento o la amiotrofia (por ejemplo, una terapia de medicamentos, una terapia de ejercicios o una terapia nutricional), la cantidad de la proteína MuSK secretada, es decir, la cantidad de la proteína MuSK libre, o el nivel de expresión de ARNm para la MuSK secretada se reduce, en comparación con el mismo antes de la prevención o tratamiento, puede suponerse que sus efectos terapéuticos o preventivos son válidos (en el caso de un terapia de medicamentos, el fármaco es válido).

Más particularmente, con respecto a un sujeto sospechoso de la progresión de la amiotrofia o similares, el valor medio y el umbral se determinan de antemano a partir de valores medidos obtenidos de una población de personas sanas que muestran condiciones similares (por ejemplo, raza, sexo, edad, físico (en particular, masa

músculoesquelética), historial de ejercicio, historial médico o similares) con el sujeto, y el valor medido del sujeto se compara con el umbral para llevar a cabo el juicio.

5 Alternativamente, con respecto a un sujeto sospechoso de la progresión de amiotrofia o similares, los valores medidos en condiciones saludables en la fase adolescente a la fase media-adulto o en fases arbitrarias (o la fase temprana de la amiotrofia o similares) del sujeto se obtienen de antemano, y además, los valores medidos se obtienen regularmente y repetidamente a intervalos predeterminados (por ejemplo, a intervalos de dos semanas a un año), y se comparan con los valores medidos en condiciones saludables para llevar a cabo el juicio.

10 Por ejemplo, con respecto al valor medio de las personas sanas, o con respecto a los valores medidos del sujeto en condiciones saludables (o en la fase temprana de la amiotrofia o similares), cuando el valor medido del sujeto en el juicio es, por ejemplo, al menos 1,2 veces mayor, al menos 1,4 veces mayor en una realización, y al menos 1,5 veces mayor en otra realización, puede suponerse que el valor medido es alto.

Además, en la presente invención, la proteína MuSK secretada, es decir, la proteína MuSK libre, o el ARNm para MuSK secretada se puede utilizar como un biomarcador para la amiotrofia severa (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica, en particular, la fase final de aparición en un ser humano).

15 Más particularmente, cuando la cantidad de la proteína MuSK secretada, es decir, la cantidad de la proteína MuSK libre, o el nivel de expresión del ARNm para la MuSK secretada muestra un valor notablemente bajo, en comparación con las personas sanas o condiciones saludables (o la fase temprana de la amiotrofia o similares), o no aumenta en absoluto, incluso cuando las mediciones se llevan repetidamente a cabo a intervalos predeterminados (por ejemplo, a intervalos de dos semanas a un año), se puede suponer que ha progresado a amiotrofia severa.

20 Además, cuando, después de llevar a cabo una prevención (prevención de la progresión) o tratamiento para la amiotrofia severa, la cantidad de la proteína MuSK secretada, es decir, la cantidad de la proteína MuSK libre, o el nivel de expresión del ARNm para la MuSK secretada aumenta, en comparación con el mismo antes de la prevención o el tratamiento, se puede suponer que sus efectos terapéuticos o preventivos son válidos (en el caso de una terapia de medicamentos, el fármaco es válido).

25 Por ejemplo, con respecto al valor medio de las personas sanas, o con respecto a los valores medidos del sujeto en condiciones saludables (o en la fase temprana de la amiotrofia o similares), cuando el valor medido del sujeto en el juicio es, por ejemplo, 1/2 o menos, 1/4 o menos en una realización, 1/6 o menos en otra realización, y 1/10 o menos en otra realización, se puede suponer que el valor medido es notablemente bajo.

30 Alternativamente, cuando la concentración de la proteína MuSK secretada (es decir, la proteína MuSK libre) en un suero humano es, por ejemplo, 1 ng/ml o menos, 0,5 ng/ml o menos en una realización, 0,1 ng/ml o menos en otra realización, y 0,05 ng/ml o menos en otra realización, se puede suponer que el valor medido es notablemente bajo.

35 Además, en la presente invención, la cantidad de un autoantígeno producido en la sangre o en el músculo esquelético en anticuerpos anti-MuSK positivos para miastenia gravis puede determinarse mediante la medición de la proteína MuSK secretada, es decir, la proteína MuSK libre, o el ARNm para MuSK secretada. Con respecto a un paciente con anticuerpos anti-MuSK positivos para miastenia gravis, la eficacia de una terapia puede evaluarse por la detección de la cantidad de un autoantígeno producido. Además, con respecto a un sujeto con un alto riesgo de desarrollar un futuro anticuerpo anti-MuSK positivo para miastenia gravis, o un paciente con otras enfermedades autoinmunes, la eficacia de un procedimiento preventivo o terapéutico para el anticuerpo anti-MuSK positivo para miastenia gravis puede evaluarse por la medición de la cantidad de expresión de MuSK en sangre o en el músculo esquelético.

40 Además, en la presente invención, la proteína MuSK secretada, es decir, la proteína MuSK libre, o el ARNm para MuSK secretada se puede utilizar como un biomarcador para una diferenciación entre la esclerosis lateral amiotrófica y la miastenia gravis.

45 Más particularmente, cuando la cantidad de la proteína MuSK secretada, es decir, la cantidad de la proteína MuSK libre, o el nivel de expresión del ARNm para la MuSK secretada muestra un valor notablemente bajo, en comparación con las personas sanas o condiciones saludables, puede considerarse como esclerosis lateral amiotrófica, y cuando se muestra un valor notablemente alto, puede considerarse como miastenia gravis (en particular, anticuerpo anti-receptor de la acetilcolina (AChR) positivo para miastenia gravis).

50 La cantidad de la proteína MuSK secretada (es decir, la proteína MuSK libre) en sangre se puede medir por un procedimiento de análisis de proteínas conocido, por ejemplo, se puede utilizar un procedimiento de análisis inmunológico utilizando un anticuerpo (por ejemplo, un procedimiento de ELISA, un procedimiento de aglutinación de látex, o transferencia Western), un procedimiento bioquímico, tal como electroforesis, un procedimiento de espectrometría de masas, o similar, y un analizador automático para el ensayo clínico. Como una muestra de sangre, se puede utilizar por ejemplo, un suero, plasma, sangre entera, o similares.

55 La cantidad de ARNm para MuSK secretada en el músculo esquelético se puede medir por un procedimiento de análisis de ARNm conocido, por ejemplo, un procedimiento de PCR utilizando cebadores de PCR (por ejemplo, un

procedimiento de PCR en tiempo real, o un procedimiento de RT-PCR), un procedimiento de hibridación que utiliza una sonda de ácido nucleico (por ejemplo, transferencia de Northern), o similares. Como una muestra de músculo esquelético, se puede utilizar por ejemplo, una muestra de biopsia de músculo, o similares.

5 Como se ha descrito anteriormente, la presente invención se basa en nuevos hallazgos, que son contradictorios a primera vista, en la que la cantidad de la proteína MuSK secretada (es decir, la cantidad de la proteína MuSK libre), o el nivel de expresión del ARNm para la MuSK secretada se aumenta en la fase temprana de la amiotrofia, o en la fase leve o moderada de la misma, en comparación con las personas sanas o condiciones saludables (en particular, la fase de la adolescencia a la fase media-adulto) o antes de la aparición de la amiotrofia, o similares, mientras que la cantidad de la proteína MuSK secretada o el nivel de expresión de ARNm se reduce notablemente (esencialmente desaparece) en una fase en la que la amiotrofia ha progresado severamente (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica, en particular, la fase final de aparición en un ser humano), en comparación con las personas sanas o condiciones saludables, o el nivel en la fase temprana de la amiotrofia o similares.

15 Con respecto a la razón por la cual la proteína MuSK secretada, es decir, la proteína MuSK libre, puede ser utilizada como un biomarcador para el diagnóstico precoz de la función de las sinapsis neuromusculares, o amiotrofia, o como un biomarcador para el diagnóstico de la amiotrofia severa, el inventor ha considerado el siguiente mecanismo de acción. Mientras que la proteína MuSK de tipo receptor es esencial para la formación y el mantenimiento funcional del lado muscular (es decir, la membrana postsináptica) de las sinapsis neuromusculares, el inventor asume que la proteína MuSK secretada desempeña un papel en la formación y el mantenimiento funcional del lado neural (es decir, la membrana presináptica) de las sinapsis neuromusculares, como una señal retrógrada. Según la hipótesis, se considera que, incluso en condiciones saludables, una cantidad requerida de la proteína MuSK secretada se expresa (expresión constitutiva) con el fin de mantener la función de las sinapsis neuroesqueléticas, dependiendo de la masa del músculo esquelético. Por otra parte, se considera que, cuando se producen defectos funcionales en las sinapsis neuromusculares, la proteína MuSK secretada aumenta (expresión inducida compensatoria), dependiendo del grado de no actividad de las sinapsis neuromusculares, con el fin de compensar la cantidad y la función del músculo esquelético. Es decir, se considera que, dado que la cantidad de expresión de la proteína MuSK secretada, como una señal retrógrada, aumenta con el fin de mantener la función de las sinapsis neuromusculares, en el momento de la progresión de la amiotrofia, puede utilizarse como un biomarcador de envejecimiento, y como un biomarcador para el diagnóstico precoz de la amiotrofia. Además, en una fase en la que las neuronas motoras desaparecen y la amiotrofia ha progresado severamente (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica), a diferencia del caso de la miastenia gravis, se considera que la proteína MuSK secretada en la sangre se reduce notablemente, puesto que tanto la expresión constitutiva como la expresión inducida compensatoria desaparecen.

En relación con esto, el mecanismo anterior de acción es una suposición del inventor en la presente fase, y la presente invención no se limita al mecanismo de acción.

35 (2) Procedimiento de identificación sistemática para el agente terapéutico o preventivo para el envejecimiento o la amiotrofia.

El biomarcador de la presente invención se puede utilizar en la identificación sistemática de un agente terapéutico o preventivo para el envejecimiento o la amiotrofia.

El procedimiento de identificación sistemática de la presente invención comprende las etapas que consisten en:

40 administrar una sustancia de ensayo en un modelo animal de envejecimiento o amiotrofia, o una estirpe celular del modelo animal (una etapa de administración);
 medir la cantidad de una proteína MuSK secretada (es decir, la cantidad de una proteína MuSK libre), o el nivel de expresión de un ARNm para la proteína MuSK secretada, en una muestra obtenida a partir del modelo animal, o un sobrenadante de cultivos de la estirpe celular (una etapa de medición); y
 45 seleccionar un candidato (una etapa de selección). Si se desea, el procedimiento de identificación sistemática de la presente invención puede comprender además la etapa que consiste en confirmar los efectos terapéuticos o preventivos del candidato seleccionado sobre el envejecimiento o la amiotrofia, utilizando otro sistema de evaluación (una etapa de confirmación).

50 El procedimiento de identificación sistemática de la presente invención puede comprender, en lugar de la etapa de medición, la etapa que consiste en analizar un agrupamiento del receptor de la acetilcolina (AChR) en la estirpe celular después de la administración de una sustancia de ensayo (una etapa de análisis). En relación con esto, tanto la etapa de medición como la etapa de análisis pueden llevarse a cabo para seleccionar un candidato para el juicio integral, en el procedimiento de identificación sistemática de la presente invención.

Además, la etapa de análisis puede ser utilizada como un sistema de evaluación en la etapa de confirmación.

55 Al igual que el modelo animal utilizado en la etapa de administración, se puede utilizar por ejemplo, un modelo animal envejecido naturalmente, un modelo animal envejecido artificialmente, o un modelo animal en el que se desarrolla la amiotrofia.

5 Ejemplos de estos modelos animales incluyen sarcopenia, miastenia gravis (incluyendo anticuerpo anti-MuSK positivo para miastenia gravis, anticuerpos anti-receptor de la acetilcolina (AChR) positivos para miastenia gravis, anticuerpo anti-LRP4 (proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) positivo para miastenia gravis, y autoanticuerpo negativo para miastenia gravis conocido, enfermedad neuromuscular incurable (enfermedades de neuronas motoras (incluyendo esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, y atrofia muscular espinal y bulbar), polimiositis, síndrome de Guillain-Barré, miastenia congénita, distrofia muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, y miopatía de almacenamiento de lípidos), atrofia muscular por desuso, daño del nervio motor, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, obesidad sarcopénica, arteriosclerosis con amiotrofia, amiotrofia asociada con la enfermedad vascular cerebral, amiotrofia diabética de tipo I o tipo II, daño muscular, y reconstrucción de tejido muscular después de una lesión o tratamiento quirúrgico.

15 Al igual que se utiliza la estirpe celular de un modelo animal en la etapa de administración, por ejemplo, se puede utilizar una célula cultivada primaria aislada a partir del modelo animal, una célula cultivada en pases obtenida haciendo pases de la célula cultivada primaria, una célula cultivada establecida obtenida mediante inmortalización, o similares. En particular, cuando la estirpe celular es una célula madre muscular inmortalizada o mioblastos, no es necesario aislar una célula madre muscular o mioblastos a partir de un modelo animal para cada experimento, y por lo tanto, el procedimiento de identificación sistemática de la presente invención se puede llevar a cabo de manera eficiente.

20 La célula madre muscular (células satélite) se puede diferenciar en un mioblasto, y puede diferenciarse adicionalmente en una célula miotubo (célula de fibra muscular). La célula madre muscular y el mioblasto pueden proliferar, y la célula miotubo (célula de fibra muscular) es un policariocito generado por una fusión de numerosos mioblastos.

25 La célula madre muscular inmortalizada se puede preparar, por ejemplo, mediante el acoplamiento de un modelo de ratón con un immortmouse que tiene un promotor H-2Kb inducido por IFN- γ y un antígeno T grande de SV40 sensible a la temperatura. En el immortmouse, el antígeno T grande de SV40 se expresa por IFN- γ , y se induce la inmortalización celular.

30 Más en particular, un modelo de ratón está acoplado con un immortmouse para obtener descendencia, y las células madre musculares se separan de la descendencia. Las células madre musculares separadas se cultivan a 33 °C en presencia de 10 ng/ml de IFN- γ para descomponer el antígeno T grande de SV40 sensible a la temperatura, y puede obtenerse la célula madre muscular inmortalizada.

35 La inducción de la diferenciación de la célula madre muscular a los mioblastos y la célula miotubo muscular no está particularmente limitada, pero la diferenciación puede ser inducida, por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos descritos a continuación. Más particularmente, las células madre muscular se subcultivan en un medio de cultivo celular suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), y la diferenciación en los mioblastos se induce mediante el cultivo de las células en un medio suplementado con 2,5 % de suero de caballo (SC), en lugar de SFB, en el momento de la inducción de la diferenciación. Además, los mioblastos pueden ser inducidos a la diferenciación en las células miotubos (células de fibra muscular) subcultivándolos en las mismas condiciones.

40 Al igual que pueden utilizarse estirpes celulares en la presente invención, los ejemplos de estirpes celulares capaces de inducir la diferenciación a partir de mioblastos a la célula miotubo incluyen una estirpe celular C2C12 de mioblastos derivada de ratón, y una estirpe celular L6 de mioblastos derivada de rata. Además, se pueden utilizar mioblastos en cultivo primario, que se recogen a partir de músculo esquelético de un paciente, o una estirpe celular de mioblastos obtenida por inducción de la diferenciación de las células madre mesenquimales, células ME o células iPS.

45 En el modelo animal envejecido, el modelo animal en el que se desarrolla la amiotrofia leve o moderada, o las estirpes celulares de las mismas, entre los modelos animales mencionados anteriormente, se espera que la cantidad de la proteína MuSK secretada, es decir, la cantidad de la proteína MuSK libre, o el nivel de expresión del ARNm para la MuSK secretada aumenta, y que el agrupamiento del receptor de la acetilcolina (AChR) se reduce. En la etapa de medición y la etapa de selección, la cantidad de la proteína MuSK secretada, es decir, la cantidad de la proteína MuSK libre, o el nivel de expresión del ARNm para la MuSK secretada contenida en una muestra recogida de un modelo animal para el que se administra una sustancia de ensayo, o se mide un sobrenadante de cultivos de una estirpe celular, y el valor medido se compara con el valor antes de la administración de la sustancia de ensayo (o un control al que no se administra la sustancia de ensayo) para seleccionar, como un candidato para un agente terapéutico o preventivo para el envejecimiento o la amiotrofia, una sustancia de ensayo en la que se reduce la cantidad de la proteína MuSK libre, es decir, la cantidad de proteína MuSK o el nivel de expresión del ARNm para la MuSK secretada. En la etapa de análisis y la etapa de selección, el agrupamiento de AChR se analiza en una estirpe celular a la que se administra una sustancia de ensayo, y el agrupamiento de AChR se compara con el agrupamiento antes de la administración de la sustancia de ensayo (o un control al que la sustancia de ensayo no se administra) para seleccionar, como un candidato para un agente terapéutico o preventivo para el envejecimiento o la amiotrofia, una sustancia de ensayo en la que aumenta el agrupamiento de AChR.

Con respecto al candidato seleccionado, los efectos terapéuticos o preventivos sobre el envejecimiento o la amiotrofia se confirman utilizando otro sistema de evaluación, por ejemplo, un modelo animal que no se utiliza en la etapa de administración entre los modelos animales mencionados anteriormente, o un sistema de evaluación cercano a los seres humanos, en la etapa de confirmación, que se puede llevar a cabo opcionalmente y, a continuación, un candidato prometedor se somete a la siguiente fase de desarrollo.

Al igual que las sustancias de ensayo, que se someten al procedimiento de identificación sistemática de la presente invención, se pueden utilizar por ejemplo, diversos compuestos conocidos (incluyendo péptidos) registrados en archivos químicos, compuestos obtenidos mediante técnicas de química combinatoria (*Tetrahedron*, 51, 8135-8137, 1995), o péptidos aleatorios preparados mediante la aplicación de un procedimiento de expresión en fagos (*J. Mol. Biol.*, 222, 301-310, 1991), o similares. Además, los sobrenadantes de cultivo de microorganismos, componentes naturales derivados de plantas u organismos marinos, extractos de tejidos animales, o similares, pueden ser utilizados como muestras de ensayo para la identificación sistemática. Además, pueden utilizarse los compuestos (incluyendo péptidos) obtenidos por modificación química o biológica de compuestos (incluyendo péptidos) seleccionados por el procedimiento de identificación sistemática de la presente invención.

(3) Composición farmacéutica para tratar o prevenir el envejecimiento o la amiotrofia

Un candidato seleccionado por el procedimiento de identificación sistemática de la presente invención, es decir, una sustancia capaz de reducir la cantidad de una proteína MuSK libre, o el nivel de expresión de un ARNm para MuSK secretada, o una sustancia capaz de aumentar el agrupamiento del receptor de la acetilcolina (AChR), puede ser utilizado como el principio activo de una composición farmacéutica para tratar o prevenir el envejecimiento o la amiotrofia (un agente terapéutico o preventivo).

Ejemplos de la sustancia capaz de reducir la cantidad de la proteína MuSK libre, o el nivel de expresión del ARNm para MuSK secretada, como el principio activo de la composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención, incluyen una sustancia para inhibir la escisión de la proteína MuSK de tipo receptor, una sustancia para reducir el nivel de expresión de ARNm para MuSK secretada, o una sustancia para inhibir la activación de una proteasa frente a la proteína MuSK de tipo receptor, o un aumento en el nivel de expresión de los mismos, independientemente de si es o no una sustancia seleccionada por el procedimiento de identificación sistemática de la presente invención.

El principio activo de la composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención es preferentemente una sustancia para reducir la cantidad de la proteína MuSK libre, o el nivel de expresión del ARNm para la MuSK secretada, y el aumento del agrupamiento del receptor de la acetilcolina (AChR).

Ejemplos de la sustancia para inhibir la escisión de la proteína MuSK de tipo receptor incluyen un inhibidor contra ADAM (una desintegrina y metaloproteinasas) (por ejemplo, ADAM 12 o ADAM 19, en particular, ADAM 12).

Ejemplos del inhibidor contra ADAM incluyen GM6001, TAPI-1 {N-(R)-(2-(hidroxiaminocarbonil)metil)-4-metilpentanoil-L-Nal-L-alanina2-aminoetil amida (L-Nal:L-3-(2'naftil)alanina)}, TAPI-2{N-(R)-(2-(hidroxiaminocarbonil)metil)-4-metilpentanoil-L-t-butyl-glicil-L-alanina2-aminoetil amida}, o similares.

Ejemplos de la sustancia para reducir el nivel de expresión del ARNm para la MuSK secretada incluyen agentes epigenéticamente controladores, tales como ARNips, miARN, una enzima de metilación del ADN, un inhibidor de la histona desacetilasa, o similares.

Ejemplos de la sustancia para inhibir la activación de una proteasa frente a la proteína MuSK de tipo receptor, o un aumento en el nivel de expresión de la misma incluyen una sustancia para reducir el nivel de expresión de la proteasa, o una sustancia para reducir la actividad enzimática de la proteasa.

La sustancia para aumentar el agrupamiento del receptor de la acetilcolina (AChR) se puede obtener por el procedimiento de identificación sistemática de la presente invención utilizando un agrupamiento de AChR como indicador.

La formulación de la composición farmacéutica no está particularmente limitada, pero puede ser, por ejemplo, medicamentos orales, tales como polvos, partículas finas, gránulos, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes, extractos o pastillas, o medicamentos parenterales, tales como inyecciones, líquidos para uso externo, ungüentos, supositorios, cremas para aplicación tópica, o lociones oculares.

Los medicamentos orales pueden prepararse por un procedimiento ordinario utilizando, por ejemplo, materiales de relleno, aglutinantes, agentes disgregantes, tensioactivos, lubricantes, potenciadores de la fluidez, agentes diluyentes, conservantes, agentes colorantes, perfumes, agentes saborizantes, estabilizantes, humectantes, antisépticos, antioxidantes o similares, tal como gelatina, alginato de sodio, almidón, almidón de maíz, sacarosa, lactosa, glucosa, manitol, carboximetilcelulosa, dextrina, polivinilpirrolidona, celulosa cristalina, lecitina de soja, sacarosa, ésteres de ácido graso, talco, estearato de magnesio, polietilenglicol, silicato de magnesio, anhídrido silícico, o silicato de aluminio sintético.

La administración parenteral puede ser, por ejemplo, una inyección tal como una inyección subcutánea o

intravenosa, o una administración por el recto. Entre las formulaciones parenterales, se utiliza preferentemente una inyección.

5 Cuando se preparan las inyecciones, se pueden utilizar opcionalmente por ejemplo, disolventes solubles en agua, tales como solución salina fisiológica o solución de Ringer, disolventes insolubles en agua, tales como aceite vegetal o éster de ácido graso, agentes que se vuelven isotónicos, tal como glucosa o cloruro de sodio, agentes solubilizantes, agentes estabilizantes, antisépticos, agentes de suspensión, o agentes emulsionantes, además del principio activo.

10 La composición farmacéutica se puede administrar en forma de una preparación de liberación sostenida que utiliza polímeros de liberación sostenida. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede incorporarse en un pequeño gránulo fabricado de polímeros de vinil acetato de etileno, y el pequeño gránulo se puede implantar quirúrgicamente en un tejido que se va a tratar o a prevenir.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener el principio activo en una cantidad de, pero no se limita en absoluto a, 0,01 a 99 % en peso, preferentemente 0,1 a 80 % en peso.

15 Una dosis de la composición farmacéutica no está limitada particularmente, pero puede determinarse dependiendo de, por ejemplo, el tipo de principio activo, el tipo de enfermedad, la edad, el sexo, el peso corporal o los síntomas del sujeto, un procedimiento de administración, o similares. La composición farmacéutica puede ser administrada oral o parenteralmente.

20 La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar como un medicamento o en diversas formas, por ejemplo, productos comestibles o bebibles, tales como alimentos funcionales o alimentos saludables (incluyendo bebidas) o piensos.

(4) Proteínas y polinucleótidos de la presente invención

La proteína MuSK secretada, que es la proteína de la presente invención, incluye:

25 (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12 (preferentemente una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12); y

(b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12, y que tiene una actividad de la proteína MuSK secretada (en lo sucesivo referida como un "polipéptido homólogo").

30 El número de aminoácidos capaces de ser delecionados, sustituidos, y/o añadidos en el "variación funcionalmente equivalente" es de 1 a varios aminoácidos, preferentemente 1 a 10, más preferentemente 1 a 7, y lo más preferentemente 1 a 5.

La "actividad de la proteína MuSK secretada", como se utiliza en la presente memoria, significa una actividad para formar y mantener funcionalmente el lado neural (es decir, la membrana presináptica) de la sinapsis neuromuscular como una señal retrógrada.

35 El "polipéptido homólogo" es un "proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12, y que tiene una actividad de la proteína MuSK secretada", y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene preferentemente al menos 90 % de identidad, más preferentemente al menos 92 % de identidad, aún más preferentemente al menos 94 % de identidad, aún más preferentemente al menos 95 % de identidad, aún más preferentemente al menos 98 % de identidad, y lo más preferentemente al menos 99 % de identidad, es preferible.

40 El término "identidad", como se utiliza en la presente memoria, significa el valor "Identidad" obtenido por la búsqueda de un programa NEEDLE (*J Mol Biol* 1970; 48: 443-453), utilizando los siguientes parámetros por defecto:

Penalización por espacio = 10
 Penalización por extensión = 0,5
 Matriz = EBLOSUM62

45 El polinucleótido de la presente invención no está particularmente limitado, siempre que codifique la proteína de la presente invención. El polinucleótido puede tener una longitud completa del ADN genómico, o un polinucleótido que consiste en sólo la región traducida, tal como ARNm o ADNc.

50 El vector de la presente invención no está particularmente limitado, con tal de que contenga el polinucleótido de la presente invención. El vector se puede preparar mediante la incorporación del polinucleótido en un vector apropiado capaz de transformar células huésped eucariotas o procariotas. El vector puede contener una secuencia necesaria para la expresión del polipéptido, por ejemplo, un promotor o un potenciador, y puede contener además una secuencia necesaria para la confirmación de la introducción en el huésped, por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos.

La célula transformada de la presente invención se puede preparar mediante la transformación de células huésped apropiadas, tales como células huésped eucariotas o procariotas, con el vector de la presente invención. La célula transformada de la presente invención se puede utilizar en la preparación del polipéptido de la presente invención.

Ejemplos

5 La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente por, pero no se limita en absoluto a, los siguientes Ejemplos.

"Ejemplo 1: Clonación de genes de MuSK secretada de ratón y seres humanos"

10 Un vector lambda ZapII (Stratagene) se utilizó para construir una biblioteca de ADNc derivada de ARNm de estirpe celular C2C12 de mioblastos cultivados de ratón. Una sonda para un gen de ADNc para MuSK humano, que se utilizó en la identificación sistemática, se amplificó a partir de ARN total derivado de músculo de ser humano (Stratagene) por RT-PCR utilizando los siguientes cebadores:

5'GTTCTCCAGAAGGAAGCTTCGTCCTGC-3' (SEQ ID NO: 5)

5'CCGTGCAGCGCAGTAAATGCCATCATC-3' (SEQ ID NO: 6)

15 La sonda obtenida para el gen de ADNc para MuSK humano fue marcada con un isótopo, y múltiples ADNc para MuSK de ratón se aislaron de la biblioteca de ADNc construida previamente para analizar las secuencias génicas. Los ADNc para MuSK aislada incluyeron ADNcs de MuSK de tipo receptor de ratón que tiene un exón que contiene un dominio de unión a membrana y un exón que contiene una región intracelular que codifica una tirosina quinasa, y un clon de ADNc para MuSK de ratón en el que su marco de traducción terminó en el codón de parada sin corte y empalme antes de que un exón contenga una región de unión a membrana (ADNc de MuSK secretada de ratón: 20 SEQ ID NO: 3).

Se analizó adicionalmente la secuencia genómica humana, y se predijo que la misma isoforma de corte y empalme estaba presente. ADNc de MuSK secretada de ser humano (SEQ ID NO: 1) se clonó amplificándolo a partir de ARNm derivados de músculo de humano por RT-PCR utilizando los siguientes cebadores:

5'GGATTAATCATGAGAGAGCT-3' (SEQ ID NO: 7)

25 5'GTAAATTCTCTTAACCTCC-3' (SEQ ID NO: 8)

"Ejemplo 2: Expresión de la proteína MuSK secretada"

30 El ratón clonado y los genes de MuSK secretada de seres humanos se insertaron en un vector de expresión pCDNA3.1-myc-his, y las construcciones génicas se introdujeron en células 293T utilizando Fugene 6 (Roche). Los sobrenadantes de cultivo después de dos días de la introducción se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida SDS al 8 %, y se transfirieron a una membrana de PVDF. Un anticuerpo anti-myc se utilizó como un primer anticuerpo, y las proteínas MuSK secretadas se detectaron utilizando un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano picante (Pierce).

La proteína MuSK secretada humana (SEQ ID NO: 2) se detectó en las posiciones de 68 kDa y 66 kDa, y la proteína MuSK secretada de ratón (SEQ ID NO: 4) se detectó en la posición de 58 kDa.

35 "Ejemplo 3: Análisis del nivel de expresión de genes de MuSK secretada y de tipo receptor en los músculos sóleo de ratón por PCR en tiempo real"

40 Se recogieron los músculos sóleo de ratones C57BL/6 de 6 meses de vida, músculos sóleo después de 11 días de inmovilización con yeso en ambos lados de los ratones con la misma edad en la posición extendida, músculos sóleo después de 11 días de la escisión del nervio ciático de ratones con la misma edad, y músculos sóleo de ratones de edad avanzada de 29 meses de vida, y los ARNm se extrajeron y se purificaron. La determinación comparativa de la MuSK secretada y la MuSK de tipo receptor se llevó a cabo por PCR en tiempo real utilizando un procedimiento de Taqman (ABI).

45 Al igual que el cebador específico de secuencia para MuSK secretada, se utilizó la secuencia en el lado 5': 5'-TGACAAGACTGCCATATTTAGGT-3' (SEQ ID NO: 9), y se utilizó una sonda Taqman (pedido personalizado, ABI) de la secuencia en el lado 3': 5'-CGTTCCTTGACTGGAAACAGTAA-3' (SEQ ID NO: 10).

Para el dominio extracelular de MuSK de tipo receptor, se utilizó una sonda Taqman (Mm00448006_m1, ABI), que corresponde a los exones cuarto y quinto, y se utilizó un cebador Taqman (Mm01346926_m1), que corresponde a los exones decimotercero y decimocuarto del dominio intracelular del tipo receptor.

50 Los resultados se muestran en la Fig. 1. Con respecto al ARNm de la MuSK secretada, la expresión aumentó en la escisión del nervio ciático, la inmovilización con yeso (desuso), y los ratones de edad avanzada con amiotrofia, en comparación con los ratones normales de 6 meses de vida. Por otra parte, el ARNm de la MuSK de tipo receptor no

aumentó en los ratones de edad avanzada.

"Ejemplo 4: Medición de la cantidad de proteína MuSK libre en suero de ratón por el procedimiento de AlphaLISA"

5 Como ratones que se van a medir, se prepararon los ratones de 8 meses de vida (control), los ratones viejos (C57BL/6), incluyendo los ratones de 20 meses de vida, los ratones de 27 meses de vida y los ratones de 32 meses de vida, y los ratones de 6 meses de vida (A/WySnJ) después de 11 días de la escisión del nervio ciático, y muestras de suero (10 % de suero) se utilizaron en la siguiente medición.

10 Se inmunizaron ratones con una proteína secretada que consiste en un dominio extracelular de MuSK recombinante derivada de ratón para preparar anticuerpos monoclonales. Se utilizaron dos tipos de anticuerpos monoclonales (RM-24 y MH-30) para construir un sistema de ensayo según un procedimiento AlphaLISA (Perkin Elmer). MH-30 (IgG2ak) se adsorbió por perlas aceptoras, y RM-24 (IgG2ak) se marcó con biotina. Un antígeno convencional (proteína MuSK recombinante de ratón) se diluyó con un diluyente para el antígeno convencional para preparar una serie de diluciones con 12 etapas en una relación común de 100 ng/ml (la 12ª etapa: un blanco). Se utilizó una placa de 96 pocillos, y se hicieron reaccionar 5 µl del líquido de antígeno (antígeno convencional o 5 % de suero) y 10 µl de 50 µg/ml de líquido de perlas aceptoras por pocillo durante 2 horas, y 10 µl de 15 nmol/l de anticuerpo biotinilado se añadieron y se hicieron reaccionar adicionalmente durante 1 hora. A continuación, se agregaron 25 µl de 80 µg/ml de perlas donadoras adsorbidas por estreptavidina, y después de 30 minutos, la placa se midió utilizando un aparato de medición (Envision; Perkin Elmer).

20 Los resultados se muestran en la Fig. 2. Las cantidades de la proteína MuSK libre en el suero de los ratones de edad avanzada y los ratones escindidos de nervios se incrementaron, en comparación con los ratones normales de 8 meses de edad.

"Ejemplo 5: Medida de la cantidad de proteína MuSK libre en suero humano por el procedimiento de AlphaLISA"

25 Con respecto a los sujetos que se van a medir, el consentimiento informado escrito se obtuvo a partir de septiembre de 2012 a octubre de 2013, con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Geriátrico Metropolitano de Tokio y el Instituto de Gerontología y hospitales cooperadores. Se extrajo sangre de 8 pacientes (4 hombres y 4 mujeres, de 32 años de edad a 78 años de edad) con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y 3 pacientes (2 hombres y 1 mujer, 23 años de edad, a 79 años de edad) con anticuerpo anti-receptor de la acetilcolina (AChR) positivo para miastenia gravis (MG).

30 Se inmunizaron ratones con una proteína secretada que consiste en un dominio extracelular de MuSK recombinante derivada de seres humanos para preparar anticuerpos monoclonales. Se utilizaron dos tipos de anticuerpos monoclonales (MH-58 y MH-64) para construir un sistema de ensayo según un procedimiento de AlphaLISA. MH-64 (IgG2ak) se adsorbió como perlas aceptoras, y MH-58 (IgG2ak) se marcó con biotina. Un antígeno convencional (proteína MuSK de ratón recombinante) se diluyó con un diluyente para un antígeno convencional para preparar una serie de diluciones con 11 etapas en una relación común de 10 ng/ml (la 11ª etapa: un blanco). Se utilizó una placa de 96 pocillos, y se hicieron reaccionar 5 µl del líquido de antígeno (antígeno convencional o 100 % de suero) y 10 µl de 50 µg/ml de líquido de perlas aceptoras por pocillo se hicieron reaccionar durante 2 horas, y 10 µl de 15 nmol/l de anticuerpo biotinilado se añadieron y se hicieron reaccionar adicionalmente durante 1 hora. A continuación, se agregaron 25 µl de 80 µg/ml de perlas donadoras adsorbidas por estreptavidina, y después de 30 minutos, la placa se midió utilizando un aparato de medición (Envision; Perkin Elmer).

Los resultados se muestran en la Fig. 3. En los pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA), en la que se perdió la sinapsis neuroesquelética, y se desarrolló amiotrofia grave, la cantidad de la proteína MuSK libre en un suero se redujo notablemente (esencialmente desapareció).

45 **"Ejemplo 6: Medición de la cantidad de proteína MuSK libre en el suero de ratones con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) por el procedimiento AlphaLISA"**

Al igual que los ratones que se van a medir, se prepararon modelos de ratón de tipo silvestre (C57BL/6) y ratón con ELA. Se midieron las muestras de suero (5 % de suero) de ratones de 4 semanas de vida, ratones de 6 semanas de vida, ratones de 8 semanas de vida, y ratones de 10 semanas de vida (antes de la aparición), ratones de 14 semanas de vida (fase temprana), ratones de 18 semanas de vida (fase final), y ratones en el momento de la muerte, según el procedimiento descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en las Figs. 4 y 5.

55 En los ratones de tipo silvestre, la cantidad de la proteína MuSK libre en un suero no cambió. Sin embargo, en los modelos de ratón con ELA, la cantidad de la proteína MuSK libre en suero aumentó antes de la aparición, y se observó un aumento adicional de acuerdo con el progreso de la enfermedad. En relación con esto, ya que el curso desde la aparición hasta la muerte del modelo de ratón procede muy temprano, muere antes de la fase final de aparición en un ser humano (es decir, el estado en que se desarrolla la amiotrofia severa), y por lo tanto, se considera que este resultado no es contradictorio con el resultado de los pacientes con ELA humanos en el Ejemplo 5.

"Ejemplo 7: Medición de la cantidad de proteína MuSK libre en el suero de los ratones con miastenia gravis (MG) por el procedimiento de AlphaLISA"

5 Al igual que los ratones que se van a medir, se prepararon modelos de ratón de tipo silvestre (C57BL/6) y de ratón MG (EAMG). Las muestras de suero (5 % de suero) de ratones de 6 semanas de vida a 8 semanas de vida, se midieron según el procedimiento descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en la Fig. 6.

En los modelos de ratón MG, se observó un aumento en la cantidad de la proteína MuSK libre en un suero según la aparición.

"Ejemplo 8: Detección de la proteína MuSK libre en el suero de ratones con esclerosis lateral amiotrófica (ELA)"

10 Se recogieron los sueros de modelos de ratón con ELA de 18 semanas de vida a 24 semanas de vida (G93A-SOD1), y 7,7 ml de suero se sometieron a un fraccionamiento por sulfato de amonio (80 % de saturación) para obtener 6,5 ml de un sobrenadante. El sobrenadante se concentró a 1,2 ml, utilizando una unidad de filtro centrífugo (Amicon (marca registrada) Ultra, filtro de 10 KDa; Merck Millipore), y la inmunoprecipitación se llevó a cabo utilizando los anticuerpos monoclonales de ratón preparados en el Ejemplo 4 (RM-24 y MH-30). El precipitado
15 obtenido (denominado en lo sucesivo inmunoprecipitado) se disolvió en 15 µl de un tampón SDS, y la cantidad total (15 µl) se analizó por transferencia Western (anticuerpo monoclonal de ratón anti-MuSK de conejo n.º 2-6).

Para comparación, la proteína secretada que consiste en el dominio extracelular de MuSK recombinante derivada de ratón (proteína MuSK recombinante de ratón, 100 ng), que se utilizó en el Ejemplo 4, se utilizó de forma simultánea en la transferencia Western.

20 Los resultados se muestran en la Fig. 7. En la Fig. 7, el carril 1 muestra el inmunoprecipitado de la proteína secretada que consiste en el dominio extracelular de MuSK recombinante derivada de ratón (100 ng), el carril 2 muestra el inmunoprecipitado del suero de los ratones con ELA, y el carril 3 muestra el inmunoprecipitado de la proteína secretada que consiste en el dominio extracelular de MuSK recombinante derivada de ratón (100 ng).

"Ejemplo 9: Identificación de la proteína MuSK libre secretada en el sobrenadante de la estirpe celular de mioblastos cultivados de ratón"

25 La estirpe celular C2C12 de mioblastos cultivados de ratón se sembró en ocho placas de 10 cm, y se pre-cultivaron en un medio DMEM que contenía 10 % de suero fetal bovino (SFB) durante 3 días. El medio se reemplazó con un medio de diferenciación (un medio DMEM que contenía 2,5 % de suero de caballo (SC)), y cada sobrenadante de cultivo se recogió por sustitución del medio con un medio reciente en el día 1, día 2, día 3 y el día 5 después del
30 comienzo de la inducción de la diferenciación de células miotubos.

A continuación, 300 ml del sobrenadante de cultivo recogido se sometieron a un fraccionamiento por sulfato de amonio (80 % de saturación) para obtener 30 ml de un sobrenadante. El sobrenadante obtenido se purificó utilizando una columna de anticuerpos anti-MuSK de ratón, y finalmente se concentró utilizando una unidad de filtro centrífugo (Amicon (marca registrada) Ultra, filtro de 10 KDa; Merck Millipore).

35 Los resultados de las transferencias Western (anticuerpo monoclonal de ratón anti-MuSK de conejo n.º 2-6) de la fracción purificada obtenida se muestran en la Fig. 8. En la Fig. 8, el carril 1 muestra la fracción purificada derivada de sobrenadante de cultivo de la estirpe celular de mioblastos cultivados de ratón, después de pasar a través de la columna de anticuerpos; y el carril 2 muestra la proteína secretada que consiste en el dominio extracelular de MuSK recombinante derivada de ratón (para comparación).

40 Además, los resultados de tinción CBB de la fracción purificada (y la proteína secretada que consiste en el dominio extracelular de MuSK recombinante derivada de ratón (para comparación)) se muestran en la Fig. 9. Como se muestra en la Fig. 9, el gel correspondiente a una región de 85 kDa a 50 kDa después de la electroforesis se dividió en 5 piezas (bandas 1-5 en la Fig. 9) y se analizaron por LC-MS/MS. Como resultado, como se muestra en la Fig. 10, la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11) se detectó en el dominio extracelular de la proteína MuSK de tipo
45 receptor de ratón en las bandas 2-5, y se confirmó que la fracción purificada era una proteína MuSK libre (una proteína MuSK libre liberada en el sobrenadante del cultivo mediante la escisión de la proteína MuSK de tipo receptor por una proteasa).

"Ejemplo 10: Reducción de la cantidad de proteína MuSK secretada en el sobrenadante del cultivo de la estirpe celular de mioblastos cultivados de ratón por inhibición de ADAM"

50 La estirpe celular C2C12 de mioblastos cultivados de ratón se sembró en placas, y se pre-cultivó en un medio DMEM que contenía 10 % de SFB durante 3 días. El medio se reemplazó con un medio de diferenciación (un medio DMEM que contenía 2,5 % de SC) con cantidades predeterminadas de GM6001, un inhibidor de ADAM (una desintegrina y metaloproteínasa) (Calbiochem, n.º 364206), y se cultivaron adicionalmente durante 22 horas. Después del cultivo, se midió la cantidad de la proteína MuSK libre contenida en cada sobrenadante de cultivo.

Los resultados se muestran en la Fig. 11. Se confirmó que la cantidad de la proteína MuSK libre contenida en el sobrenadante de cultivo se redujo mediante la adición de GM6001. Este resultado indica que al menos parte de la proteína MuSK libre en el sobrenadante de cultivo se deriva de la proteína MuSK de tipo receptor liberada en el sobrenadante del cultivo mediante la escisión por una proteasa.

5 **"Ejemplo 11: Aumento del agrupamiento del receptor de la acetilcolina (AChR) en la estirpe celular muscular cultivada de ratón por un inhibidor ADAM"**

10 GM6001, que se disolvió en DMSO, se diluyó con un medio de diferenciación (un medio DMEM que contenía 2,5 % de SC), y 0,4 ml/pocillo de la solución GM6001 se añadió a las células miotubos C2C12 de ratón, que habían sido diferenciadas durante 3 días en placas de 24 pocillos. Después de 22 horas de cultivo, se recogieron los sobrenadantes de cultivo, y la tinción del agrupamiento de AChR se llevó a cabo mediante el cultivo de las células en un medio de diferenciación que contiene 40 nM de α -bungarotoxina marcada con Alexa 488 durante 1 hora.

Los resultados se muestran en la Fig. 12. El agrupamiento de AChR es un indicador de la sinaptogénesis, y se demostró que la sinaptogénesis fue promovida por un inhibidor de ADAM.

Aplicabilidad industrial

15 El biomarcador de la presente invención se puede utilizar en el diagnóstico del envejecimiento o la amiotrofia.

TEXTO LIBRE EN EL LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NOS: 5 a 10 en el listado de secuencias son secuencias de cebador.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institute of Gerontology

<120> Biomarcador para el diagnóstico de envejecimiento o amiotrofia

25 <130> TMI-961

<150> JP 2014-077086

<151> 03-04-2014

30 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1395

35 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

40 <222> (1)..(1395)

<400> 1

ES 2 665 849 T3

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

ES 2 665 849 T3

atg ggt aat ccc aaa cca tca gtg tct tgg ata aag gga gac agc cct	480
Met Gly Asn Pro Lys Pro Ser Val Ser Trp Ile Lys Gly Asp Ser Pro	
145 150 155 160	
ctc agg gaa aat tcc cga att gca gtt ctt gaa tct ggg agc ttg agg	528
Leu Arg Glu Asn Ser Arg Ile Ala Val Leu Glu Ser Gly Ser Leu Arg	
165 170 175	
att cat aac gta caa aag gaa gat gca gga cag tat cga tgt gtg gca	576
Ile His Asn Val Gln Lys Glu Asp Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Val Ala	
180 185 190	
aaa aac agc ctc ggg aca gca tat tcc aaa gtg gtg aag ctg gaa gtt	624
Lys Asn Ser Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Lys Val Val Lys Leu Glu Val	
195 200 205	
gag gtt ttt gcc agg atc ctg cgg gct cct gaa tcc cac aat gtc acc	672
Glu Val Phe Ala Arg Ile Leu Arg Ala Pro Glu Ser His Asn Val Thr	
210 215 220	
ttt ggc tcc ttt gtg acc ctg cac tgt aca gca aca ggc att cct gtc	720
Phe Gly Ser Phe Val Thr Leu His Cys Thr Ala Thr Gly Ile Pro Val	
225 230 235 240	
ccc acc atc acc tgg att gaa aac gga aat gct gtt tct tct ggg tcc	768
Pro Thr Ile Thr Trp Ile Glu Asn Gly Asn Ala Val Ser Ser Gly Ser	
245 250 255	
att caa gag agt gtg aaa gac cga gtg att gac tca aga ctg cag ctg	816
Ile Gln Glu Ser Val Lys Asp Arg Val Ile Asp Ser Arg Leu Gln Leu	
260 265 270	
ttt atc acc aag cca gga ctc tac aca tgc ata gct acc aat aag cat	864
Phe Ile Thr Lys Pro Gly Leu Tyr Thr Cys Ile Ala Thr Asn Lys His	
275 280 285	
ggg gag aag ttc agt act gcc aag gct gca gcc acc atc agc ata gca	912
Gly Glu Lys Phe Ser Thr Ala Lys Ala Ala Ala Thr Ile Ser Ile Ala	
290 295 300	
gaa tgg agt aaa cca cag aaa gat aac aaa ggc tac tgc gcc cag tac	960
Glu Trp Ser Lys Pro Gln Lys Asp Asn Lys Gly Tyr Cys Ala Gln Tyr	
305 310 315 320	
aga ggg gag gtg tgt aat gca gtc ctg gca aaa gat gct ctt gtt ttt	1008
Arg Gly Glu Val Cys Asn Ala Val Leu Ala Lys Asp Ala Leu Val Phe	
325 330 335	
ctc aac acc tcc tat gcg gac cct gag gag gcc caa gag cta ctg gtc	1056
Leu Asn Thr Ser Tyr Ala Asp Pro Glu Glu Ala Gln Glu Leu Leu Val	
340 345 350	
cac acg gcc tgg aat gaa ctg aaa gta gtg agc cca gtc tgc cgg cca	1104
His Thr Ala Trp Asn Glu Leu Lys Val Val Ser Pro Val Cys Arg Pro	
355 360 365	
gct gct gag gct ttg ttg tgt aac cac atc ttc cag gag tgc agt cct	1152
Ala Ala Glu Ala Leu Leu Cys Asn His Ile Phe Gln Glu Cys Ser Pro	
370 375 380	
gga gta gtg cct act cct att ccc att tgc aga gag tac tgc ttg gca	1200
Gly Val Val Pro Thr Pro Ile Pro Ile Cys Arg Glu Tyr Cys Leu Ala	
385 390 395 400	

ES 2 665 849 T3

```

gta aag gag ctc ttc tgc gca aaa gaa tgg ctg gta atg gaa gag aag      1248
Val Lys Glu Leu Phe Cys Ala Lys Glu Trp Leu Val Met Glu Glu Lys
                                405                                410                                415

acc cac aga gga ctc tac aga tcc gag atg cat ttg ctg tcc gtg oca      1296
Thr His Arg Gly Leu Tyr Arg Ser Glu Met His Leu Leu Ser Val Pro
                                420                                425                                430

gaa tgc agc aag ctt ccc agc atg cat tgg gac ccc acg gcc tgt gcc      1344
Glu Cys Ser Lys Leu Pro Ser Met His Trp Asp Pro Thr Ala Cys Ala
                                435                                440                                445

aga ctg cca cat cta ggt aac aca gag ttc tcc caa gac ttt gga ggt      1392
Arg Leu Pro His Leu Gly Asn Thr Glu Phe Ser Gln Asp Phe Gly Gly
                                450                                455                                460

taa                                                                 1395

```

<210> 2
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 2

5

```

Met Arg Glu Leu Val Asn Ile Pro Leu Val His Ile Leu Thr Leu Val
 1                                5                                10                                15

Ala Phe Ser Gly Thr Glu Lys Leu Pro Lys Ala Pro Val Ile Thr Thr
                                20                                25                                30

Pro Leu Glu Thr Val Asp Ala Leu Val Glu Glu Val Ala Thr Phe Met
                                35                                40                                45

Cys Ala Val Glu Ser Tyr Pro Gln Pro Glu Ile Ser Trp Thr Arg Asn
 50                                55                                60

Lys Ile Leu Ile Lys Leu Phe Asp Thr Arg Tyr Ser Ile Arg Glu Asn
 65                                70                                75                                80

Gly Gln Leu Leu Thr Ile Leu Ser Val Glu Asp Ser Asp Asp Gly Ile
                                85                                90                                95

Tyr Cys Cys Thr Ala Asn Asn Gly Val Gly Gly Ala Val Glu Ser Cys
                                100                                105                                110

Gly Ala Leu Gln Val Lys Met Lys Pro Lys Ile Thr Arg Pro Pro Ile
                                115                                120                                125

Asn Val Lys Ile Ile Glu Gly Leu Lys Ala Val Leu Pro Cys Thr Thr
                                130                                135                                140

```

10

ES 2 665 849 T3

Met Gly Asn Pro Lys Pro Ser Val Ser Trp Ile Lys Gly Asp Ser Pro
145 150 155 160

Leu Arg Glu Asn Ser Arg Ile Ala Val Leu Glu Ser Gly Ser Leu Arg
165 170 175

Ile His Asn Val Gln Lys Glu Asp Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Val Ala
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Lys Val Val Lys Leu Glu Val
195 200 205

Glu Val Phe Ala Arg Ile Leu Arg Ala Pro Glu Ser His Asn Val Thr
210 215 220

Phe Gly Ser Phe Val Thr Leu His Cys Thr Ala Thr Gly Ile Pro Val
225 230 235 240

Pro Thr Ile Thr Trp Ile Glu Asn Gly Asn Ala Val Ser Ser Gly Ser
245 250 255

Ile Gln Glu Ser Val Lys Asp Arg Val Ile Asp Ser Arg Leu Gln Leu
260 265 270

Phe Ile Thr Lys Pro Gly Leu Tyr Thr Cys Ile Ala Thr Asn Lys His
275 280 285

Gly Glu Lys Phe Ser Thr Ala Lys Ala Ala Ala Thr Ile Ser Ile Ala
290 295 300

Glu Trp Ser Lys Pro Gln Lys Asp Asn Lys Gly Tyr Cys Ala Gln Tyr
305 310 315 320

Arg Gly Glu Val Cys Asn Ala Val Leu Ala Lys Asp Ala Leu Val Phe
325 330 335

Leu Asn Thr Ser Tyr Ala Asp Pro Glu Glu Ala Gln Glu Leu Leu Val
340 345 350

His Thr Ala Trp Asn Glu Leu Lys Val Val Ser Pro Val Cys Arg Pro
355 360 365

Ala Ala Glu Ala Leu Leu Cys Asn His Ile Phe Gln Glu Cys Ser Pro
370 375 380

Gly Val Val Pro Thr Pro Ile Pro Ile Cys Arg Glu Tyr Cys Leu Ala
385 390 395 400

ES 2 665 849 T3

Val Lys Glu Leu Phe Cys Ala Lys Glu Trp Leu Val Met Glu Glu Lys
 405 410 415

Thr His Arg Gly Leu Tyr Arg Ser Glu Met His Leu Leu Ser Val Pro
 420 425 430

Glu Cys Ser Lys Leu Pro Ser Met His Trp Asp Pro Thr Ala Cys Ala
 435 440 445

Arg Leu Pro His Leu Gly Asn Thr Glu Phe Ser Gln Asp Phe Gly Gly
 450 455 460

<210> 3
 <211> 1395
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1395)

<400> 3

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

ES 2 665 849 T3

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

ES 2 665 849 T3

```

385                390                395                400
gta aag gag ctc ttc tgt gca aag gaa tgg cag gca atg gaa gga aag      1248
Val Lys Glu Leu Phe Cys Ala Lys Glu Trp Gln Ala Met Glu Gly Lys
                405                410                415

gcc cac cgg ggc ctc tac aga tct ggg atg cat ctc ctt ccg gta cca      1296
Ala His Arg Gly Leu Tyr Arg Ser Gly Met His Leu Leu Pro Val Pro
                420                425                430

gag tgc agc aag ctt ccc agc atg cac cgg gac ccc aca gcc tgc aca      1344
Glu Cys Ser Lys Leu Pro Ser Met His Arg Asp Pro Thr Ala Cys Thr
                435                440                445

aga ctg cca tat tta ggt aac aaa gaa gtt cct cca gac ttt gga agt      1392
Arg Leu Pro Tyr Leu Gly Asn Lys Glu Val Pro Pro Asp Phe Gly Ser
                450                455                460

taa                                                                1395

```

<210> 4
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 4

5

```

Met Arg Glu Leu Val Asn Ile Pro Leu Leu Gln Met Leu Thr Leu Val
1                5                10                15

Ala Phe Ser Gly Thr Glu Lys Leu Pro Lys Ala Pro Val Ile Thr Thr
                20                25                30

Pro Leu Glu Thr Val Asp Ala Leu Val Glu Glu Val Ala Thr Phe Met
                35                40                45

Cys Ala Val Glu Ser Tyr Pro Gln Pro Glu Ile Ser Trp Thr Arg Asn
50                55                60

Lys Ile Leu Ile Lys Leu Phe Asp Thr Arg Tyr Ser Ile Arg Glu Asn
65                70                75                80

Gly Gln Leu Leu Thr Ile Leu Ser Val Glu Asp Ser Asp Asp Gly Ile
                85                90                95

Tyr Cys Cys Ile Ala Asn Asn Gly Val Gly Gly Ala Val Glu Ser Cys
100                105                110

Gly Ala Leu Gln Val Lys Met Lys Pro Lys Ile Thr Arg Pro Pro Ile
115                120                125

Asn Val Lys Ile Ile Glu Gly Leu Lys Ala Val Leu Pro Cys Thr Thr
130                135                140

```

10

ES 2 665 849 T3

Met Gly Asn Pro Lys Pro Ser Val Ser Trp Ile Lys Gly Asp Asn Ala
145 150 155 160

Leu Arg Glu Asn Ser Arg Ile Ala Val Leu Glu Ser Gly Ser Leu Arg
165 170 175

Ile His Asn Val Gln Lys Glu Asp Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Val Ala
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Lys Leu Val Lys Leu Glu Val
195 200 205

Glu Val Phe Ala Arg Ile Leu Arg Ala Pro Glu Ser His Asn Val Thr
210 215 220

Phe Gly Ser Phe Val Thr Leu Arg Cys Thr Ala Ile Gly Ile Pro Val
225 230 235 240

Pro Thr Ile Ser Trp Ile Glu Asn Gly Asn Ala Val Ser Ser Gly Ser
245 250 255

Ile Gln Glu Ser Val Lys Asp Arg Val Ile Asp Ser Arg Leu Gln Leu
260 265 270

Phe Ile Thr Lys Pro Gly Leu Tyr Thr Cys Ile Ala Thr Asn Lys His
275 280 285

Gly Glu Lys Phe Ser Thr Ala Lys Ala Ala Ala Thr Val Ser Ile Ala
290 295 300

Glu Trp Ser Lys Ser Gln Lys Asp Ser Gln Gly Tyr Cys Ala Gln Tyr
305 310 315 320

Arg Gly Glu Val Cys Asp Ala Val Leu Ala Lys Asp Ala Leu Val Phe
325 330 335

Phe Asn Thr Ser Tyr Arg Asp Pro Glu Asp Ala Gln Glu Leu Leu Ile
340 345 350

His Thr Ala Trp Asn Glu Leu Lys Ala Val Ser Pro Leu Cys Arg Pro
355 360 365

Ala Ala Glu Ala Leu Leu Cys Asn His Leu Phe Gln Glu Cys Ser Pro
370 375 380

Gly Val Val Pro Thr Pro Met Pro Ile Cys Arg Glu Tyr Cys Leu Ala
385 390 395 400

ES 2 665 849 T3

Val Lys Glu Leu Phe Cys Ala Lys Glu Trp Gln Ala Met Glu Gly Lys
 405 410 415

Ala His Arg Gly Leu Tyr Arg Ser Gly Met His Leu Leu Pro Val Pro
 420 425 430

Glu Cys Ser Lys Leu Pro Ser Met His Arg Asp Pro Thr Ala Cys Thr
 435 440 445

Arg Leu Pro Tyr Leu Gly Asn Lys Glu Val Pro Pro Asp Phe Gly Ser
 450 455 460

- 5 <210> 5
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
- <400> 5
 gttctccaga aggaactcg tcctgc 26
- 15 <210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
- <400> 6
 ccgtgcagcg cagtaaagtc catcatc 27
- 25 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
- 35 <400> 7
 ggattaatca tgagagagct 20
- 40 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
- <400> 8
 gtaaatttct cttaacctcc 20
- 50 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

5 <400> 9
 tgacaagac tgccatattt aggt 24

<210> 10
 <211> 23
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

15 <400> 10
 cgttcctga ctggaaacag taa 23

<210> 11
 <211> 519
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20

25 <400> 11

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

ES 2 665 849 T3

Pro Glu Asp Ala Gln Glu Leu Leu Ile His Thr Ala Trp Asn Glu Leu
370 375 380

Lys Ala Val Ser Pro Leu Cys Arg Pro Ala Ala Glu Ala Leu Leu Cys
385 390 395 400

Asn His Leu Phe Gln Glu Cys Ser Pro Gly Val Val Pro Thr Pro Met
405 410 415

Pro Ile Cys Arg Glu Tyr Cys Leu Ala Val Lys Glu Leu Phe Cys Ala
420 425 430

Lys Glu Trp Gln Ala Met Glu Gly Lys Ala His Arg Gly Leu Tyr Arg
435 440 445

Ser Gly Met His Leu Leu Pro Val Pro Glu Cys Ser Lys Leu Pro Ser
450 455 460

Met His Arg Asp Pro Thr Ala Cys Thr Arg Leu Pro Tyr Leu Asp Tyr
465 470 475 480

Lys Lys Glu Asn Ile Thr Thr Phe Pro Ser Ile Thr Ser Ser Arg Pro
485 490 495

Ser Ala Asp Ile Pro Asn Leu Pro Ala Ser Thr Ser Ser Phe Ala Val
500 505 510

Ser Pro Ala Tyr Ser Met Thr
515

<210> 12
<211> 386
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 12

Met Arg Glu Leu Val Asn Ile Pro Leu Val His Ile Leu Thr Leu Val
1 5 10 15

Ala Phe Ser Gly Thr Glu Lys Leu Pro Lys Ala Pro Val Ile Thr Thr
20 25 30

Pro Leu Glu Thr Val Asp Ala Leu Val Glu Glu Val Ala Thr Phe Met
35 40 45

Cys Ala Val Glu Ser Tyr Pro Gln Pro Glu Ile Ser Trp Thr Arg Asn
50 55 60

10

ES 2 665 849 T3

Lys Ile Leu Ile Lys Leu Phe Asp Thr Arg Tyr Ser Ile Arg Glu Asn
65 70 75 80

Gly Gln Leu Leu Thr Ile Leu Ser Val Glu Asp Ser Asp Asp Gly Ile
85 90 95

Tyr Cys Cys Thr Ala Asn Asn Gly Val Gly Gly Ala Val Glu Ser Cys
100 105 110

Gly Ala Leu Gln Val Lys Met Lys Pro Lys Ile Thr Arg Pro Pro Ile
115 120 125

Asn Val Lys Ile Ile Glu Gly Leu Lys Ala Val Leu Pro Cys Thr Thr
130 135 140

Met Gly Asn Pro Lys Pro Ser Val Ser Trp Ile Lys Gly Asp Ser Pro
145 150 155 160

Leu Arg Glu Asn Ser Arg Ile Ala Val Leu Glu Ser Gly Ser Leu Arg
165 170 175

Ile His Asn Val Gln Lys Glu Asp Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Val Ala
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Lys Val Val Lys Leu Glu Val
195 200 205

Glu Glu Glu Ser Glu Pro Glu Gln Asp Thr Lys Val Phe Ala Arg Ile
210 215 220

Leu Arg Ala Pro Glu Ser His Asn Val Thr Phe Gly Ser Phe Val Thr
225 230 235 240

Leu His Cys Thr Ala Thr Gly Ile Pro Val Pro Thr Ile Thr Trp Ile
245 250 255

Glu Asn Gly Asn Ala Val Ser Ser Gly Ser Ile Gln Glu Ser Val Lys
260 265 270

Asp Arg Val Ile Asp Ser Arg Leu Gln Leu Phe Ile Thr Lys Pro Gly
275 280 285

Leu Tyr Thr Cys Ile Ala Thr Asn Lys His Gly Glu Lys Phe Ser Thr
290 295 300

Ala Lys Ala Ala Ala Thr Ile Ser Ile Ala Glu Trp Arg Glu Tyr Cys
305 310 315 320

ES 2 665 849 T3

Leu Ala Val Lys Glu Leu Phe Cys Ala Lys Glu Trp Leu Val Met Glu
325 330 335

Glu Lys Thr His Arg Gly Leu Tyr Arg Ser Glu Met His Leu Leu Ser
340 345 350

Val Pro Glu Cys Ser Lys Leu Pro Ser Met His Trp Asp Pro Thr Ala
355 360 365

Cys Ala Arg Leu Pro His Leu Gly Asn Thr Glu Phe Ser Gln Asp Phe
370 375 380

Gly Gly
385

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento *in vitro* de determinación de un estado de envejecimiento o amiotrofia, comprendiendo dicho procedimiento la etapa que consiste en medir una proteína MuSK que está presente en un estado libre, o un ARNm para una proteína MuSK de tipo no receptor, en una muestra obtenida de un sujeto, en el que la proteína MuSK, que está presente en un estado libre, es una proteína MuSK de tipo no receptor y/o una proteína MuSK truncada.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la determinación de un estado de envejecimiento o amiotrofia es una determinación de un grado de envejecimiento, un diagnóstico precoz de amiotrofia o una detección de amiotrofia severa.
- 10 3. Un biomarcador de determinación de un estado de envejecimiento o amiotrofia, comprendiendo dicho biomarcador una proteína MuSK que está presente en un estado libre, o un ARNm para una proteína MuSK de tipo no receptor, en el que la proteína MuSK, que está presente en un estado libre, es una proteína MuSK de tipo no receptor y/o una proteína MuSK truncada.
- 15 4. El biomarcador según la reivindicación 3, en el que la determinación de un estado de envejecimiento o amiotrofia es una determinación de un grado de envejecimiento, un diagnóstico precoz de amiotrofia o una detección de amiotrofia severa.
- 20 5. Un procedimiento *in vitro* de determinación de la eficacia de los efectos terapéuticos o preventivos sobre el envejecimiento o sobre la amiotrofia, que comprende la etapa que consiste en medir una proteína MuSK que está presente en un estado libre, o un ARNm para una proteína MuSK de tipo no receptor, en una muestra obtenida de un sujeto, en el que la proteína MuSK, que está presente en un estado libre, es una proteína MuSK de tipo no receptor y/o una proteína MuSK truncada.
6. Un procedimiento de identificación sistemática para un agente terapéutico o preventivo para el envejecimiento o para la amiotrofia, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:
- 25 - administrar una sustancia de ensayo a un modelo animal no humano de envejecimiento o amiotrofia, o una estirpe celular del modelo animal no humano;
- medir una proteína MuSK que está presente en un estado libre, o un ARNm para una proteína MuSK de tipo no receptor, en una muestra obtenida del modelo animal no humano, o un sobrenadante de cultivos de la estirpe celular, en el que la proteína MuSK, que está presente en un estado libre, es una proteína MuSK de tipo no receptor y/o una proteína MuSK truncada; y
- 30 - seleccionar, como candidato para un agente terapéutico o preventivo para el envejecimiento o para la amiotrofia, una sustancia de ensayo en la que la cantidad de la proteína MuSK que está presente en un estado libre, o el nivel de expresión del ARNm para la proteína MuSK de tipo no receptor es reducida.
7. Una proteína seleccionada entre los siguientes (a) y (b):
- 35 (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12; y
 (b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12, y que tiene una actividad de proteína MuSK secretada.
8. Un polinucleótido que codifica la proteína de la reivindicación 7.
9. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 8.
10. Una célula transformada con el vector de la reivindicación 9.
- 40 11. Un kit de identificación sistemática para un agente terapéutico o preventivo para el envejecimiento o la amiotrofia, comprendiendo dicho kit la célula de la reivindicación 10.

Figura 1

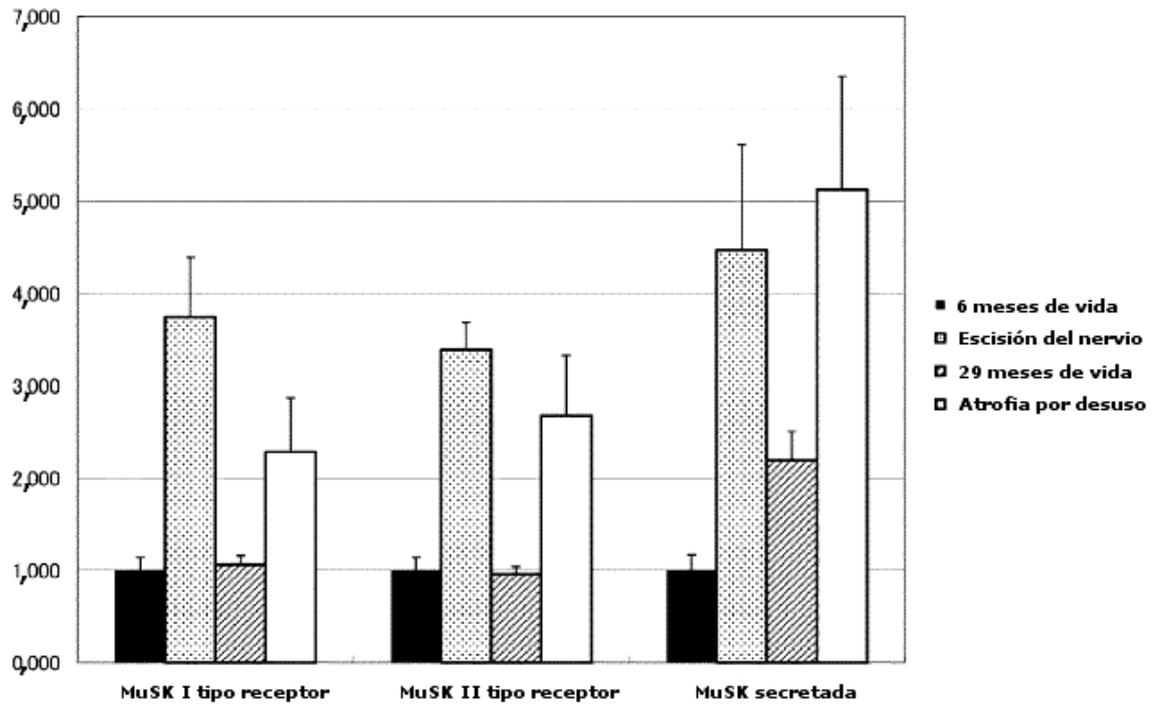


Figura 2

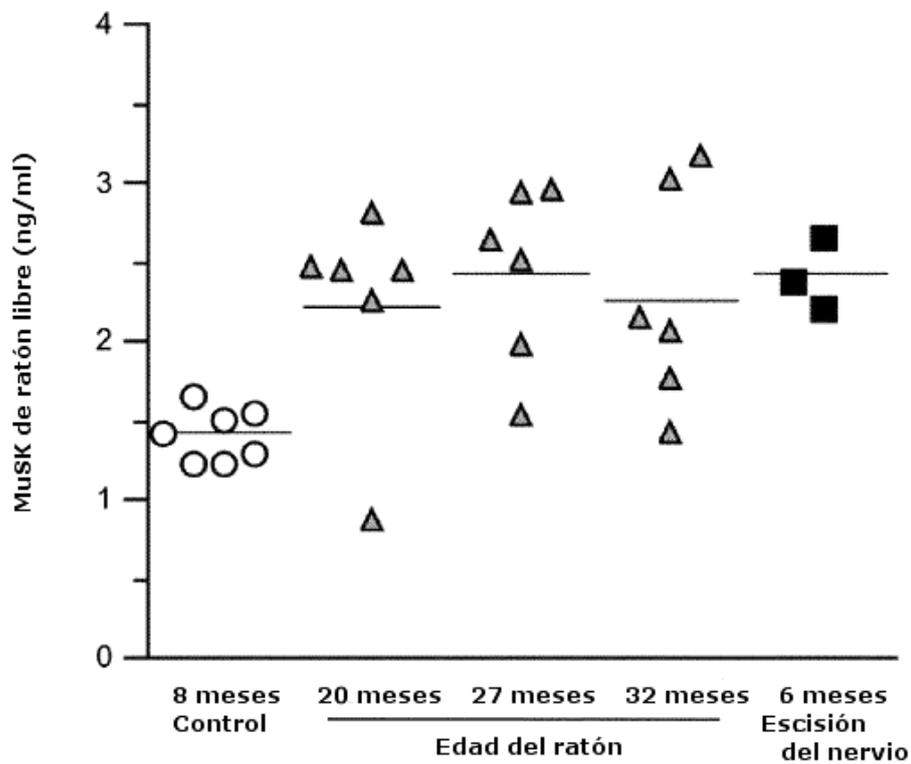


Figura 3

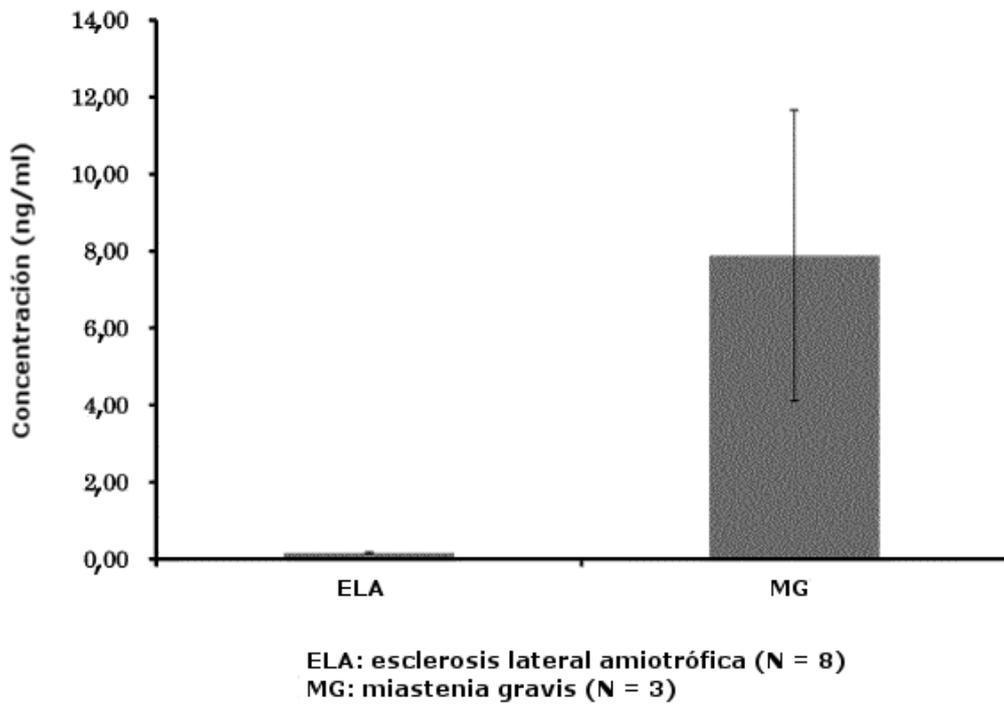


Figura 4

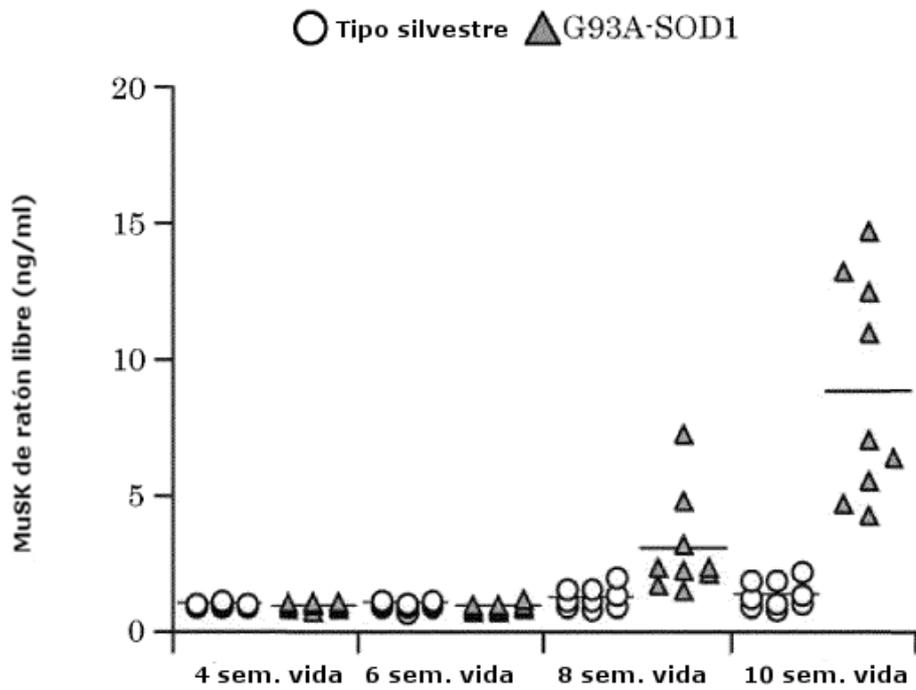


Figura 5

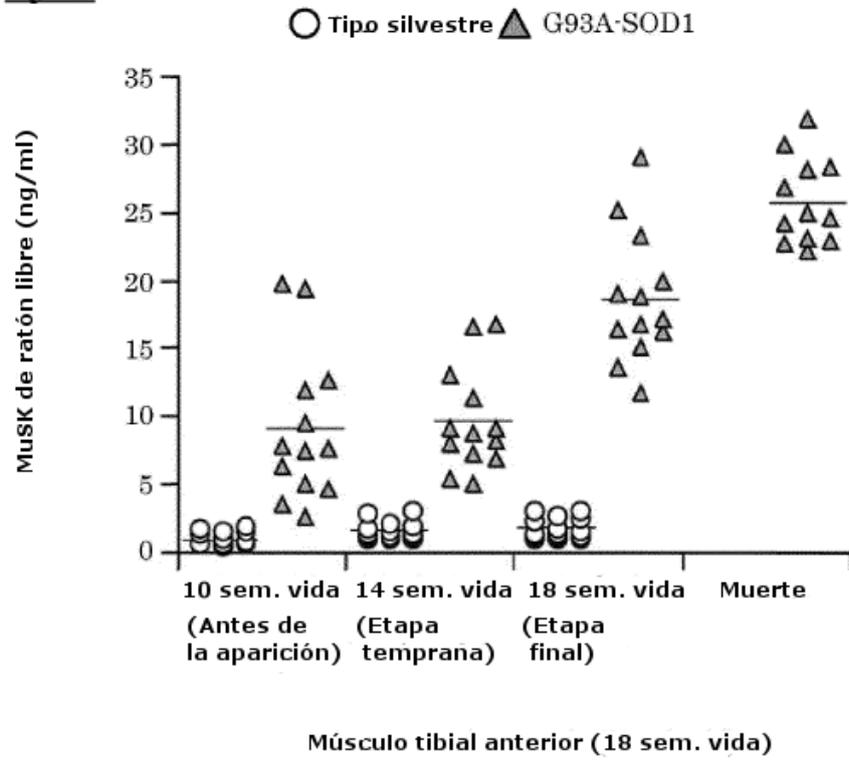


Figura 6

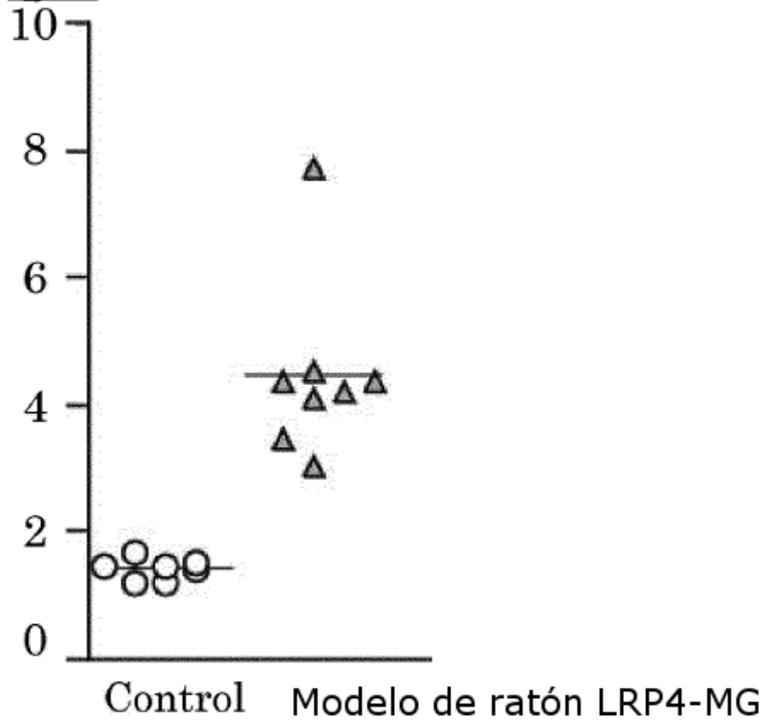
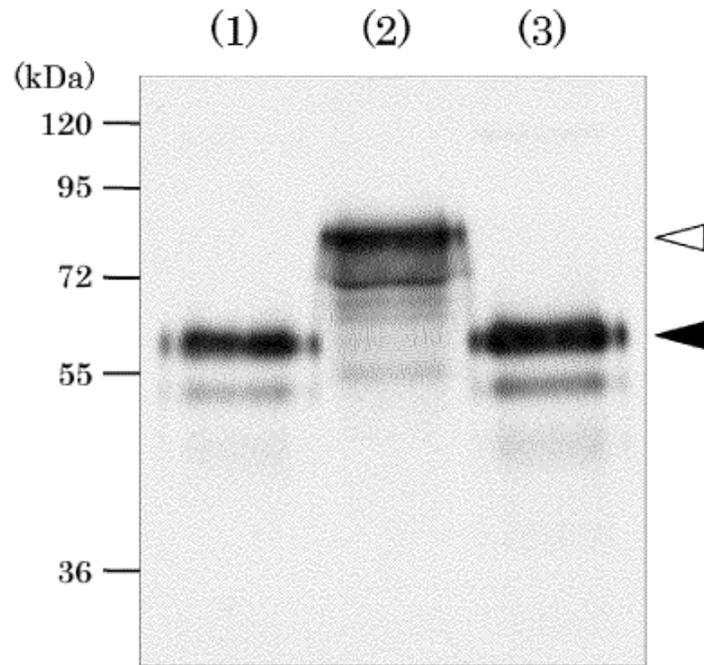


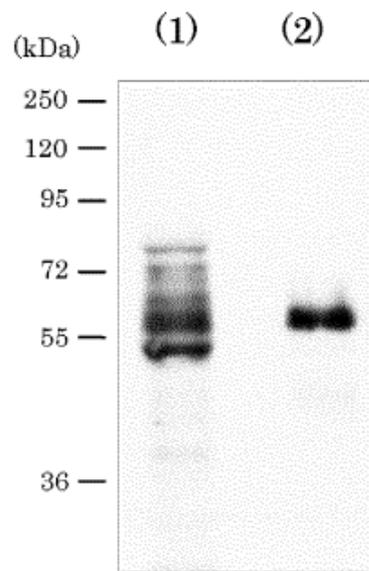
Figura 7



IB: AM anti-MuSK de conejo (1:30)
(N.º 2-6)

Figura 8

Transferencia Western



AM anti-MuSK de
conejo

Figura 9

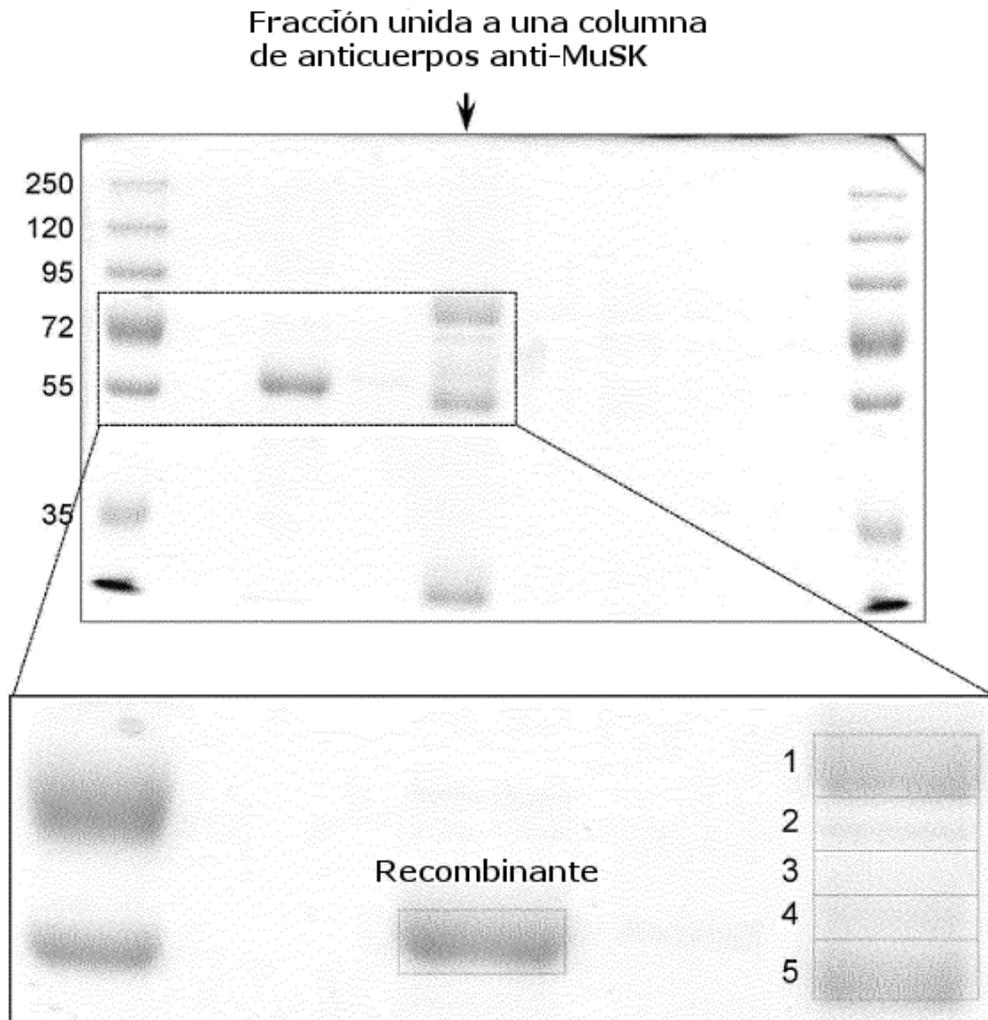


Figura 10

Banda 3

MRELVNIPLLQMLTLVAFSGTEKLPKAPVITTPLETVDALVEEVATFMCA
 VESYPQPEISWTRNKILIKLFDTRYSIRENGQLLTI LSVEDSDDGIIYCCI
 ANNGVGGAVESCGALQVKMKPKITRPPINVKII EGLKAVLPCTTMGNPKP
 SVSWIKGDNALRENSRIAVLESGSLRIHNVQKEDAGQYRCVAKNSLGTAY
 SKLVKLEVEEDREPEQDAKVFARILRAPESHNVTFGSFVTLRCTAIGIPV
 PTISWIENGNVSSGSIQESVKDRVIDSRQLQLFITKPGLYTCTIATNKHGE
 KFSTAKAAATVSI AVPPWFMDTSFLWTEWSKQDSQGYCAQYRGEVC
 DAVLAKDALVFNTSYRDPEDAQELLIH TANNELKAVSPLCRPAEALLC
 NHLFQECSPGVVPTPMPICREYCLAVKELFCAKEWQAMEGKAHRGLYRSG
 MHL LVP E C S K L P S M H R D P T A C T R L P Y L D Y K K E N I T T F P S I T S S R P S A D I
 PNLPASTSSFAVSPAYSMT

Banda 5

MRELVNIPLLQMLTLVAFSGTEKLPKAPVITTPLETVDALVEEVATFMCA
 VESYPQPEISWTRNKILIKLFDTRYSIRENGQLLTI LSVEDSDDGIIYCCI
 ANNGVGGAVESCGALQVKMKPKITRPPINVKII EGLKAVLPCTTMGNPKP
 SVSWIKGDNALRENSRIAVLESGSLRIHNVQKEDAGQYRCVAKNSLGTAY
 SKLVKLEVEEDREPEQDAKVFARILRAPESHNVTFGSFVTLRCTAIGIPV
 PTISWIENGNVSSGSIQESVKDRVIDSRQLQLFITKPGLYTCTIATNKHGE
 KFSTAKAAATVSI AVPPWFMDTSFLWTEWSKQDSQGYCAQYRGEVC
 DAVLAKDALVFNTSYRDPEDAQELLIH TANNELKAVSPLCRPAEALLC
 NHLFQECSPGVVPTPMPICREYCLAVKELFCAKEWQAMEGKAHRGLYRSG
 MHL LVP E C S K L P S M H R D P T A C T R L P Y L D Y K K E N I T T F P S I T S S R P S A D I
 PNLPASTSSFAVSPAYSMT

Banda 2

MRELVNIPLLQMLTLVAFSGTEKLPKAPVITTPLETVDALVEEVATFMCA
 VESYPQPEISWTRNKILIKLFDTRYSIRENGQLLTI LSVEDSDDGIIYCCI
 ANNGVGGAVESCGALQVKMKPKITRPPINVKII EGLKAVLPCTTMGNPKP
 SVSWIKGDNALRENSRIAVLESGSLRIHNVQKEDAGQYRCVAKNSLGTAY
 SKLVKLEVEEDREPEQDAKVFARILRAPESHNVTFGSFVTLRCTAIGIPV
 PTISWIENGNVSSGSIQESVKDRVIDSRQLQLFITKPGLYTCTIATNKHGE
 KFSTAKAAATVSI AVPPWFMDTSFLWTEWSKQDSQGYCAQYRGEVC
 DAVLAKDALVFNTSYRDPEDAQELLIH TANNELKAVSPLCRPAEALLC
 NHLFQECSPGVVPTPMPICREYCLAVKELFCAKEWQAMEGKAHRGLYRSG
 MHL LVP E C S K L P S M H R D P T A C T R L P Y L D Y K K E N I T T F P S I T S S R P S A D I
 PNLPASTSSFAVSPAYSMT

Banda 4

MRELVNIPLLQMLTLVAFSGTEKLPKAPVITTPLETVDALVEEVATFMCA
 VESYPQPEISWTRNKILIKLFDTRYSIRENGQLLTI LSVEDSDDGIIYCCI
 ANNGVGGAVESCGALQVKMKPKITRPPINVKII EGLKAVLPCTTMGNPKP
 SVSWIKGDNALRENSRIAVLESGSLRIHNVQKEDAGQYRCVAKNSLGTAY
 SKLVKLEVEEDREPEQDAKVFARILRAPESHNVTFGSFVTLRCTAIGIPV
 PTISWIENGNVSSGSIQESVKDRVIDSRQLQLFITKPGLYTCTIATNKHGE
 KFSTAKAAATVSI AVPPWFMDTSFLWTEWSKQDSQGYCAQYRGEVC
 DAVLAKDALVFNTSYRDPEDAQELLIH TANNELKAVSPLCRPAEALLC
 NHLFQECSPGVVPTPMPICREYCLAVKELFCAKEWQAMEGKAHRGLYRSG
 MHL LVP E C S K L P S M H R D P T A C T R L P Y L D Y K K E N I T T F P S I T S S R P S A D I
 PNLPASTSSFAVSPAYSMT

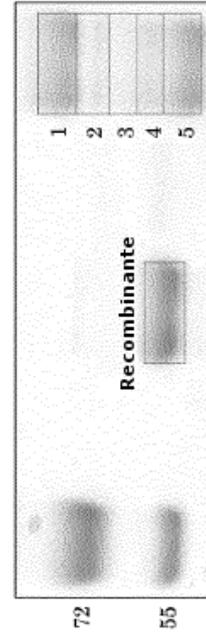
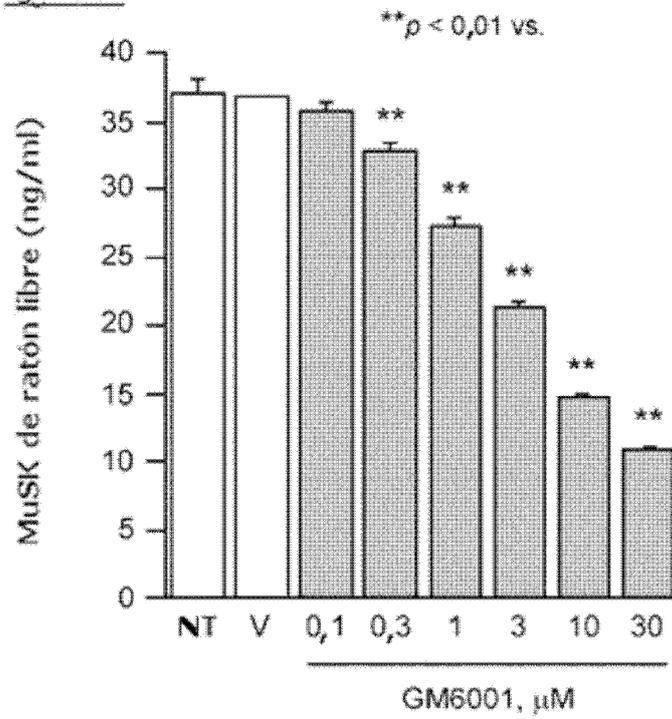


Figura 11



NT: No tratado
 V: Vehículo (0,1 % de DMSO)

Figura 12

