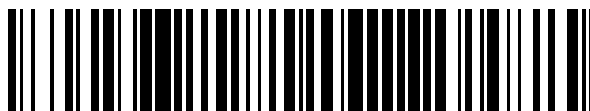


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 127**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2014** **PCT/JP2014/078366**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015** **WO15060430**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2014** **E 14855049 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018** **EP 3061810**

54 Título: **Células madre musculares o mioblastos, procedimiento de cribado de sustancias que participan en la conversión metabólica usando las mismas, y composición farmacéutica que comprende la sustancia obtenida de dicho procedimiento del cribado**

30 Prioridad:

24.10.2013 JP 2013221037

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

27.05.2019

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 2 714 127 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

Células madre musculares o mioblastos, procedimiento de cribado de sustancias que participan en la conversión metabólica usando las mismas, y composición farmacéutica que comprende la sustancia obtenida de dicho procedimiento del cribado

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una célula madre muscular o a un mioblasto aislado, y a un procedimiento para el cribado de una sustancia implicada en un cambio metabólico usando la misma. De acuerdo con la presente invención, las sustancias implicadas en un cambio metabólico del músculo esquelético se pueden seleccionar de manera eficaz.

10 **Antecedentes de la técnica**

En la actualidad nos enfrentamos a una sociedad superenvejecida. La sarcopenia, así como la demencia, es el problema principal en la sociedad superenvejecida de hoy en día, pero un diagnóstico temprano y la prevención de la atrofia muscular son problemas existentes desde hace tiempo. La sarcopenia se define como una enfermedad asociada con un descenso en la cantidad de músculo esquelético. Además, en un sentido más amplio, se considera que la sarcopenia incluye una enfermedad asociada con la debilidad del músculo esquelético o un descenso en su función.

La sarcopenia se desarrolla en los músculos esqueléticos. El músculo esquelético se compone principalmente de dos fibras, es decir, fibra muscular de contracción lenta y fibra muscular de contracción rápida y, en cada músculo, estas dos fibras con una determinada proporción se disponen en una disposición de tipo mosaico. La fibra muscular de contracción lenta tiene una excelente capacidad de producción de energía aeróbica. La tasa de contracción de la fibra muscular de contracción lenta es baja, pero la tolerancia a la fatiga de la misma es excelente. Por lo tanto, se considera que la fibra muscular de contracción lenta es adecuada para un ejercicio de resistencia. Por otra parte, la fibra muscular de contracción rápida tiene una excelente capacidad de producción de energía anaeróbica, y la tensión generada por la misma es alta. Por lo tanto, se considera que la fibra muscular de contracción rápida es adecuada para un ejercicio de resistencia.

Además, la atrofia muscular por inactividad, el daño a los nervios motores, la caquexia, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la enfermedad de Crohn, la diabetes de tipo I y II, la enfermedad neuromuscular incurable, la miastenia gravis autoinmune, la obesidad sarcopénica, la arteriosclerosis con atrofia muscular, la atrofia muscular asociada con enfermedad vascular cerebral, el daño muscular, la reconstrucción de tejido muscular tras lesión externa o cirugía de tratamiento, la distrofia muscular o similares, se conoce como una enfermedad con un cambio de músculo esquelético (referencias no de patente 1 a 3), y se ha llevado a cabo el desarrollo de los agentes terapéuticos frente a las enfermedades anteriores. Sin embargo, no se ha desarrollado un agente terapéutico eficaz.

Las enfermedades neuromusculares incurables incluyen esclerosis lateral amiotrófica, 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.

Un ratón genomanipulado por inserción génica MyHC β -YFP en el que una proteína fluorescente YFP se une a la cadena pesada β de la miosina se documenta como un medio para visualizar la cadena pesada β de la miosina de un músculo cardíaco (referencia no de patente 4). El gen de la cadena pesada β de la miosina de un músculo cardíaco es el mismo que el gen MyHC1 de un músculo esquelético y, por lo tanto, los inventores han descubierto que el MyHC1 se puede expresar y visualizar en el músculo esquelético (referencia no de patente 5). En lo sucesivo en el presente documento, MyHC β -YFP se cita como MyHC1-YFP. Además, los inventores prepararon un ratón genomanipulado por inserción génica, en el que se genomanipulan por inserción génica una proteína de fusión en la que una proteína fluorescente Sirius se une a la cadena pesada IIa de la miosina de un músculo esquelético, y una proteína de fusión en la que una proteína fluorescente mCherry se une a la cadena pesada IIb de la miosina de un músculo esquelético, y se ha documentado que se puede visualizar un desplazamiento de la composición de las fibras musculares provocado por el entrenamiento (referencia no de patente 5). Sin embargo, el ratón genomanipulado por inserción génica no es un ratón modelo de una enfermedad muscular esquelética y, por lo tanto, no se usa para desarrollar agentes terapéuticos.

50 LISTADO DE CITAS

REFERENCIAS NO DE PATENTE

[REFERENCIA NO DE PATENTE 1] Muscle & Nerve, 2013, (Estados Unidos), vol.47, págs. 691-701

[REFERENCIA NO DE PATENTE 2] International Journal of Cardiology, 2013, (Estados Unidos), vol.168, págs. 2014-21

55 [REFERENCIA NO DE PATENTE 3] Progress in Brain Research, 2012, (Estados Unidos), vol.201, págs. 333-59

[REFERENCIA NO DE PATENTE 4] Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of

America, 2006, (Estados Unidos), vol.103, págs. 16864-9

[REFERENCIA NO DE PATENTE 5] Shuich Mori y colaboradores, "Visualization of composition shift of muscle fibers by training using a biological imaging, -Construction of novel model animal for research ~" 2010, MIZUNO SPORTS PROMOTION FOUNDATION, Aid for scientific, academic, or medical study on sports [Consultado el 15 de octubre de 2013], Internet, http://www.mizuno.co.jp/zaidan/ikagaku/josei_2010.html. El documento US 2010/0215657 A1 describe FGF21 para su uso en el tratamiento de atrofia muscular, arteriosclerosis, distrofia muscular o miopatía probada en mioblastos para el crecimiento de miotubos que son sensibles a la rapamicina.

El documento WO 2013/116691 A1 desvela un procedimiento para aumentar la fuerza muscular en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la administración de nanopartículas cargadas con rapamicina a un sujeto en necesidad de un aumento de la fuerza muscular. Este documento informa de que la fuerza muscular de la fibra muscular aumenta por rapamicina y la destrucción muscular de la fibra muscular se atenúa por rapamicina. MOL MED 17 (9-10) 917-924, Septiembre - Octubre de 2011 informa de que la rapamicina mejora el fenotipo de la distrofia en músculo esquelético de ratón mdx. Pflugers Arch - Eur J Physiol (2013) 465:509-516 describe CL316,243, un agonista selectivo del adrenoceptor β_3 , que activa la traducción de las proteínas a través de una vía de señalización de mTOR/p70S6K en células de músculo esquelético de rata.

Sumario de la invención

Problema técnico

El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para cribar una sustancia implicada en un cambio metabólico del músculo esquelético. Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar un agente terapéutico para la sarcopenia o enfermedades con un cambio del músculo esquelético.

Solución al problema

Los inventores llevaron a cabo estudios exhaustivos en un agente terapéutico para sarcopenia o enfermedades con un cambio del músculo esquelético, y como resultado, para su sorpresa, descubrieron que los candidatos para agentes terapéuticos para sarcopenia o enfermedades con un cambio de músculo esquelético se pueden seleccionar mediante la selección de sustancias candidatas para el tratamiento usando células madre musculares o mioblastos, en el que al menos un gen de fusión de la cadena pesada de la miosina seleccionado del grupo que consiste en un gen de fusión de la cadena pesada I de miosina en el que el gen de la cadena pesada I de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, un gen de fusión de la cadena pesada IIa de miosina en el que un gen de la cadena pesada IIa de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, un gen de fusión de la cadena pesada IId/x de miosina en el que un gen de la cadena pesada IId/x de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, y un gen de fusión de la cadena pesada IIb de miosina, en el que un gen de la cadena pesada IIb de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, se introducen.

La presente invención se basa en los hallazgos anteriores.

La presente invención se refiere a

[1] una célula madre muscular aislada o un mioblasto aislado que comprende al menos un gen de fusión de la cadena pesada de la miosina se selecciona del grupo que consiste en un gen de fusión de la cadena pesada I de miosina en el que el gen de la cadena pesada I de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, un gen de fusión de la cadena pesada IIa de miosina en el que un gen de la cadena pesada IIa de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, un gen de fusión de la cadena pesada IId/x de miosina en el que un gen de la cadena pesada IId/x de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, y un gen de fusión de la cadena pesada IIb de miosina, en el que un gen de la cadena pesada IIb de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan,

[2] la célula madre muscular o el mioblasto del objeto [1], en el que la célula es una célula inmortalizada,

[3] la célula madre muscular o el mioblasto del objeto [1] o [2], en el que el gen de la proteína fluorescente o fotoproteína unido a un gen de la cadena pesada I de miosina, el gen de la proteína fluorescente o fotoproteína unido a un gen de la cadena pesada IIa de miosina, el gen de proteína fluorescente o fotoproteína unido a un gen de cadena pesada IId/x de miosina y el gen de proteína fluorescente o fotoproteína unido a un gen de cadena pesada IIb de miosina son diferentes entre sí,

[4] la célula madre muscular o el mioblasto de uno cualquiera de los objetos [1] a [3], en la que la proteína fluorescente o la fotoproteína es al menos una proteína fluorescente o fotoproteína seleccionada del grupo que consiste en Sirius, EBFP, SBP2, EBP2, Azurite, mKalamal, TagBFP, mBlueberry, mTurquoise, ECFP, Cerulean, mCerulean, TagCFP, AmCyan, mTP1, MiCy (Cian de Midoriishi), TurboGFP, CFP, AcGFP, TagGFP, AG (Verde Azami), mAG1, ZsGreen, EmGFP (Esmeralda), EGFP, GP2, T-Sapphire, HyPer, TagYFP, mAmetrine, EYFP, YFP, Venus, Citrine, PhiYFP, PhiYFP-m, turboYFP, ZsYellow, mBanana, mKO1, KO (Naranja de Kusabira), mOrange, mOrange2, mKO2, Keima570, TurboRFP, DsRed-Express, DsRed, DsRed2, TagRFP, TagRFP-T, DsRed-Monomérica, mApple, AsRed2, mStrawberry, TurboFP602, mRP1, JRed, KillerRed, mCherry, KeimaRed, HcRed, mRaspberry, mKate2, TagFP635, mPlum, egFP650, Neptune, mNeptune, egFP670 y luciferasa,

[5] un procedimiento *in vitro* para el cribado de una sustancia implicada en un cambio metabólico, que

comprende las etapas de: poner en contacto las células madre musculares o mioblastos de uno cualquiera de los objetos [1] a [4] o células del miotubo diferenciadas de manera inductiva de las mismas con una sustancia a probar; y analizar una expresión de al menos un gen de cadena pesada de miosina seleccionado del grupo que consiste en un gen de cadena pesada I de miosina, un gen de cadena pesada IIa de miosina, un gen de cadena pesada IIb de miosina y un gen de cadena pesada IIc de miosina, en las células

[6] el procedimiento para cribar una sustancia implicada en un cambio metabólico del objeto [5], en el que el análisis de la expresión de un gen de cadena pesada de miosina es un análisis de una cantidad o proliferación de células en la que se expresa la proteína fluorescente o la fotoproteína,

[7] el procedimiento para cribar una sustancia implicada en un cambio metabólico del objeto [5] o [6], en el que la sustancia implicada en un cambio metabólico se selecciona del grupo que consiste en un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con una reducción de las fibras musculares de contracción lenta, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un aumento de fibras musculares de contracción lenta, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con una reducción de las fibras musculares de contracción rápida, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un aumento de las fibras musculares de contracción rápida, un fármaco anticancerígeno, un agente inmunosupresor y un agente para el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con el estilo de vida,

Además, la presente memoria descriptiva describe

[8] un kit para el cribado de una sustancia implicada en un cambio metabólico, que comprende las células madre musculares o mioblastos, de uno cualquiera de los objetos [1] a [4], o las células del miotubo diferenciadas de manera inductiva de las mismas,

[9] el kit para seleccionar una sustancia implicada en un cambio metabólico del objeto [8], en el que la sustancia implicada en un cambio metabólico se selecciona del grupo que consiste en un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con una reducción de las fibras musculares de contracción lenta, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un aumento de fibras musculares de contracción lenta, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con una reducción de las fibras musculares de contracción rápida, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un aumento de las fibras musculares de contracción rápida, un fármaco anticancerígeno, un agente inmunosupresor y un agente para el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con el estilo de vida,

[10] un uso de células madre musculares o mioblastos, de uno cualquiera de los objetos [1] a [4], o las células del miotubo diferenciadas de manera inductiva de las mismas, para preparar un kit para seleccionar sustancias implicadas en el cambio metabólico,

[11] el uso para preparar un kit para seleccionar una sustancia implicada en un cambio metabólico del objeto [10], en el que la sustancia implicada en un cambio metabólico se selecciona del grupo que consiste en un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con una reducción de las fibras musculares de contracción lenta, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un aumento de fibras musculares de contracción lenta, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con una reducción de las fibras musculares de contracción rápida, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un aumento de las fibras musculares de contracción rápida, un fármaco anticancerígeno, un agente inmunosupresor y un agente para el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con el estilo de vida,

[12] un uso de células madre musculares o mioblastos, de uno cualquiera de los objetos [1] a [4], o las células del miotubo diferenciadas de manera inductiva de las mismas, como una herramienta de selección para seleccionar sustancias implicadas en el cambio metabólico,

[13] el uso como una herramienta de selección para seleccionar sustancias implicadas en el cambio metabólico, en el que la sustancia implicada en un cambio metabólico se selecciona del grupo que consiste en un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con una reducción de las fibras musculares de contracción lenta, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un aumento de fibras musculares de contracción lenta, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con una reducción de las fibras musculares de contracción rápida, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un aumento de las fibras musculares de contracción rápida, un fármaco anticancerígeno, un agente inmunosupresor y un agente para el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con el estilo de vida.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con la célula madre muscular o el mioblasto de la presente invención, se pueden seleccionar sustancias implicadas en el cambio metabólico del músculo esquelético. Además, las sustancias implicadas en el cambio metabólico del músculo esquelético incluyen sustancias que se pueden usar como un agente terapéutico para enfermedades con un cambio del músculo esquelético. Por tanto, los agentes terapéuticos para tales enfermedades se pueden desarrollar usando las mismas. Además, de acuerdo con el procedimiento de cribado de la presente invención, se pueden seleccionar genes y proteínas implicadas en el cambio metabólico del músculo esquelético. Tales genes y proteínas se pueden usar como un marcador de enfermedad. Además, de acuerdo con el procedimiento de cribado de la presente invención, también se pueden seleccionar sustancias implicadas en un

cambio metabólico que no sea del músculo esquelético. Es decir, un fármaco anticancerígeno, se puede seleccionar un agente inmunosupresor y un agente para el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con el estilo de vida.

Además, la composición farmacéutica descrita en el presente documento puede tratar o prevenir la debilidad del músculo esquelético o la enfermedad con atrofia muscular.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un conjunto de imágenes que muestran un vector de direccionamiento para la introducción de un gen de cadena pesada I de miosina y una proteína fluorescente YFP (A), un vector de direccionamiento para la introducción de un gen de cadena pesada IIa de miosina y una proteína fluorescente Sirius (B), un vector de direccionamiento para la introducción de un gen de cadena pesada IIb de miosina y una proteína fluorescente mCherry (C) y un vector de direccionamiento para la introducción de un gen de una cadena pesada de miosina II d/x y una proteína fluorescente mCerulean (D).

La FIG. 2 es una imagen que muestra una inducción de diferenciación de una célula madre muscular (célula satélite) a un mioblasto y una célula del miotubo (célula muscular diferenciada).

La FIG. 3 es una fotografía que muestra las células del miotubo en las que se expresa YFP unida al gen de la cadena pesada I de miosina, y células del miotubo en las que se expresa Sirius unida al gen de la cadena pesada IIa de miosina (A), y una fotografía que muestra las células del miotubo en las que se expresa mCerulean unido al gen de la cadena pesada II d/x de miosina y células del miotubo en las que se expresa mCherry unido a un gen de la cadena pesada IIb de miosina (B).

La FIG. 4 es un conjunto de gráficos que muestran que las células que expresan una proteína de cadena pesada I de miosina aumentan mediante la adición de rapamicina (A), y las células que expresan una proteína de la cadena pesada IIb de miosina se reducen mediante la adición de rapamicina (B).

La FIG. 5 es un gráfico que muestra que las células que expresan una proteína de cadena pesada I de miosina aumentan mediante la adición de factor 21 de crecimiento de fibroblastos.

La FIG. 6 es un gráfico que muestra que las células que expresan una proteína de cadena pesada IIb de miosina aumentan mediante la adición de T3 (triiodotironina).

La FIG. 7 es un conjunto de gráficos que muestran que las células que expresan una proteína de cadena pesada I de miosina aumentan mediante la adición de IL-15, y las células que expresan una proteína de la cadena pesada IIb de miosina aumentan mediante la adición de IL-15.

La FIG. 8 es un gráfico que muestra que las células que expresan una proteína de cadena pesada I de miosina aumentan mediante la adición del agonista del receptor $\beta 3$ (CL316243).

La FIG. 9 es una fotografía (A) y un gráfico (B) que muestra que una proliferación de células satélite se suprime mediante la adición de rapamicina.

Descripción de las realizaciones

[1] Célula madre muscular o mioblasto

La célula madre muscular o mioblasto de la presente invención comprende al menos un gen de fusión de cadena pesada de miosina seleccionad del grupo que consiste en un gen de fusión de cadena pesada I de miosina en el que un gen de fusión de cadena pesada I de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, un gen de fusión de la cadena pesada IIa de miosina en el que un gen de la cadena pesada IIa de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, un gen de fusión de la cadena pesada II d/x de miosina en el que un gen de la cadena pesada II d/x de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, y un gen de fusión de la cadena pesada IIb de miosina, en el que un gen de la cadena pesada IIb de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan.

(Ratón genomanipulado, Ratón transgénico)

La célula madre muscular o el mioblasto de la presente invención no está limitado, sino que se puede obtener de un ratón genomanipulado por inserción en el que se genomanipula por inserción uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en el gen de fusión de cadena pesada I de miosina, el gen de fusión de cadena pesada IIa de miosina, el gen de fusión de cadena pesada II d/x de miosina, y el gen de fusión de cadena pesada IIb de miosina.

El ratón anterior genomanipulado por inserción se puede preparar mediante procedimientos conocidos. En particular, se introduce un vector de direccionamiento a células ME de ratón y se selecciona un clon de ME en el que se genera una recombinación homóloga. Después, se prepara un ratón quimérico usando el clon de ME obtenido, y se obtiene descendencia mediante el cruzamiento de un ratón quimérico con un ratón normal. El ratón genomanipulado por inserción se puede obtener mediante la selección de un ratón en el que el gen de la proteína de fusión se introduce a las células de la línea germinal, de la descendencia.

Por ejemplo, se puede construir un vector de direccionamiento en el que un gen de cadena pesada está unido a un gen de una proteína fluorescente o de una fotoproteína, tal como sigue. Una secuencia genómica de un gen de cadena pesada de miosina de interés se subclona a partir de una biblioteca BAC de ratones macho C57BL/6J. Por otra parte, un gen de proteína fluorescente o de fotoproteína se puede obtener a partir de un vector que contiene al

mismo mediante PCR. El gen de la proteína fluorescente o de la fotoproteína resultante se inserta en un lado del extremo 5' terminal del gen de la cadena pesada de miosina en el marco del codón de iniciación de la traducción (ATG) del mismo. El vector de direccionamiento resultante se hace en uno lineal y se introduce en células ME de ratón. Se identifica un clon de ME recombinante homólogo mediante PCR y análisis por transferencia de Southern, y después se prepara un ratón quimérico mediante un procedimiento de agregación usando el ME obtenido. Después, se obtiene una descendencia mediante cruzamiento del ratón quimérico con un ratón C57BL/6 macho, y se someten a la determinación del genotipo. El ratón genomanipulado por inserción en el que se introduce el gen de fusión en el que un gen de cadena pesada de miosina se une a un gen de proteína fluorescente o de fotoproteína, se puede obtener mediante la confirmación de la introducción del gen de fusión a células de la línea germinal.

El ratón genomanipulado por inserción puede contener uno o más genes de fusión. Es decir, el ratón genomanipulado por inserción contiene al menos un gen de fusión de la cadena pesada de la miosina seleccionado del grupo que consiste en un gen de fusión de la cadena pesada I de miosina en el que el gen de la cadena pesada I de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, un gen de fusión de la cadena pesada IIa de miosina en el que un gen de la cadena pesada IIa de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, un gen de fusión de la cadena pesada IIb de miosina en el que un gen de la cadena pesada IIb de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, un gen de fusión de la cadena pesada IId/x de miosina en el que un gen de la cadena pesada IId/x de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, y un gen de fusión de la cadena pesada IIb de miosina, en el que un gen de la cadena pesada IIb de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan. Sin embargo, es preferible el ratón genomanipulado por inserción que contiene los cuatro genes de fusión anteriores.

Además, la célula madre muscular o el mioblasto de la presente invención se puede preparar a partir de un ratón transgénico fabricado mediante la introducción de un gen de fusión en el que un gen genómico de una región promotora de un gen de cadena pesada I de miosina, un gen de cadena pesada IIa de miosina, un gen de cadena pesada IId/x de miosina o un gen IIb de cadena pesada de miosina, y un gen de proteína fluorescente o de fotoproteína se fusionan.

Además, el ratón genomanipulado por inserción se puede preparar mediante el uso de una técnica de nucleasa artificial, es decir, ZFN (nucleasa de dedos de zinc) o TALEN (nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción), o nucleasa de tipo guiada por ARN, es decir, sistema CRISPR/Cas (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas de forma regular, asociado a CRISPR).

(Aislamiento de células madre musculares o mioblasto)

La célula madre muscular o el mioblasto de la presente invención no está limitada, pero se puede obtener del ratón genomanipulado por inserción o del ratón transgénico a través de FACS (separación de células activada por fluorescencia) como una célula satélite. Además, la célula madre muscular o el mioblasto de la presente invención no está limitado, pero preferentemente se aísla del ratón genomanipulado por inserción o el ratón transgénico y se cultiva de manera continua.

Las células se obtienen de los músculos esqueléticos del ratón genomanipulado por inserción o del ratón transgénico por un tratamiento de colagenasa. Las células resultantes se seleccionan negativamente usando CD31, que es un marcador de células endoteliales, CD45, que es un marcador de células hematopoyéticas, y Sca1, que es un marcador de células que se diferencian a fibroblastos y células adiposas. Posteriormente, las células resultantes se seleccionan positivamente usando VCAM o SM/C-2.6, que es un marcador de células satélite, o aislando de este modo células madre musculares (células satélite).

(Célula madre muscular o mioblasto)

La célula madre muscular o el mioblasto de la presente invención se puede usar para el procedimiento de cribado de la presente invención. Es decir, el procedimiento de cribado de la presente invención se puede realizar usando las células del cultivo primario aisladas el ratón genomanipulado por inserción o del ratón transgénico mediante el procedimiento anterior. Sin embargo, la célula madre muscular o el mioblasto de la presente invención no está limitado, pero son preferibles las células inmortalizadas. Si la célula madre muscular o el mioblasto es una célula inmortalizada, no es necesario aislar células madre musculares o mioblastos del ratón genomanipulado por inserción o del ratón transgénico, en cada experimento. Es decir, las células madre musculares se pueden cultivar a largo plazo, y por lo tanto, se pueden usar de forma rápida y eficaz en el procedimiento de cribado de la presente invención.

(Célula madre muscular o mioblasto)

La célula madre muscular inmortalizada no está limitada, pero se puede preparar mediante el cruzamiento del ratón genomanipulado por inserción o el ratón transgénico con un ratón inmortalizado (*Immortmouse*) que tiene un promotor H-2Kb inducido por IFN- γ y un antígeno T grande de SV40 termosensible, tal como se muestra en los ejemplos de trabajo. La célula inmortalizada no es el límite, pero también hay células de paso proliferativas, tal como se muestra en los ejemplos de trabajo.

(Preparación de células madre musculares o mioblastos de la muestra que no es de ratón)

La célula madre muscular o el mioblasto de la presente invención se puede preparar usando la técnica del sistema ZFN, del sistema TALEN o del sistema CRISPR/Cas. Es decir, el gen de la proteína fluorescente o el gen de la fotoproteína se puede insertar en un gen de cadena pesada I de miosina, un gen de cadena pesada IIa de miosina, un gen de cadena pesada IIb de miosina por la técnica del sistema ZFN, del sistema TALEN o del sistema CRISPR/Cas. La célula madre muscular o el mioblasto de la presente invención se puede preparar de este modo.

(Inducción de la diferenciación)

La célula madre muscular (célula satélite) de la presente invención se diferencia en un mioblasto, y además se diferencia en una célula de miotubo (célula de la fibra muscular) (Figura 2).

La célula madre muscular y el mioblasto son células proliferativas. La célula del miotubo (célula de la fibra muscular) es una célula multinucleada en la que muchos mioblastos se fusionan entre sí.

Se puede realizar la inducción de la diferenciación de una célula madre muscular en un mioblasto, pero no está particularmente limitado, de la siguiente manera. Las células madre musculares se cultivan de manera continua en un medio de cultivo celular (medio de Eagle modificado de Dulbecco) con suero bovino fetal al 10 %, y después la diferenciación se induce mediante el cultivo de las mismas usando suero de caballo al 2 % en lugar de suero bovino fetal al 10 %, en la inducción de la diferenciación.

Además, se puede realizar la inducción de la diferenciación de un mioblasto a una célula del miotubo (célula de la fibra muscular), pero no está particularmente limitado, de la siguiente manera. Los mioblastos se diferencian a una célula del miotubo (célula de fibra muscular) mediante el cultivo en un medio de cultivo celular (medio Eagle modificado de Dulbecco) con suero de caballo al 2 %.

Además, la célula inmortalizada obtenida mediante cruzamiento con el ratón inmortalizado, se puede diferenciar de manera inductiva a un mioblasto o una célula del miotubo (célula de la fibra muscular) mediante el desplazamiento de la temperatura de 32 °C a 37 °C y degradación de un antígeno T grande de SV40 termosensible.

La sustancia implicada en el cambio metabólico obtenido mediante el procedimiento de cribado de la presente invención puede inducir una diferenciación a una célula específica de la fibra muscular, y puede acortar el tiempo de inducción de la diferenciación, en comparación con la inducción de la diferenciación a una célula del miotubo (célula de la fibra muscular) por suero de caballo, o similar.

El gen de la proteína fluorescente contenido en el gen de fusión en la célula madre muscular o el mioblasto de la presente invención no está particularmente limitado. Por ejemplo, se puede usar un gen que codifica una proteína fluorescente conocida, normalmente usada en este campo. Los ejemplos específicos de tales proteínas fluorescentes son al menos una proteína fluorescente azul, tal como Sirius, EBFP, SBP2, EBP2, Azurite, mKalama1, TagBFP, mBlueberry, mTurquoise, ECFP, Cerulean, mCerulean, TagCFP, AmCyan, mTP1, MiCy (Cian de Midoriishi), TurboGFP, CFP, AcGFP, TagGFP, AG (Verde Azami), mAG1, ZsGreen, EmGFP (Esmeralda), EGFP, GP2, T-Sapphire o HyPer; proteína amarilla fluorescente, tal como TagYFP, mAmetrine, EYFP, YFP, Venus, Citrine, PhiYFP, PhiYFP-m, turboYFP, ZsYellow o mBanana; proteína fluorescente de color rojo, tales como mKO1, KO (naranja de Kusabira), mOrange, mOrange2 o mKO2; una proteína roja fluorescente, tales como Keima570, TurboRFP, DsRed-Express, DsRed, DsRed2, TagRFP, TagRFP-T, DsRed-Monomérica, mApple, AsRed2, mStrawberry, TurboFP602, mRP1, JRed, KillerRed, mCherry, KeimaRed, HcRed, mRaspberry, mKate2, TagFP635, mPlum, egFP650, Neptune, mNeptune o egFP670.

El gen de la fotoproteína contenido en el gen de fusión en la célula madre muscular o el mioblasto de la presente invención no está particularmente limitado. Por ejemplo, se puede usar un gen que codifica una fotoproteína normalmente usada en este campo. Un ejemplo específico de tal fotoproteína es una luciferasa, pero el origen de la luciferasa no está limitado. Por ejemplo, se puede mencionar la luciferasa de luciérnaga, la luciferasa de luciérnaga marina, la luciferasa bacteriana, la luciferasa del género dinoflagelados, la luciferasa de renilla o la luciferasa de los elatéridos.

El gen de la proteína fluorescente o fotoproteína unido al gen de la cadena pesada I de miosina, el gen de cadena pesada IIa de miosina, el gen de la cadena pesada IIb de miosina, y el gen de la cadena pesada IIc de miosina puede ser un gen que codifica la misma proteína fluorescente o fotoproteína. Por ejemplo, cuando la célula madre muscular o el mioblasto contiene un único gen de fusión, los presentes inventores no tienen problemas usando un gen que codifica la misma proteína fluorescente o fotoproteína.

Sin embargo, cuando la célula madre muscular o el mioblasto contiene dos o más genes de fusión, es preferible que los respectivos genes de proteína fluorescente y similares unidos a las cadenas pesadas de miosina sean diferentes entre sí. Un tipo de gen de cadena pesada de la miosina que se expresa en la célula del miotubo (célula de la fibra muscular) se puede identificar mediante los colores de las proteínas fluorescentes y similares. En relación con esto, la expresión de los genes de la cadena pesada de la miosina se puede identificar generalmente mediante los colores de las proteínas fluorescentes y similares durante el período de la fase tardía del mioblasto a la fase de inducción de la diferenciación de la célula del miotubo (célula de la fibra muscular).

[2] Procedimiento para el cribado de sustancias implicadas en el cambio metabólico

El procedimiento para una sustancia implicada en el cambio metabólico de la presente invención comprende las etapas de: poner en contacto las células madre musculares o mioblastos o células del miotubo diferenciadas de manera inductiva de las mismas con una sustancia a probar; y analizar una expresión de al menos un gen de cadena pesada de miosina seleccionado del grupo que consiste en el gen de cadena pesada I de miosina, el gen de cadena pesada IIa de miosina, el gen de cadena pesada IIb de miosina y el gen de cadena pesada IIc de miosina, en las células.

Las células biológicas desplazan la eficacia de la producción energética (por ejemplo, un desplazamiento del sistema glucolítico al sistema mitocondrial, o un desplazamiento del sistema mitocondrial al sistema glucolítico) o la maquinaria biosintética (por ejemplo, un desplazamiento desde la reacción anabólica hasta una reacción catabólica, o un desplazamiento desde una reacción catabólica hasta una reacción anabólica) para adaptar la proliferación celular, la diferenciación, la reacción de inflamación, el estrés, la condición de la nutrición, la función única (tal como, el músculo esquelético, las células adiposas o la inmunidad). Estas conversiones se denominan el cambio metabólico. El procedimiento de cribado de la presente invención puede seleccionar las sustancias implicadas en el cambio metabólico.

(Etapas de contacto)

En la etapa de contacto en el procedimiento de cribado de la presente invención, las células musculares o los mioblastos, o las células del miotubo diferenciadas de manera inductiva a partir de las mismas, se ponen en contacto con las sustancias a probar.

La sustancia de ensayo no está particularmente limitada, siempre que pueda estar implicada en el cambio metabólico o es una biblioteca que comprende la misma. Sin embargo, se pueden usar diversos compuestos (incluyendo péptidos) registrados en los documentos químicos, compuestos obtenidos por técnicas de química combinatoria [Terrett, N. K. y col., Tetrahedron, 51,8135-8137 (1995)], o un grupo de péptidos aleatorios preparados empleando un procedimiento de presentación en fago [Felici, F. y col., J. Mol. Biol., 222, 301-310 (1991)], compuestos de bajo peso molecular, o similares. Además, los sobrenadantes de cultivo de los microorganismos, el sobrenadante de cultivo de las células, fluidos corporales, componentes naturales que derivan de plantas o de organismos marinos, o extractos de tejido animal y similares también se pueden usar como la sustancia de ensayo para la selección sistemática.

La célula madre muscular se diferencia en un mioblasto, y posteriormente se diferencia en una célula del miotubo mediante el estímulo de la inducción de la diferenciación. Las células proliferan durante las células madre musculares y los mioblastos, pero las células no proliferan durante las células del miotubo.

Un tiempo de contacto de las células con las sustancias de prueba, es decir, un tiempo de adición de las sustancias de prueba, no está particularmente limitado. Se pueden usar las células madre musculares, los mioblastos o las células del miotubo en cualquier etapa. Si la sustancia de prueba no afecta a la proliferación celular, las sustancias implicadas en el cambio metabólico se pueden seleccionar sistemáticamente en cualquier etapa de las células. Sin embargo, si la sustancia de prueba afecta a la proliferación celular, es preferible que se usen los mioblastos diferenciados o las células de los miotubos.

Por ejemplo, cuando la sustancia de prueba se añade a las células madre musculares, el tiempo de adición de las sustancias de prueba no está limitado, pero puede ser desde un comienzo de cultivo a 4 días después del comienzo del cultivo, preferentemente de 1 a 3 días después del comienzo del cultivo. Cuando la sustancia de prueba se añade a los mioblastos o a las células del miotubo, el tiempo de adición de las sustancias de prueba no está limitado, pero puede ser desde el comienzo de la inducción de la diferenciación a mioblasto hasta 3 días después, preferentemente de 12 a 36 horas después del comienzo de la inducción de la diferenciación a mioblasto.

La concentración de una sustancia de ensayo se puede decidir opcionalmente. Sin embargo, se considera que puede haber una concentración óptima de la sustancia de prueba para implicar un efecto en el cambio metabólico. Por tanto, es preferible que se use la sustancia de ensayo diluida a modo de etapas.

Un medio usado en la etapa de contacto no está limitado, siempre que la célula madre muscular, el mioblasto, o la célula del miotubo se puedan cultivar, pero se pueden mencionar, por ejemplo, un medio de cultivo celular (medio Eagle modificado de Dulbecco) con suero bovino fetal al 10 % o suero de caballo al 2 %.

(Etapas de análisis)

En la etapa de análisis de la presente invención, se analizaron las expresiones de una o más cadenas pesadas de miosina seleccionadas del grupo que consiste en el gen de cadena pesada I de miosina, el gen de cadena pesada IIa de miosina, el gen de cadena pesada IIb de miosina y el gen de cadena pesada IIc de miosina.

El procedimiento de análisis de la expresión génica no está particularmente limitado, pero incluye, por ejemplo, un procedimiento de análisis de la cantidad de ARNm, y un procedimiento de análisis de la cantidad de proteína

traducida a partir del ARNm. Como procedimiento de detección para la expresión de ARNm, se pueden usar los procedimientos conocidos. Por ejemplo, se puede mencionar un procedimiento de análisis por transferencia de northern, un procedimiento de transferencia de puntos y un ensayo de protección de ribonucleasa en el que el ARNm se mide directamente, y un procedimiento de RT-PCR tal como un procedimiento de PCR en tiempo real, un análisis de micromatriz de ADN, un análisis de microplaca de ADN, y un procedimiento de transferencia de northern en el que se sintetiza ADNc a partir de ARNm y se analiza. Sin embargo, el procedimiento de RT-PCR, el análisis de micromatriz de ADN, y el análisis de microplaca de ADN son los más preferibles. Además, como el procedimiento de medición de la expresión de la proteína, se puede mencionar un procedimiento de análisis por transferencia de western, un procedimiento de transferencia de puntos, un procedimiento de transferencia de hendiduras o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). El nivel de expresión de proteína fluorescente se puede analizar mediante la fluorescencia o luminiscencia en este sistema de selección sistemática y, por lo tanto, el nivel de expresión de proteína fluorescente o de fotoproteína se puede analizar fácilmente y de manera precisa. Es decir, cuando un nivel de fluorescencia de una determinada proteína fluorescente aumenta en comparación con un control negativo en el que no se añade una sustancia de prueba, se determina que las células que expresan una cadena pesada de miosina con una determinada proteína fluorescente aumentan. Cuando un nivel de fluorescencia de una determinada proteína fluorescente aumenta, se determina que las células que expresan una cadena pesada de miosina con una determinada proteína fluorescente se reducen. Además, cuando el número de células expresadas en la cadena pesada de la miosina permanece estático y el nivel de fluorescencia de la proteína fluorescente aumenta o disminuye, se considera que el nivel de expresión de la cadena pesada de miosina en una única célula aumenta o disminuye. Es decir, en el procedimiento de cribado de la presente invención, las sustancias implicadas en el cambio metabólico capaces de aumentar o reducir el nivel de expresión de una cadena pesada de miosina en una única célula, se pueden seleccionar de manera sistemática. El nivel de proteína fluorescente se puede medir mediante, por ejemplo, un microscopio de fluorescencia, un microscopio láser confocal, o un microscopio láser multifotón.

Además, el número de células con la fibra de contracción lenta en la que la cadena pesada I de la miosina se expresa, o la fibra de contracción rápida en la que la cadena pesada IIa de miosina, la cadena pesada IIb de miosina o la cadena pesada IIc de miosina se expresa, se puede medir contando el número de células de expresa cada una de las proteínas fluorescentes. Además, en lugar de las mediciones del número de células, las áreas de las células que expresan cada fibra muscular se pueden calcular midiendo la fluorescencia en un micrógrafo. Por lo tanto, en la presente memoria descriptiva, el número de células y el área de las células a veces se cita como una "cantidad de células" en conjunto. Además, por ejemplo, la frase de que "una cantidad de células que expresa la cadena pesada I de la miosina aumenta" en un estado sin proliferación celular tal como el estado de una célula del miotubo, significa que las células están diferenciadas. Además, en el procedimiento de cribado de la presente invención, la expresión de una cadena pesada de miosina en una sola célula se puede observar con el tiempo. Además, se pueden observar las expresiones de dos o más cadenas pesadas de miosina en una sola célula. Es decir, la diferenciación celular se desarrolla en cada una de las células. En el procedimiento de cribado de la presente invención, se puede observar un cambio en el nivel celular con el tiempo. Esto es porque, en la presente invención, se puede observar la diferenciación celular mientras que se cultivan las células. En una observación de la expresión de una cadena pesada de miosina usando un anticuerpo o similar, la cadena pesada de miosina intracelular se tiñe y, por lo tanto, es necesario fijar las células. Por lo tanto, es difícil observar las células vivas con el tiempo.

Por ejemplo, la célula madre muscular del ejemplo de trabajo contiene el gen que codifica la proteína de fusión de la cadena pesada I de miosina y la proteína fluorescente, YFP, el gen que codifica la proteína de fusión de la cadena pesada de miosina IIa y la proteína fluorescente Sirius, el gen que codifica la proteína de fusión de la cadena pesada de miosina IIb de miosina y la proteína fluorescente Cherry.

Por lo tanto, un aumento y un descenso de la expresión de la YFP amarilla significa un aumento y un descenso de la expresión de la proteína de la cadena pesada I de la miosina (un aumento y un descenso del número de células que expresa la proteína de la cadena pesada I de miosina). La proteína de la cadena pesada I de miosina se expresa en la fibra de contracción lenta, y se relaciona con un metabolismo oxidativo (Tabla 1). El aumento de la proteína de la cadena pesada I de la miosina representa un aumento de la cantidad de mitocondrias, una mejora de la función de las mitocondrias, un aumento de la cantidad de la producción de ATP, un aumento del metabolismo de las grasas o del metabolismo de los aminoácidos.

Además, las sustancias de prueba capaces de aumentar la proteína de la cadena pesada I de miosina son útiles para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con la debilidad muscular, la atrofia muscular, o el daño muscular en las que el músculo rápido aumenta y el músculo lento disminuye. Es decir, son eficaces para el tratamiento o la prevención de la enfermedad asociada con el aumento del músculo rápido y/o la reducción del músculo lento. Las sustancias de prueba capaces de aumentar la cadena pesada I de miosina se pueden usar como un agente terapéutico para la atrofia muscular por inactividad, el daño a los nervios motores, la caquexia, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la enfermedad de Crohn, la obesidad sarcopénica, la arteriosclerosis con atrofia muscular, la atrofia muscular asociada con enfermedad vascular cerebral, o la amiotrofia diabética de tipo I o de tipo II. En las enfermedades anteriores, se reduce el músculo lento y, por lo tanto, las sustancias capaces de aumentar la proteína de la cadena pesada I de miosina, es decir, las sustancias capaces de aumentar las células

con una proteína de la cadena pesada I de miosina, se pueden usar directamente como el agente para el tratamiento o la prevención de estas enfermedades.

Además, las sustancias de ensayo son útiles para un medicamento terapéutico selectivo para el trasplante de células madre mesenquimales, células madre musculares, y/o mioblastos en una terapia de daño muscular, lesión externa, distrofia muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la atrofia muscular por inactividad, insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia congénita o reconstrucción de tejido muscular tras tratamiento quirúrgico. La sustancia capaz de aumentar la proteína de la cadena pesada I de miosina puede aumentar las células con la fibra de la cadena pesada I de miosina. En la terapia del trasplante, es importante que las células de las fibras de contracción lenta y las células de las fibras de contracción rápida se diferencien de manera inductiva a partir de las células madre mesenquimales, células madre musculares y/o mioblastos de forma equilibrada. En relación con esto, la sustancia capaz de aumentar la proteína de la cadena pesada I de miosina se puede usar de manera eficaz para la inducción de la diferenciación de las células de la fibra muscular debido a la propiedad de inducción de la diferenciación de las células con la fibra de contracción lenta.

La expresión "enfermedad asociada con la debilidad muscular", tal como se usa en el presente documento, se refiere a atrofia muscular por inactividad, daño a los nervios motores, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, obesidad sarcopénica, arteriosclerosis con atrofia muscular, atrofia muscular asociada con enfermedad vascular cerebral, amiotrofia diabética de tipo I o de tipo II, daño muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular por inactividad, insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia congénita, distrofia muscular o reconstrucción de tejido muscular tras el tratamiento quirúrgico.

Además, la expresión "enfermedad asociada con la atrofia muscular", tal como se usa en el presente documento, se refiere a atrofia muscular por inactividad, daño a los nervios motores, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, obesidad sarcopénica, arteriosclerosis con atrofia muscular, atrofia muscular asociada con enfermedad vascular cerebral, amiotrofia diabética de tipo I o de tipo II, daño muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular por inactividad, insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia congénita, distrofia muscular o reconstrucción de tejido muscular tras el tratamiento quirúrgico.

Además, la expresión "enfermedad asociada con el daño muscular" tal como se usa en el presente documento se refiere a daño a los nervios motores, o lesión externa y reconstrucción del tejido muscular tras el tratamiento quirúrgico.

Además, un aumento y un descenso de la Sirius azul significa un aumento y un descenso de la expresión de la proteína de la cadena pesada IIa de la miosina (un aumento y un descenso del número de células que expresa la proteína de la cadena pesada IIa de miosina). La proteína de la cadena pesada IIa de miosina se expresa en la fibra de contracción rápida, y se relaciona con un metabolismo oxidativo y un metabolismo oxidativo glucolítico (Tabla 1). El aumento de la proteína de la cadena pesada IIa de la miosina representa un aumento de la cantidad de mitocondrias, una mejora de la función de las mitocondrias, un aumento de la cantidad de la producción de ATP, un aumento del metabolismo de las grasas o del metabolismo de los aminoácidos.

Además, las sustancias de prueba capaces de aumentar la proteína de la cadena pesada IIa de miosina son útiles para el tratamiento o la prevención de la enfermedad asociada con la debilidad muscular, la atrofia muscular, o el daño muscular en la que el músculo rápido aumenta y el músculo lento disminuye. Es decir, son eficaces para el tratamiento o la prevención de la enfermedad asociada con el aumento del músculo rápido y/o la reducción del músculo lento. Las sustancias de prueba capaces de aumentar la proteína de la cadena pesada IIa de miosina se pueden usar como un agente terapéutico para la atrofia muscular por inactividad, daño a los nervios motores, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, obesidad sarcopénica, arteriosclerosis con atrofia muscular, la atrofia muscular asociada con enfermedad vascular cerebral, o la amiotrofia diabética de tipo I o de tipo II. Las sustancias capaces de aumentar la proteína de la cadena pesada IIa de miosina se pueden usar directamente como el agente para el tratamiento o la prevención de estas enfermedades.

Además, las sustancias de prueba son útiles para un trasplante selectivo y terapéutico de las células madre mesenquimales, las células madre musculares, y/o mioblastos con el fin del tratamiento de daño muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular por inactividad, insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia

congénita, distrofia muscular, lesión externa o reconstrucción del tejido muscular tras el tratamiento quirúrgico. La sustancia capaz de aumentar la proteína de la cadena pesada Ila de miosina puede aumentar las células con la fibra de la cadena pesada Ila de miosina. En la terapia del trasplante, es importante que las células de las fibras de contracción lenta y las células de las fibras de contracción rápida se diferencien de manera inductiva a partir de las células madre mesenquimales, células madre musculares y/o mioblastos de forma equilibrada. En relación con esto, las sustancias capaces de aumentar la proteína de la cadena pesada Ila de miosina se puede usar de manera eficaz para la inducción de la diferenciación de células con la fibra Ila de la cadena pesada de miosina.

Además, un aumento y un descenso de la mCeruleans azul significa un aumento y un descenso de la expresión de la proteína de la cadena pesada Ila de la miosina (un aumento y un descenso del número de células que expresa la proteína de la cadena pesada Ild/x de miosina). La proteína de la cadena pesada Ila de miosina se expresa en la fibra de contracción rápida, y se relaciona con un metabolismo oxidativo y un metabolismo oxidativo glucolítico (Tabla 1). El aumento de la proteína de la cadena pesada de miosina Ild/x representa una mejora de la función del glucometabolismo, y un aumento de la lipogénesis y de la síntesis de aminoácidos.

Además, las sustancias de prueba capaces de aumentar la proteína de la cadena pesada Ild/x de miosina son útiles para el tratamiento o la prevención de la enfermedad asociada con la reducción del músculo lento. Las sustancias de prueba se pueden usar como un agente para la prevención o el tratamiento de sarcopenia, o un agente para el tratamiento de ELA.

Además, las sustancias de prueba son útiles para un trasplante selectivo y terapéutico de las células madre mesenquimales, las células madre musculares, y/o mioblastos con el fin del tratamiento de daño muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular por inactividad, insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia congénita, distrofia muscular, lesión externa o reconstrucción del tejido muscular tras el tratamiento quirúrgico. La sustancia capaz de aumentar la proteína de la cadena pesada Ild/x de miosina puede aumentar las células con la fibra de la cadena pesada Ild/x de miosina. En la terapia del trasplante, es importante que las células de las fibras de contracción lenta y las células de las fibras de contracción rápida se diferencien de manera inductiva a partir de las células madre mesenquimales, las células madre musculares y/o los mioblastos, de acuerdo con una propiedad del músculo esquelético de interés. En relación con esto, las sustancias capaces de aumentar la proteína de la cadena pesada Ild/x de miosina se puede usar de manera eficaz para la inducción de la diferenciación de células con la fibra Ild/x de la cadena pesada de miosina.

Además, un aumento y un descenso de la mCherry roja significa un aumento y un descenso de la expresión de la proteína de la cadena pesada IIb de la miosina (un aumento y un descenso del número de células que expresa la proteína de la cadena pesada IIb de miosina). La proteína de la cadena pesada IIb de miosina se expresa en la fibra de contracción rápida, y se relaciona con el metabolismo glucolítico (Tabla 1). El aumento de la proteína de la cadena pesada de miosina IIb representa una mejora de la función del glucometabolismo, y un aumento de la lipogénesis y de la síntesis de aminoácidos.

Además, las sustancias de prueba capaces de aumentar la proteína de la cadena pesada IIb de miosina son útiles para el tratamiento o la prevención de la enfermedad asociada con la reducción del músculo rápido. En particular, las sustancias de prueba se pueden usar como agentes para la prevención o el tratamiento de sarcopenia, o agentes para el tratamiento de ELA.

Además, las sustancias de prueba son útiles para un trasplante selectivo y terapéutico de las células madre mesenquimales, las células madre musculares, y/o mioblastos con el fin del tratamiento de daño muscular, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular por inactividad, insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, lesión externa o reconstrucción del tejido muscular tras el tratamiento quirúrgico. La sustancia capaz de aumentar la proteína de la cadena pesada IIb de miosina puede aumentar las células con la fibra de la cadena pesada IIb de miosina. En la terapia del trasplante, es importante que las células de las fibras de contracción lenta y las células de las fibras de contracción rápida se diferencien de manera inductiva a partir de las células madre mesenquimales, las células madre musculares y/o los mioblastos, de acuerdo con una propiedad del músculo esquelético de interés. En relación con esto, las sustancias capaces de aumentar la proteína de la cadena pesada IIb de miosina se puede usar de manera eficaz para la inducción de la diferenciación de células con la fibra de la cadena pesada IIb de miosina debido a la propiedad inductora de diferenciación de las células con la fibra de la cadena pesada IIb de miosina.

[Tabla 1]

	Fibra de contracción lenta		Fibra de contracción rápida		
	I/ β	IIa	IIb/x	IIb	
Velocidad de contracción	Lenta	Rápida (IIb > IIb/x > IIa)			
Tolerancia a la fatiga	Buena	Moderada	Mala	Mala	
Metabolismo	Oxidativo	Oxidativo/ Glucolítico	Oxidativo/ Glucolítico	Glucolítico	

Eficiencia energética	Excelente	Moderada	Mala	Mala
	(continuación)			
	Fibra de contracción lenta		Fibra de contracción rápida	
	I/ β	Ila	IId/x	Ilb
Color anatómico	Rojo	Rojo	Blanco	Blanco
Tamaño de la fibra muscular	Fino	Moderado	Grueso	Grueso

Además, los genes celulares de las moléculas (proteínas) productoras de células relacionadas con el cambio metabólico del músculo esquelético se pueden descubrir usando las sustancias implicadas en el cambio metabólico del músculo esquelético obtenido mediante el procedimiento de cribado de la presente invención. Se puede llevar a cabo una selección de tales genes y moléculas (proteínas) a partir de las células usando técnicas conocidas.

(Sustancia implicada en el cambio metabólico)

La sustancia implicada en un cambio metabólico mediante el procedimiento de cribado de la presente invención puede inducir la diferenciación de las células madre musculares y/o del mioblasto a la célula del miotubo (célula de fibra muscular). Además, las sustancias también pueden inducir la diferenciación de células madre mesenquimales a células madre musculares, mioblastos y células del miotubo (células de fibras musculares).

Las células madre mesenquimales no están particularmente limitadas, pero tienen una propiedad de inducción de la diferenciación, y se pueden diferenciar a células óseas, células musculares cardíacas, células cartilaginosas, células del tendón, células musculares esqueléticas, células adiposas o similares. Se considera que las células madre mesenquimales existen en los tejidos mesenquimales. Las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, las células madre mesenquimales derivadas de la pulpa dental, las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, las células madre mesenquimales derivadas de la placenta, las células madre mesenquimales derivadas del amnios, las células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical y de la sangre del cordón umbilical, se pueden usar como las células madre mesenquimales. Las sustancias implicadas en un cambio metabólico pueden diferenciar de manera inductiva, por ejemplo, las células madre mesenquimales anteriores a las células madre musculares, mioblastos y células del miotubo (células de fibras musculares). Por lo tanto, la sustancia implicada en un cambio metabólico puede ser a veces un ligando, un agonista o un antagonista. Es decir, en el procedimiento de cribado de la presente invención, se pueden cribar las sustancias candidatas capaces de inducir un cambio metabólico de las células que no sean las células del músculo esquelético.

Las sustancias implicadas en un cambio metabólico que se seleccionan sistemáticamente mediante el procedimiento de cribado de la presente invención no están particularmente limitadas, siempre que tengan un papel en el cambio metabólico, pero incluyen un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un aumento del músculo rápido, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con una reducción de músculo rápido, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un aumento del músculo lento, o un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con una reducción del músculo lento, como anteriormente. Además, se puede mencionar, un fármaco anticancerígeno, un agente inmunosupresor y un agente para el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con el estilo de vida.

(Selección sistemática de enfermedades asociadas con un aumento o una reducción del músculo rápido o lento)

Tal como se describe en el Ejemplo 3, la T3 (triyodotironina) conocida como una sustancia capaz de aumentar la fibra de músculo rápido de un músculo esquelético se puede seleccionar sistemáticamente mediante el procedimiento de cribado de la presente invención. Es decir, el agente para tratar la enfermedad asociada con la reducción de músculo rápido se puede seleccionar de manera sistemática mediante el procedimiento de cribado de la presente invención. Además, tal como se muestra en el Ejemplo 4, la IL-15 que provoca un aumento de las fibras musculares de tipo I en el músculo lento y provoca un aumento de las fibras musculares de tipo II en el músculo rápido, se puede seleccionar de manera sistemática mediante el procedimiento de cribado de la presente invención. Es decir, los agentes para tratar las enfermedades asociadas con el descenso del músculo lento y los descensos asociados con la reducción del músculo liso se pueden seleccionar de manera sistemática. Además, en el procedimiento de cribado de la presente invención, un aumento y una reducción de la expresión de las fibras de contracción lenta y de las fibras de contracción rápida se detectan directamente y, por lo tanto, los agentes para tratar la enfermedad asociada con la reducción del músculo rápido, los agentes para tratar la enfermedad asociada con el aumento del músculo rápido, los agentes para tratar la enfermedad asociada con el aumento del músculo liso, o los agentes para el tratamiento de la enfermedad asociada con la reducción del músculo lento se pueden seleccionar de manera sistemática.

(Selección sistemática de fármacos anticancerígenos)

El procedimiento para el cribado sustancias implicadas en un cambio metabólico de la presente invención se puede usar como un cribado de fármacos anticancerígenos.

Tal como se describe en el Ejemplo 3, la rapamicina que tiene una función anticancerígena se puede seleccionar de manera sistemática mediante el procedimiento de cribado de la presente invención. La rapamicina es un inhibidor de mTOR, y presenta una función anticancerígena suprimiendo una diana de rapamicina de mamífero (en lo sucesivo en el presente documento citada como mTOR). Se conoce una célula cancerosa en la que mTOR está activado de manera constante, y se considera que tal célula cancerosa se suprime mediante rapamicina. Además, la rapamicina suprime una proliferación de las células madre musculares (células satélite), tal como se describe en el Ejemplo 5. El mTOR se controla a través de un receptor activado por señales extracelulares (por ejemplo, insulina y factores de crecimiento de tipo insulina) y una serina/treonina cinasa intracelular (es decir, PI3 cinasa, AKT). Además, la vía de señalización de mTOR también se controla mediante la proteína cinasa activada por AMP y regula la supervivencia de las células y la proliferación de las células. En el procedimiento de cribado de la presente invención, los compuestos capaces de suprimir o mejorar varios factores tales como la serina/treonina cinasa o la proteína cinasa activada por AMP implicada en la vía de señalización de mTOR, se pueden seleccionar de manera sistemática. Después, se espera que los compuestos seleccionados de forma sistemática presenten una función de un fármaco anticancerígeno del mismo modo que el inhibidor de mTOR. Por tanto, los fármacos anticancerígenos que no sean rapamicina unida a mTOR se pueden seleccionar mediante el procedimiento de cribado de la presente invención. Además, los fármacos anticancerígenos que no sean el compuesto que muestra una función anticancerígena relacionada con la vía de señalización de mTOR, se pueden seleccionar de manera sistemática. Es decir, el procedimiento de cribado de la presente invención se puede usar para el cribado de los fármacos anticancerígenos.

(Selección sistemática de agente inmunosupresor)

El procedimiento de cribado de las sustancias implicadas en un cambio metabólico de la presente invención se puede usar como un cribado de los agentes inmunosupresores.

Tal como se describe en el Ejemplo 3, la rapamicina que tiene una función inmunosupresora se puede seleccionar de manera sistemática mediante el procedimiento de cribado de la presente invención. La rapamicina es un inhibidor de mTOR, y presenta una función inmunosupresora suprimiendo mTOR. El mTOR se controla a través de un receptor activado por señales extracelulares (por ejemplo, insulina y factor de crecimiento de tipo insulina) y una serina/treonina cinasa intracelular (es decir, PI3 cinasa, AKT). Además, la vía de señalización de mTOR también se controla mediante la proteína cinasa activada por AMP y regula la supervivencia de las células y la proliferación de las células. En el procedimiento de cribado de la presente invención, los compuestos capaces de suprimir o mejorar varios factores tales como la serina/treonina cinasa o la proteína cinasa activada por AMP implicada en la vía de señalización de mTOR, se pueden seleccionar de manera sistemática. Después, se espera que tales compuestos presenten una función de un agente inmunosupresor del mismo modo que el inhibidor de mTOR. Por tanto, los compuestos que tienen una función inmunosupresora que no sean rapamicina unida a mTOR se pueden seleccionar mediante el procedimiento de cribado de la presente invención. Además, los agentes inmunosupresores que no sean el compuesto que muestra una función inmunosupresora relacionada con la vía de señalización de mTOR, se pueden seleccionar de manera sistemática. Es decir, el procedimiento de cribado de la presente invención se puede usar para el cribado de los agentes inmunosupresores.

(Selección sistemática de agente para el tratamiento de enfermedad relacionada con el estilo de vida)

El procedimiento de cribado de las sustancias implicadas en un cambio metabólico de la presente invención se puede usar como un cribado de los agentes para tratar una enfermedad relacionada con el estilo de vida.

Tal como se describe en los Ejemplos 3 y 4, el agonista del receptor FGF21 y $\beta 3$ (CL316243) que tiene una función de diferenciación de un adipocito blanco a un adipocito marrón, se puede seleccionar de manera sistemática mediante el procedimiento de cribado de la presente invención. El adipocito marrón puede generar una gran cantidad de calor mediante el quemado de grasa y de azúcar, en comparación con el adipocito blanco. Por tanto, si los adipocitos marrones aumentan, se consume la grasa y es útil para el tratamiento de la obesidad que es una causa significativa de la misma. Después, si se mejora la obesidad, es útil para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estilo de vida tales como diabetes, hiperpiesia, arteriosclerosis, enfermedad vascular cerebral o alteración cardiovascular. Por lo tanto, el agonista del receptor FGF21 y $\beta 3$ (CL316243) se puede usar como los agentes terapéuticos para la enfermedad relacionada con el estilo de vida mediante la diferenciación de los adipocitos blancos en adipocitos marrones.

Además, los compuestos capaces de diferenciar adipocitos blancos en adipocitos marrones que no sean el antagonista del receptor FGF21 y $\beta 3$ (CL316243), es decir, los agentes terapéuticos para la enfermedad relacionada con el estilo de vida, se pueden seleccionar de manera sistemática mediante el procedimiento de cribado de la presente invención. Es decir, el procedimiento de cribado de la presente invención se puede usar para el cribado de los agentes terapéuticos para la enfermedad relacionada con el estilo de vida.

Además, tal como se muestra en el Ejemplo 4, la IL-15 que es eficaz para el tratamiento de obesidad mediante la reducción de células adiposas viscerales se puede seleccionar de manera sistemática mediante el procedimiento de cribado de la presente invención. Por tanto, los compuestos que son eficaces para el tratamiento de la obesidad mediante un mecanismo que no sea el mecanismo de diferenciación de adipocitos blancos en adipocitos marrones, se pueden seleccionar de manera sistemática mediante el procedimiento de cribado de la presente invención.

El kit de selección sistemática de la presente invención se puede usar para el procedimiento de cribado anterior. Por lo tanto, el kit de cribado de la presente invención contiene las células madre musculares o mioblastos o las células de los miotubos diferenciadas de manera inductiva a partir de las mismas descritas en el objeto "[1] célula madre o mioblasto". Además, el kit de selección sistemática de la presente invención puede contener un agente para detectar ARNm del gen de fusión de cadena pesada I de miosina en el que un gen de cadena pesada I de miosina y un gen o proteína fluorescente o gen de foto proteína, el gen de fusión de la cadena pesada IIa de miosina en el que un gen de la cadena pesada IIa de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, un gen de fusión de la cadena pesada IIb de miosina en el que un gen de la cadena pesada IIb de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan. Específicamente, el kit de selección sistemática puede contener un agente para RT-PCR, tal como una sonda, cebadores y una enzima.

En otra realización, el kit de selección sistemática de la presente invención puede contener un agente para detectar la proteína de la cadena pesada I de miosina o la proteína fluorescente o la fotoproteína unida a la misma, la proteína de la cadena pesada IIa de miosina o la proteína o fotoproteína unida a la misma, la proteína de la cadena pesada IIb de miosina o la proteína fluorescente o la fotoproteína unida a la misma. En particular, el kit de selección sistemática puede contener un anticuerpo, una enzima y similares.

Además, el kit de selección sistemática descrito en el presente documento puede contener un agente para medir la cantidad de la proteína fluorescente o fotoproteína. En particular, se puede mencionar una luciferina para la reacción luminiscente, o una peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina para la reacción cromogénica.

Las células madre musculares o los mioblastos o las células del miotubo diferenciadas de manera inductiva a partir de las mismas de la presente invención se pueden usar para preparar el kit para el cribado de sustancias implicadas en un cambio metabólico. Además, las células madre musculares o los mioblastos o las células del miotubo diferenciadas de manera inductiva a partir de las mismas de la presente invención se pueden usar como una herramienta para el cribado de sustancias implicadas en un cambio metabólico. Preferentemente, la sustancia implicada en el cambio metabólico es un medicamento seleccionado de un grupo que consiste en un agente para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con una reducción del músculo lento, el agente para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con un aumento del músculo lento, el agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con una reducción de músculo rápido, el agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un aumento de músculo rápido, el fármaco anticancerígeno, el agente inmunosupresor y el agente para el tratamiento o la prevención de la enfermedad relacionada con el estilo de vida.

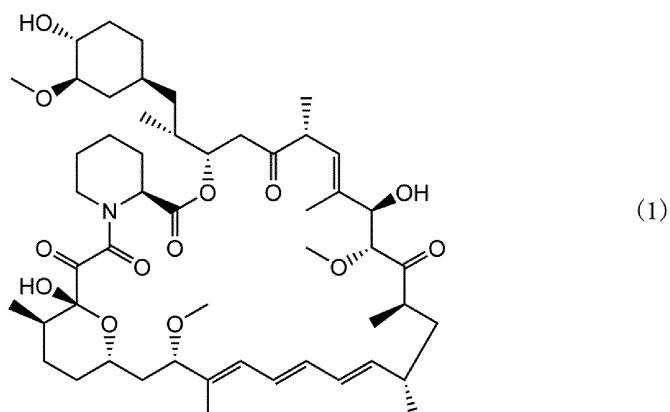
[3] Composición farmacéutica

(1) Composición farmacéutica que comprende rapamicina o un derivado del mismo

La composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con debilidad del músculo esquelético, atrofia muscular o daño muscular comprende rapamicina o un derivado del mismo.

La rapamicina es un compuesto de la fórmula (1):

[Compuesto químico 1]



Se documentó que la rapamicina tiene un efecto inmunosupresor, un efecto supresor del cáncer, un efecto de prolongación de la vida y un efecto de inhibición de un músculo liso. Sin embargo, no se sabe si la rapamicina provoca que la cadena pesada I de miosina aumente u que la cadena pesada IIb de miosina se reduzca. Además, la composición farmacéutica puede comprender el derivado de rapamicina. El derivado de rapamicina incluye los descritos en el informe de Seth A. Wader y col. (Journal of Clinical Investigation, 2011, (EE.UU.) col. 121, págs.

1231-41).

La enfermedad asociada con debilidad del músculo esquelético, atrofia muscular o daño muscular no está particularmente limitada, pero incluye atrofia muscular por inactividad, daño a los nervios motores, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, obesidad sarcopénica, arteriosclerosis con atrofia muscular, atrofia muscular asociada con enfermedad vascular cerebral, amiotrofia diabética de tipo I o de tipo II, daño muscular, lesión externa, distrofia muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia congénita o reconstrucción de tejido muscular tras tratamiento quirúrgico. La composición farmacéutica que comprende rapamicina se puede usar de manera directa para tratar o prevenir el desuso de atrofia muscular por inactividad, daño a los nervios motores, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, obesidad sarcopénica, arteriosclerosis con atrofia muscular, la atrofia muscular asociada con enfermedad vascular cerebral, o la amiotrofia diabética de tipo I o de tipo II.

Además, la composición farmacéutica se puede usar para promover la diferenciación o la proliferación de las células madre musculares y/o los mioblastos en el trasplante selectivo, terapéutico de las células madre mesenquimales, las células madre musculares, y/o mioblastos con el fin del tratamiento de daño muscular, lesión externa, distrofia muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular por inactividad, insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia congénita o reconstrucción de tejido muscular tras tratamiento quirúrgico. Además, la composición farmacéutica que comprende rapamicina de la presente invención es útil en conjunto con una terapia de rehabilitación (terapia de ejercicio) y una terapia de nutrición.

(2) Composición farmacéutica que comprende el factor 21 de crecimiento de fibroblastos

La composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con debilidad del músculo esquelético, atrofia muscular o daño muscular comprende el factor 21 de crecimiento de fibroblastos (en lo sucesivo, en el presente documento, a veces se cita como FGF21). El factor 21 de crecimiento de fibroblasto es una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 1 y pertenece a la familia del factor de crecimiento de fibroblasto (familia FGF). Se sabe que el FGF21 muestra un efecto sistemático. Sin embargo, no se sabe si FGF21 provoca que aumente la cantidad de cadena pesada I de miosina I. En relación con esto, la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 es el factor 21 de crecimiento de fibroblastos de ratón y la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 es el factor 21 de crecimiento de fibroblastos humano. El factor 21 de crecimiento de fibroblastos, que puede usarse un insecticida como un principio activo de la composición farmacéutica de la presente invención, no se limita al factor 21 de crecimiento de fibroblastos de ratón o al factor 21 de crecimiento de fibroblastos humano, siempre que tenga una función de cambio metabólico en las células madre musculares. Por ejemplo, el factor 21 de crecimiento de fibroblastos comprende un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que se delecionan, se sustituyen y/o se insertan uno o múltiples aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del factor 21 de crecimiento de fibroblastos (SEQ ID NO: 1) es el factor 21 de crecimiento de fibroblastos humano (SEQ ID NO: 2) y que presenta la propiedad de inducción de diferenciación de las células que tienen capacidad de diferenciación a células del miotubo. En particular, se puede usar el factor 21 de crecimiento de fibroblastos, por ejemplo, de vaca, caballo, oveja, cabra, rata, perro o gato.

La enfermedad asociada con debilidad del músculo esquelético, atrofia muscular o daño muscular no está particularmente limitada, pero incluye atrofia muscular por inactividad, daño a los nervios motores, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, obesidad sarcopénica, arteriosclerosis con atrofia muscular, atrofia muscular asociada con enfermedad vascular cerebral, amiotrofia diabética de tipo I o de tipo II, daño muscular, lesión externa, distrofia muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia congénita o reconstrucción de tejido muscular tras tratamiento quirúrgico. La composición farmacéutica que comprende el factor 21 de crecimiento de fibroblastos se puede usar directamente para el tratamiento o la prevención de atrofia muscular por inactividad, daño a los nervios motores, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, obesidad sarcopénica, arteriosclerosis con atrofia muscular, la atrofia muscular asociada con enfermedad vascular cerebral, o la amiotrofia diabética de tipo I o de tipo II.

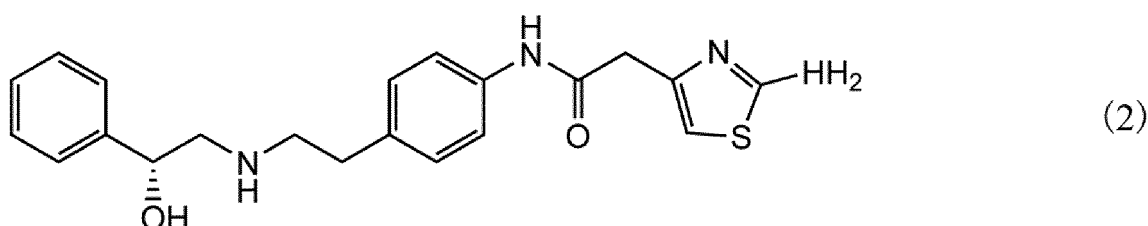
Además, la composición farmacéutica se puede usar para promover la proliferación diferencial de células madre mesenquimales, células madre musculares y/o mioblastos en el trasplante selectivo y terapéutico de las células madre mesenquimales, las células madre musculares, y/o mioblastos con el fin del tratamiento de daño muscular, lesión externa, distrofia muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de

glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular por inactividad, insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia congénita o reconstrucción de tejido muscular tras tratamiento quirúrgico. Además, se espera que la composición farmacéutica que comprende el factor 21 de crecimiento de fibroblastos de la presente invención recupere una capacidad de resistencia del músculo esquelético, en una administración individual o en conjunto con una terapia de ejercicio y una terapia nutricional.

(3) Composición farmacéutica que comprende un agonista del receptor $\beta 3$ o un derivado del mismo

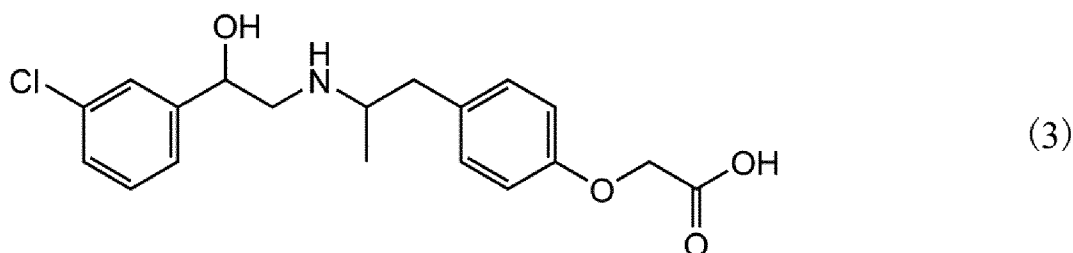
La composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con debilidad del músculo esquelético, atrofia muscular o daño muscular comprende un agonista del receptor $\beta 3$ o un derivado del mismo. El agonista del receptor $\beta 3$ no está limitado, siempre y cuando sea un agonista del receptor de adrenalina $\beta 3$, pero incluye mirabegron o noradrenalina de la fórmula (2):

[Compuesto químico 2]



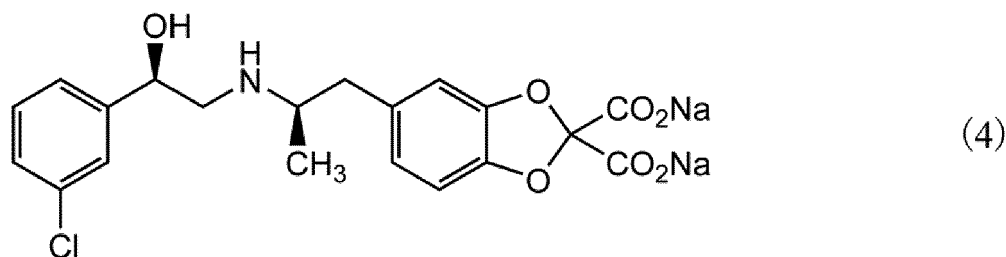
BRL37344 de la fórmula (3):

[Compuesto químico 3]



CL316243 de la fórmula (4):

[Compuesto químico 4]



o derivados de los mismos. Se considera que el receptor $\beta 3$ existe en las células adiposas, en el tracto digestivo o en el hígado, y se relaciona con un metabolismo basal.

La enfermedad asociada con debilidad del músculo esquelético, atrofia muscular o daño muscular no está particularmente limitada, pero incluye atrofia muscular por inactividad, daño a los nervios motores, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, obesidad sarcopénica, arteriosclerosis con atrofia muscular, atrofia muscular asociada con enfermedad vascular cerebral, amiotrofia diabética de tipo I o de tipo II, daño muscular, lesión externa, distrofia muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia congénita o reconstrucción de tejido muscular tras tratamiento quirúrgico. La composición farmacéutica que comprende el agonista del receptor $\beta 3$ se puede usar de manera directa para

tratar o prevenir el desuso de atrofia muscular por inactividad, daño a los nervios motores, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, obesidad sarcopénica, arteriosclerosis con atrofia muscular, la atrofia muscular asociada con enfermedad vascular cerebral, o la amiotrofia diabética de tipo I o de tipo II.

Además, la composición farmacéutica se puede usar para promover la proliferación diferencial de las células madre musculares y/o los mioblastos en el trasplante selectivo, terapéutico de las células madre mesenquimales, las células madre musculares, y/o mioblastos con el fin del tratamiento de daño muscular, lesión externa, distrofia muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular por inactividad, insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia congénita o reconstrucción de tejido muscular tras tratamiento quirúrgico.

La formulación de la composición farmacéutica de la presente invención no está limitada. Sin embargo, se pueden mencionar agentes orales, tales como polvos, gránulos sutiles, gránulos, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes, extractos o bolas; o agentes parenterales, tales como inyecciones, líquido para uso externo, pomadas, supositorios, cremas para la administración local o gotas oculares.

El agente oral anterior se puede preparar de acuerdo con los procedimientos convencionales, usando materiales de relleno, tales como gelatina, alginato de sodio, almidón, maicena, sacarosa, lactosa, glucosa, manitol, carboximetil celulosa, dextrina, polivinil pirrolidona, celulosa cristalina, lecitina de soja, sacarosa, éster de ácido graso, talco, estearato de magnesio, polietilenglicol, silicato de magnesio, anhídrido silicio o silicato de aluminio sintético; aglutinantes, disgregantes, detergentes, lubricantes, acelerador de flujo, diluyentes, conservantes, colorantes, aromas, correctores, estabilizantes, humectantes, antisépticos, antioxidantes o similares.

Los ejemplos de la administración parenteral incluyen la inyección (por ejemplo, inyección subcutánea o inyección intravenosa), la administración rectal o similares. Entre ellos, preferentemente se usan las inyecciones.

Por ejemplo, en una dirección de las inyecciones, un disolvente acuoso tal como solución salina normal o solución de Ringer, soluciones no acuosas tales como aceite vegetal o éster de ácido graso, un agente tonificante tal como glucosa o cloruro de sodio, un agente solubilizante, un agente estabilizante, un agente antiséptico, un agente de suspensión o un agente emulsionante, se pueden usar opcionalmente, además del principio activo.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por medio de una formulación de liberación sostenida usando un polímero de liberación sostenida. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención se introduce en un gránulo de polímero de etileno vinil acetato, y después, el gránulo se puede implantar quirúrgicamente en un tejido que se va a tratar o a prevenir.

La composición farmacéutica puede contener, pero sin limitación, del 0,01 al 99 % en peso, preferentemente del 0,1 al 80 % en peso, del principio activo.

Una dosis de la composición farmacéutica de la presente invención se puede determinar de manera apropiada de acuerdo con, por ejemplo, la edad, el sexo, el peso corporal o el grado de síntomas de cada paciente, el tipo de cada ingrediente activo, el tipo de cada enfermedad, la vía de administración o similares, y la dosificación determinada se puede administrar por vía oral o por vía parenteral.

Además, la forma de dosificación para la administración de la composición farmacéutica de la presente invención no se limita a un fármaco. Es decir, se puede administrar como un alimento o como una bebida de diversas formas, tal como un alimento funcional, un alimento saludable (incluyendo bebida) o un pienso para animales.

[4] Inductor de la diferenciación de la célula del miotubo

(1) Inductor de la diferenciación de la célula del miotubo que comprende rapamicina o derivado de la misma

El inductor de la diferenciación de una célula de miotubo de la presente invención comprende rapamicina o el derivado como un principio activo, y puede diferenciar de manera inductiva las células que tienen capacidad de diferenciación de células del miotubo a células del miotubo. Como derivados de rapamicina, se pueden usar los derivados descritos en la sección "Composición farmacéutica".

Las células que tienen capacidad de diferenciación de células del miotubo no están particularmente limitadas, sino que incluyen, por ejemplo, mioblastos, células madre musculares, células madre mesenquimales, células madre embrionarias (células ME) o células madre pluripotentes inducidas (células MPi).

El inductor de diferenciación de una célula de miotubo de la presente invención puede inducir los mioblastos, las células madre musculares y/o las células madre mesenquimales *in vivo*, en el trasplante terapéutico de mioblastos, células madre musculares y/o células madre mesenquimales a pacientes de, por ejemplo, daño muscular, lesión externa, distrofia muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento

de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular por inactividad, insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia congénita o reconstrucción de tejido muscular tras tratamiento quirúrgico. Las enfermedades anteriores se pueden tratar mediante el trasplante de los mioblastos inducidos, de las células madre musculares y/o de las células madre mesenquimales al cuerpo del paciente.

En particular, el inductor de diferenciación de una célula de miotubo que comprende rapamicina presenta una excelente capacidad de inducción de células de la fibra de contracción lenta.

(2) Inductor de la diferenciación de la célula del miotubo que comprende factor 21 de crecimiento de fibroblastos

El inductor de la diferenciación de una célula de miotubo de la presente invención comprende factor 21 de crecimiento de fibroblastos como un principio activo, y puede diferenciar de manera inductiva las células que tienen capacidad de diferenciación de células del miotubo a células del miotubo.

Las células que tienen capacidad de diferenciación de células del miotubo no están particularmente limitadas, sino que incluyen, por ejemplo, mioblastos, células madre musculares, células madre mesenquimales, células madre embrionarias (células ME) o células madre pluripotentes inducidas (células MPi).

El inductor de diferenciación de una célula de miotubo de la presente invención puede inducir los mioblastos, las células madre musculares y/o las células madre mesenquimales *in vivo*, en el trasplante terapéutico de mioblastos, células madre musculares y/o células madre mesenquimales a pacientes de, por ejemplo, daño muscular, lesión externa, distrofia muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular por inactividad, insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia congénita o reconstrucción de tejido muscular tras tratamiento quirúrgico. Las enfermedades anteriores se pueden tratar mediante el trasplante de los mioblastos inducidos, de las células madre musculares y/o de las células madre mesenquimales al cuerpo del paciente.

En particular, el inductor de diferenciación de una célula de miotubo que comprende factor 21 de crecimiento de fibroblastos presenta una excelente capacidad de inducción de células de la fibra de contracción lenta.

(3) Inductor de la diferenciación de la célula del miotubo que comprende agonista del receptor $\beta 3$ o derivado del mismo

El inductor de la diferenciación de una célula de miotubo de la presente invención comprende agonista del receptor $\beta 3$ o el derivado como un principio activo, y puede diferenciar de manera inductiva las células que tienen capacidad de diferenciación de células del miotubo a células del miotubo. Como derivados del agonista del receptor $\beta 3$, se pueden usar los derivados descritos en la sección "Composición farmacéutica".

Las células que tienen capacidad de diferenciación de células del miotubo no están particularmente limitadas, sino que incluyen, por ejemplo, mioblastos, células madre musculares, células madre mesenquimales, células madre embrionarias (células ME) o células madre pluripotentes inducidas (células MPi).

El inductor de diferenciación de una célula de miotubo de la presente invención puede inducir los mioblastos, las células madre musculares y/o las células madre mesenquimales *in vivo*, en el trasplante terapéutico de mioblastos, células madre musculares y/o células madre mesenquimales a pacientes de, por ejemplo, daño muscular, lesión externa, distrofia muscular, miopatía distal, miopatía congénita, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, miopatía mitocondrial, miopatía esteroide, miopatía inflamatoria, miopatía endocrina, miopatía por almacenamiento de lípidos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular por inactividad, insuficiencia cardíaca crónica, sarcopenia, miastenia gravis autoinmune, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de miastenia congénita o reconstrucción de tejido muscular tras tratamiento quirúrgico. Las enfermedades anteriores se pueden tratar mediante el trasplante de los mioblastos inducidos, de las células madre musculares y/o de las células madre mesenquimales al cuerpo del paciente.

En particular, el inductor de diferenciación de una célula de miotubo que comprende agonista del receptor $\beta 3$ presenta una excelente capacidad de inducción de células de la fibra de contracción lenta.

Una concentración y un tiempo de reacción del inductor de diferenciación de una célula del miotubo de la presente invención se determinan de manera apropiada de acuerdo con el tipo de células o una condición de cultivo.

Ejemplos

La presente invención se describirá ahora con mayor detalle por, pero de ninguna manera se limita a, los siguientes Ejemplos.

<<Ejemplo de preparación 1>>

En este ejemplo de preparación, se crea un ratón genomanipulado por inserción en el que el gen de fusión de la cadena pesada I de miosina, un gen de fusión de la cadena pesada IIa de miosina, un gen de fusión de la cadena pesada IId/x de miosina, y un gen de fusión de la cadena pesada IIb de miosina se introdujeron. Un gen de fusión de la cadena pesada IIa de miosina y el gen de la proteína fluorescente Sirius, un gen de fusión del gen de la cadena pesada IId/x de miosina y el gen de la proteína fluorescente mCherry y un gen de fusión del gen de la cadena pesada IId/x de miosina y el gen de la proteína fluorescente mCerulean, se introdujeron en el ratón MyHC1-YFP genomanipulado por inserción (National Institute of Health) en el que se introdujo el gen de fusión del gen de la cadena pesada I de miosina y la proteína fluorescente YFP.

Con el fin de preparar un vector de direccionamiento para el ratón genomanipulado por inserción, la biblioteca BAC del ratón macho C57BL/6J, es decir, RP24-149P22 y RP24-374D24 se encargaron de BACPAC Resources, y las secuencias genómicas diana del gen MyHCIIa, el gen MyHCIIb, y el gen MyHCIIId/x se subclonaron respectivamente. Para la subclonación de las secuencias BAC, se usó un kit de subclonación de BAC de recombinación de Red/ET (Gene Bridges), y el ADN de aproximadamente 10 kb se introdujo en un plásmido en el que se insertó un marcador de selección negativa (es decir, MC1-TK). Las secuencias de ADNc de una proteína fluorescente del intervalo ultravioleta, es decir, Sirius, una proteína roja fluorescente, es decir, mCherry, y proteína fluorescente azul, es decir, mCerulean se clonaron mediante PCR y se insertaron a los lados del extremo 5' terminal de los genes MyHCIIa, IIb y IId/x en marco del codón de iniciación de la traducción del mismo (ATG), respectivamente. Además, se insertó un casete de PGK-gb2-Neomicina (Gene Bridges) intercalado por secuencias FRT en el vector de direccionamiento como un marcador de selección positiva (Tabla 1). El vector de direccionamiento, que se había hecho lineal, se introdujo en células ME de ratón mediante electroporación. Tras una selección positiva usando G418, los clones de ME recombinantes homólogos se identificaron mediante PCR y análisis por transferencia de southern. Después se preparó un ratón quimérico mediante un procedimiento de agregación usando el clon ME identificado, y la introducción del gen de fusión a las células de la línea germinal se confirmó mediante genotipado de la descendencia obtenida mediante el cruzamiento del ratón quimérico con un ratón C57BL/6 macho.

<<Ejemplo 1>>

En este Ejemplo, las células madre musculares (células satélite) se separaron del ratón genomanipulado por inserción preparado en el Ejemplo de preparación 1 mediante una selección negativa y una selección positiva usando FACS.

A los músculos separados del ratón, se les añadió dos veces la cantidad de solución de colagenasa al 0,2 % en peso, y la mezcla se agitó durante 1 hora. La solución de la mezcla se trituró usando una aguja de calibre 18, y después se agitó a 37 °C durante 30 minutos. La solución de la mezcla se obtuvo a través de un filtro de células con un tamaño de poro de 40 µm, y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y los eritrocitos se hemolizaron añadiendo una solución de cloruro de amonio para retirar los eritrocitos a un sedimento y se permitió que reposase en hielo durante 30 segundos. Se añadió PBS (FBS al 2 %) a la misma y la mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante, y el sedimento se suspendió usando PBS (FBS al 2 %, SM/C-2.6-biotina (x200)) y se dejó reposar en hielo durante 30 minutos. Se añadió PBS (FBS al 2 %) a la misma y todo ello se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante, y el sedimento se suspendió usando PBS (FBS al 2 %, CD31-FITC (x400), CD45-FITC (x800), Sca1-PE (x400), Estreptavidina-APC(x400)). Después de dejar reposar en hielo durante 30 minutos, se añadió PBS (FBS al 2 %) a la suspensión y todo ello se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante, y el sedimento se suspendió usando PBS (FBS al 2 %). La suspensión se obtuvo a través de un filtro de células, y se añadió 1 mg/ml de PI (x500) a la misma. Las células madre musculares (células satélite) se separaron mediante análisis usando FACS.

<<Ejemplo 2>>

En este Ejemplo, se obtuvieron las células inmortalizadas de las células madre musculares (células satélite). Con el fin de obtener las células inmortalizadas, se usó el ratón inmortalizado que tiene un promotor H-2Kb y un antígeno T grande de SV40 termosensible inducible por IFN-γ. En el ratón inmortalizado, se expresa un antígeno T grande de SV40 mediante IFN-γ, y se puede inducir una inmortalización de una célula.

El ratón genomanipulado por inserción preparado en el Ejemplo de preparación 1 y el ratón inmortalizado se cruzaron para obtener descendencia. Las células madre musculares (células satélite) se separaron de la descendencia obtenida de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1. Se indujo una inmortalización de las células madre musculares mediante el cultivo de las mismas a 33 °C, en presencia de 10 ng/ml de IFN-γ. El antígeno T grande de SV40 termosensible se degradó mediante el cultivo de las células resultantes a 37 °C, para obtener las células madre musculares inmortalizadas (células satélite).

En este Ejemplo, se probaron 27 compuestos de ensayo mediante el procedimiento de cribado de las sustancias implicadas en un cambio metabólico usando las células madre musculares inmortalizadas (células satélite) preparadas en el Ejemplo 2.

Las células madre musculares inmortalizadas (1×10^5) se sembraron en una placa de 60 mm o las células madre

musculares inmortalizadas (2×10^3) se sembraron en una placa de 96 pocillos. Las células se cultivaron en DMEM, que contiene FBS al 20 %, bFGF (10 ng/ml) y IFN γ (10 ng/ml) a 33 °C durante 1 día y después, se cultivaron en DMEM que contiene HS al 5 % a 37 °C durante 3 días. Posteriormente, las sustancias de prueba se diluyeron de forma seriada por DMEM que contiene suero de caballo al 5 % a una tasa de dilución apropiada, y las sustancias diluidas se añadieron a las placas, respectivamente. Después de dos días de tratamiento, se observaron las fluorescencias de YFP, Sirius, mCherry y mCerulean en las células vivas usando un microscopio de fluorescencia, y se midió el número de células que genera la respectiva fluorescencia. La Figura 3A muestra las fotografías de las células del miotubo en las que se expresó la YFP unida al gen de la cadena pesada I de miosina, y células del miotubo en las que se expresó la Sirius unida a un gen de la cadena pesada IIa de miosina. La Figura 3B muestra las fotografías de las células del miotubo en las que se expresó la mCerulean unida al gen de la cadena pesada IIb de miosina y células del miotubo en las que se expresó la mCherry unida a un gen de la cadena pesada IIb de miosina.

En el procedimiento de cribado, una de las sustancias de prueba, es decir, la rapamicina aumentó las células que expresan la proteína de la cadena pesada I de miosina y redujo las células que expresan la proteína de la cadena pesada IIb de miosina. Los resultados de la rapamicina se muestran en la Figura 4. El término "nega" se refiere a un control negativo en el que no se añadió rapamicina. En comparación con el control negativo, la rapamicina aumentó el número de células del miotubo que generan fluorescencia de YFP, y redujo el número de células del miotubo que generan fluorescencia de mCherry. Específicamente, una zona de células que expresan la proteína de la cadena pesada I de miosina aumentó del 25,3 % al 60,9 %, y una zona de células que expresan la proteína de la cadena pesada IIb de miosina se redujo del 41,8 % al 8,4 % poniendo en contacto las células del miotubo con 4 nM de rapamicina.

Es decir, la rapamicina puede mejorar una función metabólica del músculo esquelético, y por lo tanto, se puede usar como el agente para el tratamiento de enfermedades asociadas con debilidad del músculo esquelético, atrofia muscular o daño muscular. En particular, la rapamicina es útil como el agente para el tratamiento de la enfermedad asociada con una reducción del músculo lento.

Además, en el procedimiento de cribado, una de las sustancias de prueba, es decir, el factor 21 de crecimiento de fibroblastos de ratón (FGF21) aumentó las células que expresan la proteína de la cadena pesada I de miosina. Los resultados de FGF21 se muestran en la Figura 5. El término "nega" se refiere a un control negativo en el que no se añadió factor 21 de crecimiento de fibroblasto de ratón (FGF21). En comparación con el control negativo, el factor 21 de crecimiento de fibroblastos aumentó el número de células del miotubo que generan fluorescencia de YFP. Sin embargo, el número de células del miotubo que generan fluorescencia de mCherry permanece estático para el FGF21. Específicamente, una zona de células que expresan la proteína de la cadena pesada I de miosina del 28,4 % al 40,6 %, 48,0 % y 54,9 %, poniendo en contacto las células del miotubo con 1 nM, 10 nM y 100 nM del factor 21 de crecimiento de fibroblastos de ratón, respectivamente.

Es decir, el FGF21 puede mejorar una función metabólica del músculo esquelético, y por lo tanto, se puede usar como el agente para el tratamiento de enfermedades asociadas con debilidad del músculo esquelético, atrofia muscular o daño muscular. En particular, el FGF21 es útil como el agente para el tratamiento de la enfermedad asociada con una reducción del músculo lento.

Además, una de las sustancias de prueba, es decir, el T3 (triiodotironina) aumentó las células que expresan la proteína de la cadena pesada IIb de miosina. Los resultados de T3 se muestran en la Figura 6. Una zona de células que expresan la proteína de la cadena pesada IIb de miosina del 44,5 % al 71,3 % y 70,0 %, poniendo en contacto las células del miotubo en contacto con 100 nM y 500 nM de T3 (triiodotironina), respectivamente. Es decir, el T3 puede mejorar una función metabólica del músculo esquelético, y por lo tanto, se puede usar como el agente para el tratamiento de enfermedades asociadas con debilidad del músculo esquelético, atrofia muscular o daño muscular. En particular, el T3 es útil como el agente para el tratamiento de la enfermedad asociada con una reducción del músculo rápido. Se sabe que el T3 (triiodotironina) aumenta la fibra del músculo rápido del músculo esquelético. Los resultados de este Ejemplo son consistentes con los conocimientos bien sabidos, y por lo tanto, muestran que el sistema de selección sistemática de la presente invención es útil.

<<Ejemplo 4>>

En este ejemplo, se probaron compuestos de prueba adicionales usando las células madre musculares inmortalizadas (células satélite) preparadas en el Ejemplo 2. El procedimiento de cribado de sustancias implicadas en un cambio metabólico se realizó repitiendo un procedimiento del Ejemplo 3.

En el procedimiento de cribado, una de las sustancias de prueba, es decir, la IL-15 aumentó las células que expresan la proteína de la cadena pesada I de miosina y aumentó las células que expresan la proteína de la cadena pesada IIb de miosina. Los resultados de IL-15 se muestran en la Figura 7. El término "nega" se refiere a un control negativo en el que no se añadió IL-15. En comparación con el control negativo, la IL-15 aumentó el número de células del miotubo que generan fluorescencia de YFP y aumentó el número de células del miotubo que generan fluorescencia de mCherry. Específicamente, una zona de células que expresan la proteína de la cadena pesada I de miosina del 19,5 % al 35,0 % o al 36,1 %, poniendo en contacto las células del miotubo con 100 ng/ml o 500 ng/ml

de IL-15, respectivamente, y una zona de células que expresan la proteína de la cadena pesada IIb de miosina aumentó del 36,2 % al 53,0 % poniendo en contacto las células del miotubo con 500 ng/ml de IL-15.

Es decir, el IL-15 puede mejorar una función metabólica del músculo esquelético, y por lo tanto, se puede usar como el agente para el tratamiento de enfermedades asociadas con debilidad del músculo esquelético, atrofia muscular o daño muscular. En particular, el IL-15 es útil como el agente para el tratamiento de la enfermedad asociada con una reducción del músculo lento y/o del músculo rápido.

Además, en el procedimiento de cribado, una de las sustancias de prueba, es decir, el agonista del receptor $\beta 3$ (CL316243) aumentó las células que expresan la proteína de la cadena pesada I de miosina. Los resultados de CL316243 se muestran en la Figura 8. El término "nega" se refiere a un control negativo en el que no se añadió agonista del receptor $\beta 3$ (CL316243). En comparación con el control negativo, el agonista del receptor $\beta 3$ (CL316243) aumentó el número de células del miotubo que generan fluorescencia de YFP. Sin embargo, el número de células del miotubo que generan fluorescencia de mCherry permanece estático para el agonista del receptor $\beta 3$ (CL316243). Específicamente, una zona de células que expresan la proteína de la cadena pesada I de miosina del 28,4 % al 49,3 %, 53,8 % y 57,8 %, poniendo en contacto las células del miotubo con 1 nM, 10 nM y 100 nM de agonista receptor $\beta 3$ (CL316243), respectivamente.

Es decir, el agonista del receptor $\beta 3$ puede mejorar una función metabólica del músculo esquelético, y por lo tanto, se puede usar como el agente para el tratamiento de enfermedades asociadas con debilidad del músculo esquelético, atrofia muscular o daño muscular. En particular, el agonista del receptor $\beta 3$ es útil como el agente para el tratamiento de la enfermedad asociada con una reducción del músculo lento.

<<Ejemplo 5>>

La rapamicina se obtuvo mediante el procedimiento de cribado del cambio metabólico del Ejemplo 3. En este Ejemplo, se examinó si se podía o no seleccionar sistemáticamente la rapamicina mediante el procedimiento de cribado de inhibición de la proliferación usando células satélite.

Las células madre musculares inmortalizadas (1×10^4) se sembraron en una placa de 35 mm. Las células se cultivaron en DMEM, que contiene FBS al 20 %, bFGF (10 ng/ml), e IFN γ (10 ng/ml) a 33 °C durante 1 día, y después la rapamicina se diluyó a una concentración de 5 nM por un DMEM que contiene FBS al 5 % y la rapamicina diluida se añadió a la placa. Se contó el número de células después de cinco días de cultivo. La FIG. 9 muestra una micrografía de las células madre musculares inmortalizadas tras 5 días de cultivo (A) y un gráfico que muestra que aumentó el número de células (B). El término "Control" se refiere un control negativo en el que no se añadió rapamicina. La proliferación de las células satélite se inhibió añadiendo rapamicina.

Aplicabilidad industrial

Las sustancias implicadas en el cambio metabólico del músculo esquelético se pueden seleccionar de manera sistemática mediante el procedimiento de cribado usando la célula madre muscular o el mioblasto de la presente invención. Por lo tanto, los agentes para el tratamiento o la prevención de las enfermedades asociadas con la debilidad del músculo esquelético o la atrofia muscular se pueden seleccionar de este modo. Además, el procedimiento de cribado de la presente invención se puede usar como el procedimiento para el cribado de un fármaco anticancerígeno, el agente inmunosupresor o agentes para el tratamiento o la prevención de la enfermedad relacionada con el estilo de vida.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a las realizaciones específicas, diversos cambios y modificaciones obvias para los expertos en la materia son posibles sin alejarse del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> TOKYO METROPOLITAN GERIATRIC HOSPITAL AND INSTITUTE OF GERONTOLOGY

<120> Células madre musculares o mioblastos y procedimiento de cribado de sustancia relevante para la conversión metabólica usando las mismas, y composición farmacéutica que comprende la sustancia obtenida de dicho procedimiento de cribado

<130> TMI-949

<150> JP 2013-221037

<151> 24/10/2013

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

ES 2 714 127 T3

<211> 210
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 1

```

Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg
 1           5           10           15

Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile
 20           25           30

Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg
 35           40           45

Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile
 50           55           60

Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Ala Ala His Arg Ser Pro Glu Ser
 65           70           75

Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly
 85           90           95

Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Ala Leu Tyr
 100          105          110

Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu
 115          120          125

Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro
 130          135          140

Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Pro Asn Gln Asp Ala Thr Ser Trp
 145          150          155          160

Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Leu His Glu Pro Gln
 165          170          175

Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser
 180          185          190

Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr
 195          200          205

Ala Ser
 210
  
```

5

<210> 2
 <211> 209

ES 2 714 127 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

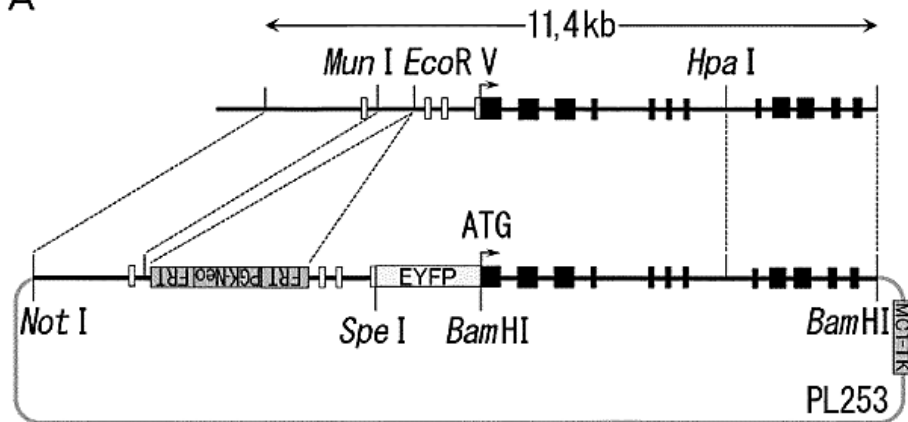
Met	Asp	Ser	Asp	Glu	Thr	Gly	Phe	Glu	His	Ser	Gly	Leu	Trp	Val	Ser	1	5	10	15
Val	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Gln	Ala	His	Pro	Ile	Pro	20	25	30	
Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	35	40	45	
Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg	50	55	60	
Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	65	70	75	80
Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	85	90	95	
Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	100	105	110	
Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	115	120	125	
Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	130	135	140	
His	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Ser	Pro	His	Arg	Asp	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	145	150	155	160
Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	165	170	175	
Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	180	185	190	
Pro	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	195	200	205	
Ser																			

REIVINDICACIONES

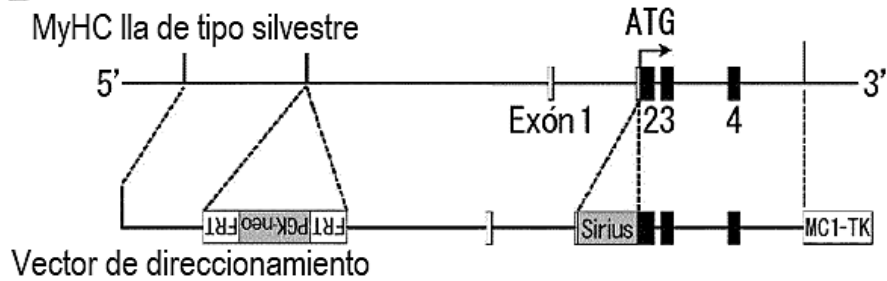
1. Una célula madre muscular aislada o un mioblasto aislado que comprende al menos un gen de fusión de la cadena pesada de la miosina seleccionado del grupo que consiste en un gen de fusión de la cadena pesada I de miosina en la que el gen de la cadena pesada I de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, un gen de fusión de la cadena pesada IIa de miosina en la que un gen de la cadena pesada IIa de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, un gen de fusión de la cadena pesada IIb de miosina en la que un gen de la cadena pesada IIb de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, un gen de fusión de la cadena pesada IId/x de miosina en la que un gen de la cadena pesada IId/x de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan, y un gen de fusión de la cadena pesada IIb de miosina, en la que un gen de la cadena pesada IIb de miosina y un gen de proteína fluorescente o fotoproteína se fusionan.
2. La célula madre muscular aislada o el mioblasto aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la célula es una célula inmortalizada.
3. La célula madre muscular aislada o el mioblasto aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el gen de la proteína fluorescente o fotoproteína unido a un gen de la cadena pesada I de miosina, el gen de la proteína fluorescente o fotoproteína unido a un gen de la cadena pesada IIa de miosina, el gen de proteína fluorescente o fotoproteína unido a un gen de cadena pesada IId/x de miosina y el gen de proteína fluorescente o fotoproteína unido a un gen de cadena pesada IIb de miosina son diferentes entre sí.
4. La célula madre muscular aislada o el mioblasto aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proteína fluorescente o la fotoproteína es al menos una proteína fluorescente o fotoproteína seleccionada del grupo que consiste en Sirius, EBFP, SBP2, EBP2, Azurite, mKalama1, TagBFP, mBlueberry, mTurquoise, ECFP, Cerulean, mCerulean, TagCFP, mCyan, mTP1, MiCy (Cian de Midoriishi), TurboGFP, CFP, AcGFP, TagGFP, AG (Verde Azami), mAG1, ZsGreen, EmGFP (Esmeralda), EGFP, GP2, T-Sapphire, HyPer, TagYFP, mAmetrine, EYFP, YFP, Venus, Citrine, PhiYFP, PhiYFP-m, turboYFP, ZsYellow, mBanana, mKO1, KO (Naranja de Kusabira), mOrange, mOrange2, mKO2, Keima570, TurboRFP, DsRed-Express, DsRed, DsRed2, TagRFP, TagRFP-T, DsRed-Monomérica, mApple, AsRed2, mStrawberry, TurboFP602, mRP1, JRed, KillerRed, mCherry, KeimaRed, HcRed, mRaspberry, mKate2, TagFP635, mPlum, egFP650, Neptune, mNeptune, egFP670 y luciferasa.
5. Un procedimiento *in vitro* para el cribado de una sustancia implicada en un cambio metabólico, que comprende las etapas de:
 - poner en contacto las células madre musculares o mioblastos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, con una sustancia a probar; y
 - analizar una expresión de al menos un gen de cadena pesada de miosina seleccionado del grupo que consiste en un gen de cadena pesada I de miosina, un gen de cadena pesada IIa de miosina, un gen de cadena pesada IId/x de miosina y un gen de cadena pesada IIb de miosina, en las células.
6. El procedimiento *in vitro* para el cribado de una sustancia implicada en un cambio metabólico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el análisis de la expresión de un gen de cadena pesada de miosina es un análisis de una cantidad o proliferación de células en la que se expresa la proteína fluorescente o la fotoproteína.
7. El procedimiento *in vitro* para el cribado de una sustancia implicada en un cambio metabólico de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que la sustancia implicada en un cambio metabólico se selecciona del grupo que consiste en un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con una reducción de las fibras musculares de contracción lenta, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un aumento de fibras musculares de contracción lenta, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con una reducción de las fibras musculares de contracción rápida, un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un aumento de las fibras musculares de contracción rápida, un fármaco anticancerígeno, un agente inmunosupresor y un agente para el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con el estilo de vida.

Figura 1

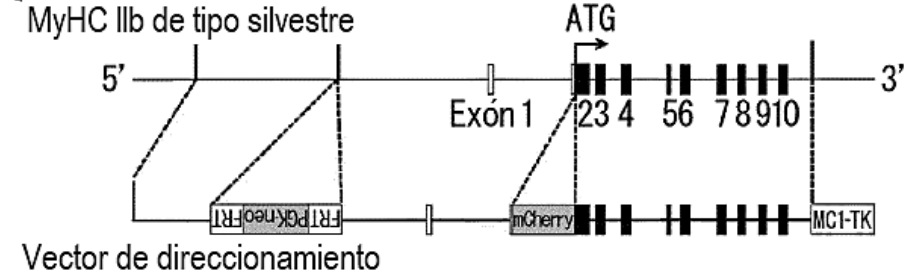
A



B



C



D

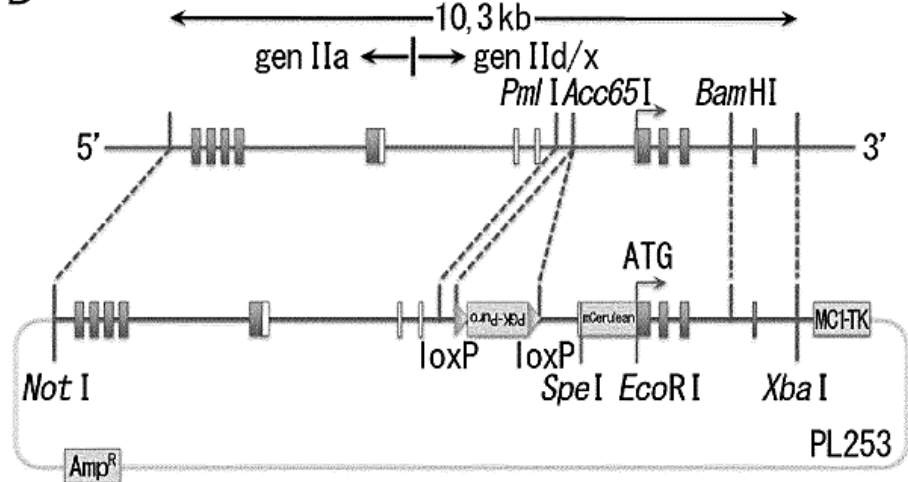


Figura 2

**Protocolo de cribado del fármaco para la inhibición de la proliferación
y la inducción del cambio metabólico**

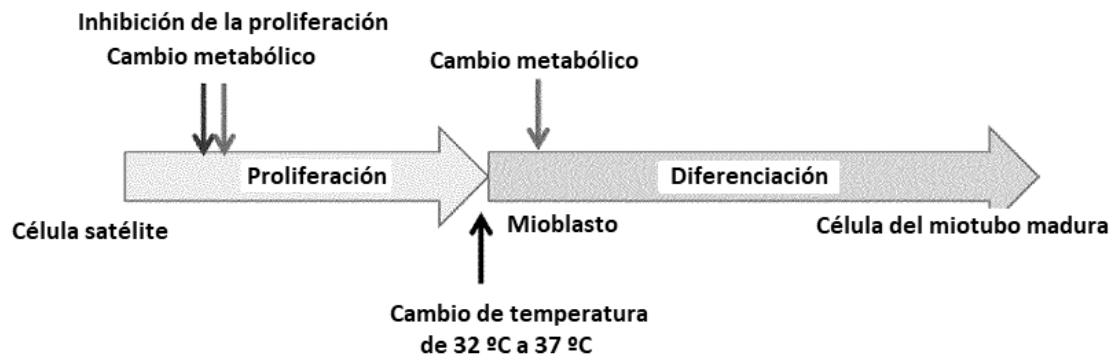
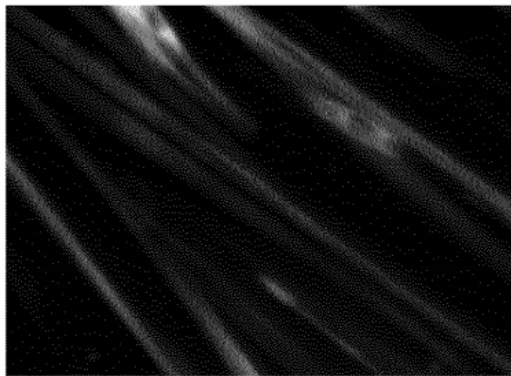


Figura 3

(A)



(B)

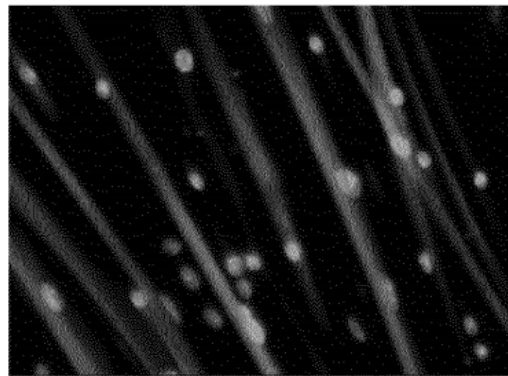


Figura 4
(A)

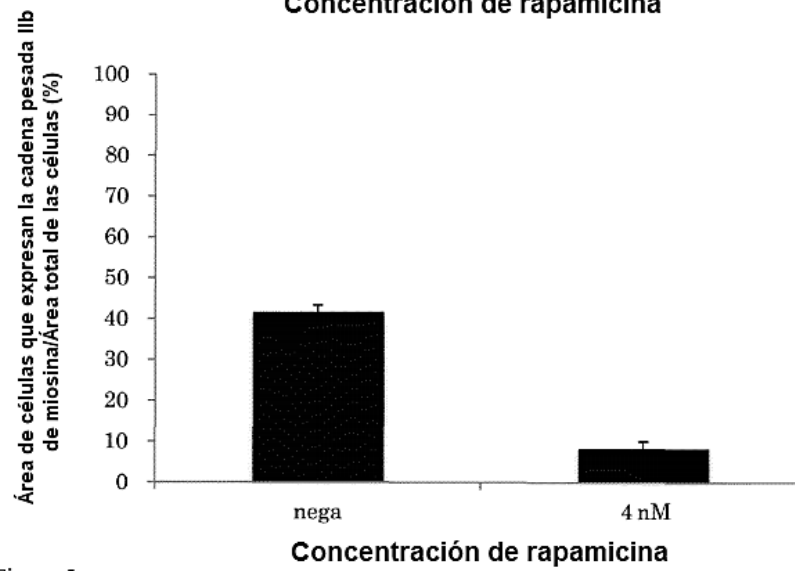
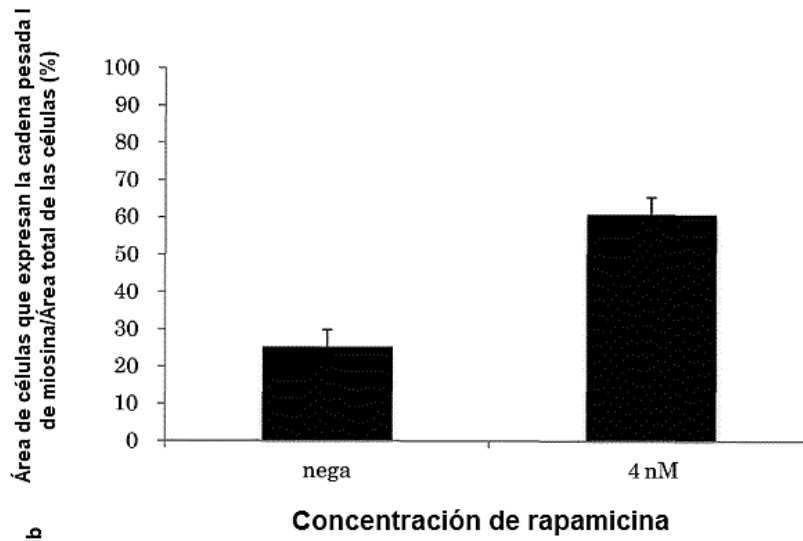


Figura 5

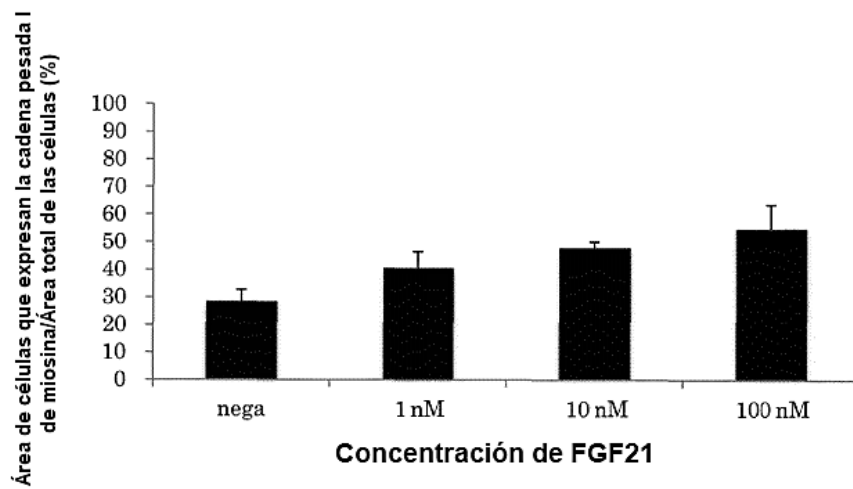


Figura 6

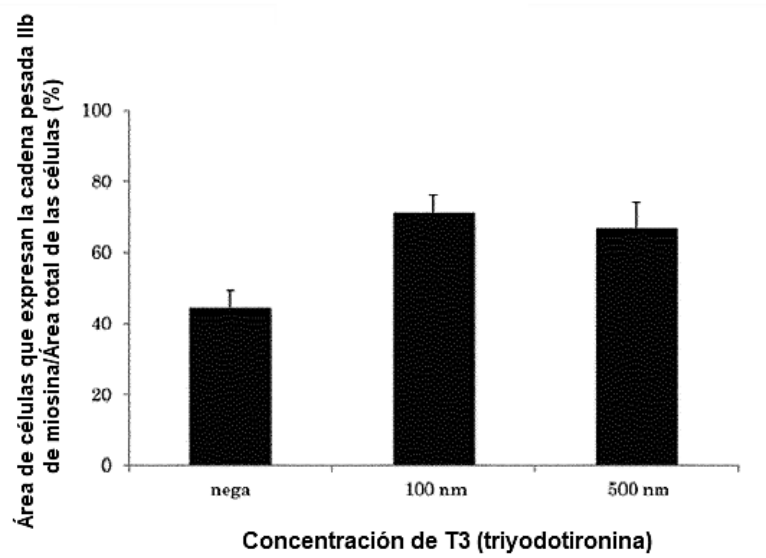


Figura 7

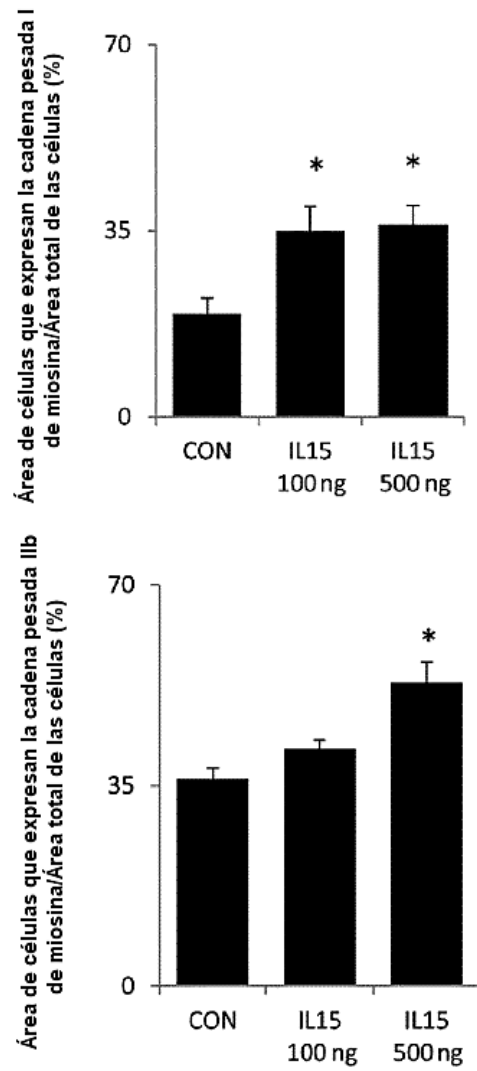


Figura 8

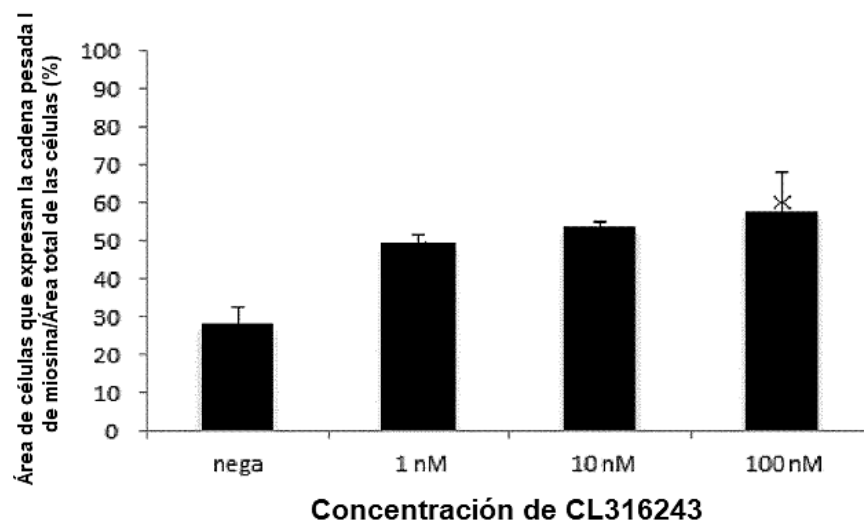
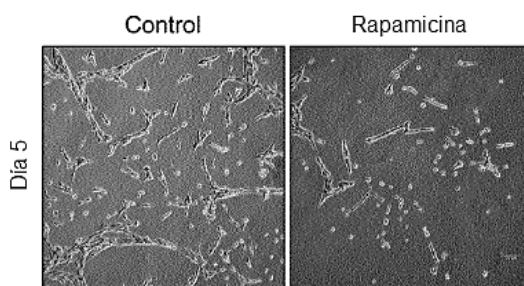


Figura 9

A



B

