

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 448**

21 Número de solicitud: 201230367

51 Int. Cl.:

A61K 38/25 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

12.03.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.10.2013

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

04.09.2014

Fecha de la concesión:

31.10.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.11.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070149

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (25.0%)
Praza do Obradoiro, s/n
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y
SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (75.0%)**

72 Inventor/es:

**PÉREZ CAMIÑA, Jesús y
CASANUEVA FREIJO, Felipe**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **USO DE LA OBESTATINA PARA LA REGENERACIÓN MUSCULAR**

57 Resumen:

Uso de la obestatina para la regeneración muscular.
La presente invención se refiere al uso de la obestatina, o a la secuencia nucleotídica que la codifica, como agente miogénico "in vitro", y para la elaboración de un medicamento para la regeneración muscular preferiblemente para la regeneración músculo-esquelética, siendo así de utilidad en el tratamiento y/o prevención de enfermedades degenerativas o genéticas o de lesiones que cursan con daño muscular.

ES 2 425 448 B2

DESCRIPCIÓN

Uso de la obestatina para la regeneración muscular.

5 La presente invención se encuadra en el campo de la medicina, específicamente dentro de los péptidos con capacidad miogénica útiles para inducir regeneración muscular y, por tanto, para el tratamiento y/o prevención de lesiones o enfermedades que cursan con daño muscular.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 La miogénesis es el proceso de formación de tejido muscular que implica la especificación y diferenciación de células precursoras de músculo o mioblastos, su fusión para la formación de miotubos primarios y secundarios y la consiguiente maduración en miofibras (Chargé SB., *et al.*, 2004, *Physiol Rev.* 84:209-238). Este proceso es requerido tanto para el desarrollo del músculo esquelético en el embrión, como para el crecimiento postnatal y para el mantenimiento y reparación de las miofibras del músculo esquelético tras una lesión (Perry RL., *et al.*, 2000, *Front Biosci.* 5:D750-767; Sartorelli V., *et al.*, 2005, *Curr Opin Genet Dev.* 15(5):528-533).

20 Por tanto, las fibras musculares o miocitos se forman a partir de la fusión de mioblastos en fibras multinucleadas, llamadas miotubos. En el desarrollo embrionario el proceso de miogénesis comienza con la proliferación de los mioblastos, que proliferan si hay suficiente factor de crecimiento fibroblástico (FGF). Por el contrario, en ausencia de FGF los mioblastos cesan su división y secretan fibronectina a la matriz extracelular. El segundo estadio implica el alineamiento de los mioblastos para formar miotubos. El tercer estadio consiste en una fusión celular, en la que los iones de calcio son críticos, que está mediada por un conjunto de metaloproteinasas llamadas meltrinas.

25 Los factores de aumento de los miocitos (MEFs de sus siglas en inglés "*Myocyte Enhance Factors*") promueven la miogénesis. Además, el factor de respuesta al suero (SRF de sus siglas en inglés "*Serum Response Factor*") juega un papel fundamental durante la miogénesis, siendo requerido para la expresión de genes de actina alfa en el músculo estriado. La expresión de actina alfa esquelética está también regulada por el receptor de andrógenos. Así, los esteroides pueden regular la miogénesis.

30 En el proceso de cicatrización, los mioblastos son activados tempranamente, regenerando músculo mediante la generación de nuevas fibras o fusión con fibras preexistentes. Los mioblastos inducidos a proliferar en respuesta a varios factores de crecimiento expresan el factor de transcripción miogenina que promueve la expresión de proteínas específicas del músculo esquelético, tales como la creatina quinasa y la miosina.

40 Existen diferentes marcadores moleculares que permiten analizar detalladamente la determinación miogénica, la proliferación de mioblastos y la diferenciación terminal. Los factores reguladores miogénicos son vitales para la determinación y mantenimiento del músculo esquelético. En este sentido, durante el desarrollo, la inducción de la expresión de MyoD y de Myf-5 define el origen de las células progenitoras miogénicas que son responsables de formar distintos grupos musculares en el organismo adulto. Existe un elevado número de vías de señalización implicadas en la regulación de la miogénesis durante el desarrollo y durante la regeneración del tejido muscular dañado. Estas vías regulan la progresión del ciclo celular, las interacciones proteína-proteína y la actividad transcripcional de los factores miogénicos.

45 El proceso de miogénesis requiere las acciones coordinadas de múltiples vías de señalización que regulan la salida del ciclo celular, determinando y especificando el proceso de miogénesis en base a la expresión de factores miogénicos, un grupo de factores de transcripción que incluye Myf-5, MyoD, miogenina y MRF4.

50 Por otro lado, ha sido identificado un péptido gastrointestinal de 23 aminoácidos derivado del mismo péptido precursor de la ghrelina, pre-proghrelina, denominado obestatina. La obestatina se aisló originalmente del estómago, demostrándose que era un péptido circulante cuya secreción es pulsátil, mostrando un ritmo ultradiano similar al de la ghrelina y la hormona del crecimiento (GH) (Zhang JV., *et al.*, 2005, *Science* 310:996-999). Se han descrito acciones mitogénicas (Camiña JP., *et al.*, 2007, *J Cell Physiol.* 211:1-9) y adipogénicas (Gurriarán-Rodríguez U., *et al.*, 2010, *J Cell Mol Med.* 15(9):1927-40) para la obestatina, lo que evidencia una funcionalidad biológica para este péptido. Recientemente, se ha descrito que la obestatina promueve la supervivencia celular en células β y en islotes pancreáticos humanos. Asimismo, la obestatina induce la expresión de genes que regulan el destino de las células β , la biosíntesis de insulina y la sensibilidad a la glucosa (Granata R., *et al.*, 2008, *Diabetes* 57:967-979).

En resumen, el tejido muscular dañado requiere de un proceso miogénico para su mantenimiento y regeneración, por lo que los agentes capaces de promover dicha miogénesis, y por tanto de estimular la regeneración de las miofibras musculares, son de especial interés en clínica por su potencial aplicación en el tratamiento y/o prevención de enfermedades y lesiones que cursan con daño muscular.

5

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un péptido aislado llamado "obestatina" que promueve la proliferación y diferenciación en mioblastos. El efecto proliferativo en mioblastos muestra un claro patrón dosis dependiente. El papel como factor miogénico se establece a través de la expresión en mioblastos de factores clave para su diferenciación, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, del marcador de diferenciación temprano, miogenina, y del marcador de diferenciación tardío, la miosina, (MHC, de sus siglas en inglés "*Myosin Skeletal Heavy Chain*"), de forma dosis dependiente. Así, este péptido ejerce un papel como factor de supervivencia de mioblastos prolongando el potencial regenerativo del sistema muscular a través del aumento de la actividad proliferativa de los mioblastos. Por otra parte, promueve la miogénesis a través de la salida del ciclo celular facilitando la migración, la diferenciación y la fusión de los mioblastos para la determinación de los miotubos. Por tanto, dicho péptido es de aplicación en la regeneración muscular, preferiblemente en la regeneración músculo-esquelética, siendo así de utilidad en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o lesiones que cursan con daño muscular. Existen obestatinas en diferentes organismos como por ejemplo, aunque sin limitarse, ratón, rata, hámster, búfalo, oso, gato o humano que comparten una alta identidad en la secuencia y que presentan la misma capacidad de promover la miogénesis.

Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido aislado que comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1, o al uso de la secuencia nucleotídica que lo codifica, como agente miogénico "*in vitro*". Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido aislado que consiste en una secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1, o al uso de la secuencia nucleotídica que lo codifica, como agente miogénico "*in vitro*".

30

Se entiende por "obestatina" en la presente invención una secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1. Se entiende por obestatina humana un péptido de secuencia SEQ ID NO:3 el cual presenta una homología superior al 86% con SEQ ID NO:1. Se entiende por obestatina de ratón o obestatina de rata el péptido de secuencia SEQ ID NO:1.

35

La secuencia aminoacídica de la obestatina de ratón, y que coincide con la obestatina de rata, es SEQ ID NO: 1. Esta secuencia SEQ ID NO:1 se corresponde con los residuos 76 a 98 de la secuencia con número de acceso al NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) NP_067463 correspondiente a un pre-péptido denominado pre-proghrelina de secuencia SEQ ID NO:7, el cual cuando es procesado en el organismo da lugar a la obestatina de secuencia SEQ ID NO:1. Este pre-péptido es codificado por el gen de la ghrelina.

40

En los ejemplos de la presente invención, se empleó la obestatina de rata/ratón, ya que los ensayos correspondientes se llevaron a cabo sobre líneas celulares de mioblastos de rata así como sobre las propias ratas, y por tanto era necesario la correspondencia entre la secuencia problema y la diana respectiva en los ensayos. Sin embargo, debe entenderse que la aplicación de mayor utilidad de la presente invención y su fin último es su uso terapéutico en humanos. En este sentido, es esperable que la obestatina humana, elemento homólogo al de la obestatina de rata/ratón con un elevado porcentaje de identidad en su secuencia aminoacídica con respecto a la de rata/ratón, y con tan sólo 3 aminoácidos de diferencia (86,9% de identidad), también ejerza un efecto comparable como agente miogénico, tanto sobre las correspondientes líneas de mioblastos de humano, como formando parte de un medicamento para la regeneración muscular en un ser humano. En la presente invención, la obestatina humana se corresponde con la secuencia SEQ ID NO:3. Esta secuencia es la relativa a los residuos 76 a 98 de la secuencia con número de acceso al NCBI NP_057446 correspondiente a la pre-proghrelina de secuencia SEQ ID NO:5, la cual se procesa en el organismo dando lugar a la obestatina de secuencia SEQ ID NO:3.

55

El péptido de la invención puede estar codificado por una secuencia nucleotídica que de lugar directamente mediante su transcripción-traducción al péptido de 23 aminoácidos. Un ejemplo de secuencia que codifica directamente para la obestatina de ratón o rata (SEQ ID NO:1) podría ser, aunque sin limitarse, la secuencia SEQ ID NO: 2, por lo que preferiblemente, la secuencia nucleotídica a la que se refiere la presente invención y que codifica para la obestatina de ratón es la SEQ ID NO: 2.

60

Por otro lado, un ejemplo de secuencia que codifica directamente para la obestatina humana (SEQ ID NO:3), podría ser, por ejemplo, aunque sin limitarse, la secuencia SEQ ID NO:4. Por esto, de forma preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para la obestatina humana es la SEQ ID NO: 4.

5 La obestatina en los organismos se encuentra codificada por el gen de la ghrelina. Este gen da lugar a un péptido denominado pre-proghrelina. En humanos este péptido tiene como secuencia SEQ ID NO: 5, y es procesado en el organismo dando como producto la obestatina. Concretamente, en humanos, la pre-proghrelina tiene 117 aminoácidos y su secuencia sería SEQ ID NO:5. La secuencia codificante sin intrones para la pre-proghrelina humana, y que por tanto codifica para un péptido que comprende la obestatina humana de la invención sería la secuencia SEQ ID NO:6, la cual se corresponde con la secuencia nucleotídica de 354 pares de bases con número de acceso CCDS33700.1, en la base de datos *Consensus CDS (CCDS)*. Por ello, de forma preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para la obestatina humana es SEQ ID NO: 6.

15 Por otro lado, en ratón, la secuencia codificante sin intrones para la pre-proghrelina de 117 aminoácidos (SEQ ID NO:7), y que por tanto también sería codificante para un péptido que comprende la obestatina de la invención, sería la secuencia SEQ ID NO:8, la cual se corresponde con la secuencia nucleotídica de 354 pares de bases con número de acceso CCDS20432.1 en la base de datos *Consensus CDS (CCDS)*. Por ello, de forma preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para la obestatina de ratón es SEQ ID NO: 8.

20 El término “% de identidad” con respecto a un polipéptido o proteína se refiere al porcentaje de aminoácidos de la secuencia en cuestión que son idénticos a los aminoácidos de la secuencia con la que se compara, después de alinear dichas secuencias y de introducir espacios, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad sin tener en cuenta las sustituciones conservadoras. El alineamiento puede llevarse a cabo de distintas formas conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo, usando herramientas públicas como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Un experto en la materia puede determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo los algoritmos necesarios para alcanzar el máximo alineamiento de las secuencias que se comparan. En la presente invención, el % de identidad se calcula dividiendo el número de aminoácidos que son idénticos después de alinear SEQ ID NO: 1 y la secuencia candidata, entre el número total de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y multiplicando el resultado por 100. En el caso de una secuencia nucleotídica, el “% de identidad” se calcula de igual manera aunque se comparan nucleótidos.

35 Tabla 1. Porcentajes de identidad entre las secuencias aminoacídicas de la obestatina de ratón y rata en comparación con la secuencia de humano y otros animales.

Especie	Proteína		
	% identidad	aminoácidos idénticos	Secuencia
<i>Mus musculus</i>	100	23/23	FNAPFDVGIKLSGAQYQQHGRAL (SEQ ID NO:1)
<i>Rattus Norvegicus</i>	100	23/23	FNAPFDVGIKLSGAQYQQHGRAL (SEQ ID NO:1)
<i>Homo sapiens</i>	86,9	20/23	FNAPFDVGIKLSGVQYQQHSQAL (SEQ ID NO:3)
<i>Bubalus bubalis</i>	74	17/23	FNAPFNIGIKLSGAQSLQHGQLT SEQ ID NO:9
<i>Cricetulus griseus</i>	95,6	22/23	FNAPFDVGIKLSGAQYQQHGQAL SEQ ID NO:10
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	91,3	21/23	FNAPFDVGIKLSGAQYQEHGQAL SEQ ID NO:11
<i>Felis catus</i>	91,3	21/23	FNAPFDVGIKLSGAQYHQHGQAL SEQ ID NO:12

40 Por todo ello, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido aislado que comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1, donde la secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1 es SEQ ID NO:3, o al uso de la secuencia nucleotídica que lo codifica, como agente miogénico “*in vitro*”. Dado que SEQ ID NO:3 corresponde a la obestatina humana, y en el organismo es sintetizada en forma de pre-proghrelina, la cual se procesa dando lugar a la obestatina, esta pre-proghrelina presentaría la misma utilidad que la obestatina. Por tanto, de forma preferida, la secuencia aminoacídica que comprende SEQ ID NO:3 es la pre-proghrelina humana (SEQ ID NO:5). Otra realización preferida se refiere al uso de un péptido aislado que

consiste en una secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1, donde la secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1 es SEQ ID NO:3, o al uso de la secuencia nucleotídica que lo codifica, como agente miogénico “*in vitro*”.

5 Una realización preferida del primer aspecto de la invención, se refiere al uso de un péptido aislado que comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 91% de identidad con la SEQ ID NO: 1, o al uso de la secuencia nucleotídica que lo codifica, como agente miogénico “*in vitro*”. Una realización más preferida se refiere al uso de un péptido aislado que comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 95%
10 de identidad con la SEQ ID NO: 1, o al uso de la secuencia nucleotídica que lo codifica, como agente miogénico “*in vitro*”. Una realización aun más preferida se refiere al uso de un péptido aislado que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, o al uso de la secuencia nucleotídica que lo codifica, como agente miogénico “*in vitro*”. Dado que SEQ ID NO:1 corresponde a la obestatina de ratón o rata, y en el organismo es sintetizada en forma de pre-proghrelina, la cual se procesa dando lugar a la obestatina, esta pre-proghrelina presentaría la misma utilidad que la obestatina. Por tanto, de forma preferida la secuencia
15 aminoacídica que comprende SEQ ID NO:1 es la pre-proghrelina de ratón o rata (SEQ ID NO:7). Una realización particular, se refiere al uso de un péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, o al uso de la secuencia nucleotídica que lo codifica, como agente miogénico “*in vitro*”.

20 La obestatina y sus variantes o derivados pueden ser sintetizados, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante síntesis química, técnicas de ADN recombinante, aislamiento de fuentes naturales o por proteólisis *in vitro*. La obestatina puede producirse recombinantemente, no sólo directamente sino como un polipéptido de fusión junto con un polipéptido heterólogo, el cual puede contener, por ejemplo aunque sin limitarnos, una secuencia señal, u otro polipéptido que tenga un sitio de corte para una proteasa, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en el extremo N-terminal de la proteína madura o del polipéptido.

25 Los términos “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no química o bioquímicamente modificados. Se refieren, por tanto, a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra.
30 Cualquiera de las secuencias de la presente invención, y que pueden codificar por ejemplo aunque sin limitarse para obestatina, puede obtenerse de manera artificial mediante métodos de clonación y selección convencionales, o bien mediante secuenciación. Dicha secuencia nucleotídica, adicionalmente a la secuencia codificante, puede llevar otros elementos, como por ejemplo aunque sin limitarnos, intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5' y/o 3', sitios de unión a ribosomas, o secuencias estabilizadoras. Estos polinucleótidos adicionalmente pueden incluir secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que puedan ser útiles, por ejemplo, aunque sin limitarse, para aumentar la estabilidad del péptido generado a partir de ellos o para permitir una mejor purificación del mismo.

40 En otra realización preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para la obestatina forma parte de un vector de expresión.

45 Un “vector de expresión” es una molécula de ácido nucleico usada para transferir material genético a una célula. Aparte de dicho material genético, un vector también puede contener diferentes elementos funcionales que incluyen elementos de control de la transcripción, como por ejemplo aunque sin limitarnos, promotores u operadores, regiones o potenciadores de la unión a factores de transcripción y elementos de control para iniciar y terminar la traducción. Los vectores incluyen, aunque sin limitarse: plásmidos, cósmidos, virus, fagos, casetes de expresión recombinantes y transposones. Algunos vectores son capaces de replicarse o dividirse autónomamente una vez que son introducidos en la célula huésped, como los vectores bacterianos con un origen de replicación bacteriano o los vectores episomales de mamíferos. Un vector de expresión es aquel capaz de dirigir la expresión de genes a los que se ha ligado de manera operativa. Un vector de expresión se usa para la transcripción y la traducción de un gen de interés, normalmente controlado por un promotor. Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos que controla la traducción del gen de interés. El promotor está operativamente unido al gen de interés. “Operativamente unido” se refiere a la relación funcional y a la localización de la secuencia del promotor con respecto al gen
55 de interés.

60 La obestatina, o la secuencia nucleotídica que la codifica, pueden utilizarse como agentes miogénicos “*in vitro*” expresándose en un cultivo celular, preferiblemente de mioblastos, para inducir la diferenciación de las células en cultivo, de manera que se formen miotubos (células sincitiales multinucleadas, con núcleos en posición central, pero sin actividad mitótica) y posteriormente fibras musculares o miocitos que puedan ser utilizados finalmente en procedimientos de terapia celular somática para la regeneración del tejido muscular dañado, preferiblemente del tejido músculo-esquelético. Por ello, la obestatina, la secuencia nucleotídica

que la codifica y las células en cultivo, preferiblemente mioblastos, que pretenden diferenciarse mediante este procedimiento de miogénesis *“in vitro”* son, más preferiblemente, de origen humano y aun más preferiblemente de origen autólogo.

5 Tal y como aquí se utiliza, el término “agente miogénico” se refiere a aquel agente capaz de inducir la proliferación, y/o diferenciación de una célula pluri o multipotencial, preferiblemente de un mioblasto, a un miocito o fibra muscular, es decir, a una célula fusiforme y multinuclear con capacidad contráctil y que forma parte del tejido muscular.

10 Un “mioblasto” es una célula indiferenciada con capacidad para sintetizar filamentos finos poco antes de su proceso de fusión con otros mioblastos y dar lugar a la formación de miotubos. Los mioblastos son células con alta capacidad de división celular y constituyen las células germinales del músculo.

15 Asimismo, la obestatina o la secuencia nucleotídica que la codifica pueden ser administradas a un individuo que padezca una lesión o enfermedad que cursa con daño en el tejido muscular, preferiblemente en el tejido musculoesquelético, para promover la regeneración muscular y reestablecer así la condición patológica. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido aislado que comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1, o al uso de la secuencia nucleotídica que lo codifica, para la elaboración de un medicamento para la regeneración muscular. O alternativamente,
20 este aspecto de la invención se refiere a un péptido aislado que comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1, o a la secuencia nucleotídica que lo codifica, para su uso como medicamento para la regeneración muscular. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1, es SEQ ID NO:3. Dado que SEQ ID NO:3 corresponde a la obestatina humana, y en el organismo es sintetizada en
25 forma de pre-proghrelina, la cual se procesa dando lugar a la obestatina, esta pre-proghrelina presentaría la misma utilidad que la obestatina. Por tanto, de forma preferida, la secuencia aminoacídica que comprende SEQ ID NO:3 es la pre-proghrelina humana (SEQ ID NO:5).

30 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el péptido aislado consiste en una secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1. En una realización más preferida, la secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1, es la SEQ ID NO:3.

35 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el péptido aislado comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 91% de identidad con la SEQ ID NO: 1. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, el péptido aislado comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1. En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención, el péptido aislado comprende la secuencia SEQ ID NO: 1. Dado que SEQ ID NO:1 corresponde a la obestatina de ratón o rata, y en el organismo es sintetizada en forma de pre-proghrelina, la cual se procesa dando lugar a la obestatina, esta pre-proghrelina presentaría la misma utilidad que la obestatina.
40 Por tanto, de forma preferida, la secuencia aminoacídica que comprende SEQ ID NO:1 es la pre-proghrelina de ratón o rata (SEQ ID NO:7). En una realización aun más preferida, el péptido aislado consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

45 En una realización preferida, la secuencia nucleotídica que codifica el péptido aislado es SEQ ID NO: 4. En otra realización preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido aislado es SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido aislado es SEQ ID NO: 6. Por esto, de forma preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido aislado es SEQ ID NO: 8.

50 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido aislado forma parte de un vector de expresión.

55 La “regeneración muscular” se refiere a la formación de tejido muscular, preferiblemente de tejido músculo-esquelético, con el fin de mantener y/o reparar las miofibras musculares dañadas tras una lesión o enfermedad que cursa con daño muscular, ayudando así al incremento, restauración o sustitución parcial o total de la actividad funcional del tejido muscular dañado, preferiblemente de la actividad funcional del músculo esquelético dañado.

60 En otra realización preferida, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de lesiones o enfermedades que cursan con daño o destrucción del músculo. Estas enfermedades son, por ejemplo aunque sin limitarse, enfermedades degenerativas o genéticas que cursan con daño muscular, preferiblemente con daño del músculo esquelético así como las lesiones musculares producidas por un

trauma directo asociado al ejercicio físico, como por ejemplo, y sin limitarse, el trauma asociado al ejercicio físico excesivo, o a entrenamientos de resistencia. Existen diversas enfermedades y lesiones que cursan con daño muscular y que por tanto requieren una regeneración de dicho tejido, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, distrofias musculares (como distrofia muscular de Becker o distrofia muscular de Duchenne), lesiones musculares como las producidas por un trauma directo asociado a ejercicio físico, miopatías inflamatorias o miositis, miopatías distales, miopatías miotónicas, miopatías congénitas, miopatías mitocondriales, miopatías metabólicas (como enfermedad de Pompe, enfermedad de Forbes o enfermedad de Tarui), parálisis periódicas primarias, miopatías neurogénicas, necrosis muscular, atrofia muscular, torceduras, distensiones, calambres, tendinitis, contracturas (como contractura isquémica de Volkmann o contractura de Dupuytren), infecciones musculares, dolor miofacial, fasciculaciones musculares, hipotonía, rabdomiólisis o síndrome compartimental.

Así, en una realización más preferida, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades o lesiones musculares seleccionadas de la lista que comprende: miopatías neurogénicas, necrosis muscular, atrofia muscular, torceduras, distensiones, calambres, tendinitis, contracturas, distrofia muscular, miositis, infecciones musculares, dolor miofacial, miopatías metabólicas, fasciculaciones musculares, hipotonía, miopatías congénitas, parálisis muscular, rabdomiólisis o síndrome compartimental. En una realización aun más preferida, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades o lesiones musculares seleccionadas de la lista que comprende: miopatías neurogénicas, necrosis muscular, atrofia muscular o distrofia muscular.

Las enfermedades musculares cursan con un limitado número de síntomas, entre los que destacan la debilidad, fatigabilidad, el dolor muscular, los calambres, las contracturas y la alteración de la marcha. Además, el músculo puede presentar una variedad de fenómenos motores involuntarios, aunque la mayor parte de ellos son un reflejo de su denervación y no propiamente de una enfermedad muscular, por lo que es importante diferenciar las manifestaciones clínicas de las miopatías de las de las neuropatías. En términos generales, el diagnóstico se realiza en base a una exploración muscular que implica la detección de: alteraciones de la marcha, debilidad pelviana, pérdida de masa muscular, pseudohipertrofia, fasciculaciones y/o mioclonías. Paralelamente se valora la consistencia, tono, dolorimiento, fuerza y reflejo muscular. Las exploraciones complementarias se realizan en base a análisis clínicos (enzimas musculares y mioglobulinuria), pruebas de debilidad, técnicas de imagen (ecografía, RMN, TAC), electromiografía y biopsia muscular.

Preferiblemente, el medicamento comprende obestatina, o la secuencia nucleotídica que la codifica, en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por "cantidad terapéuticamente efectiva" la cantidad de obestatina o de secuencia nucleotídica que la codifica que produzca el efecto deseado. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia del individuo al que le va a ser administrado el medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica, "composición de la invención", que comprende:

(i) un péptido aislado que comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1, , o

(ii) la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido de (i), para la elaboración de un medicamento para la regeneración muscular.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1, es SEQ ID NO:3. Dado que SEQ ID NO:3 corresponde a la obestatina humana, y en el organismo es sintetizada en forma de pre-proghrelina, la cual se procesa dando lugar a la obestatina, esta pre-proghrelina presentaría la misma utilidad que la obestatina. Por tanto, de forma preferida, la secuencia aminoacídica que comprende SEQ ID NO:3 es la pre-proghrelina humana (SEQ ID NO:5).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el péptido aislado consiste en una secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1. En una realización más preferida, la secuencia aminoacídica con al menos un 86% de identidad con la SEQ ID NO: 1, es SEQ ID NO:3.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el péptido aislado comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 91% de identidad con la SEQ ID NO: 1. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, el péptido aislado comprende una secuencia aminoacídica con al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1. En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención, el péptido aislado comprende la secuencia SEQ ID NO: 1. Dado que SEQ ID NO:1 corresponde a

la obestatina de ratón o rata, y en el organismo es sintetizada en forma de pre-proghrelina, la cual se procesa dando lugar a la obestatina, esta pre-proghrelina presentaría la misma utilidad que la obestatina. Por tanto, de forma preferida, la secuencia aminoacídica que comprende SEQ ID NO:1 es la pre-proghrelina de ratón o rata (SEQ ID NO:7). En una realización aun más preferida, el péptido aislado consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido aislado es SEQ ID NO: 4. En otra realización preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido aislado es SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido aislado es SEQ ID NO: 6. Por esto, de forma preferida la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido aislado es SEQ ID NO: 8.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido aislado forma parte de un vector de expresión.

En otra realización preferida, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades o lesiones musculares seleccionadas de la lista que comprende: miopatías neurogénicas, necrosis muscular, atrofia muscular, torceduras, distensiones, calambres, tendinitis, contracturas, distrofia muscular, miositis, infecciones musculares, dolor miofacial, miopatías metabólicas, fasciculaciones musculares, hipotonía, miopatías congénitas, parálisis muscular, rabdomiólisis o síndrome compartimental. En otra realización preferida, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades o lesiones musculares seleccionadas de la lista que comprende: miopatías neurogénicas, necrosis muscular, atrofia muscular o distrofia muscular.

La composición de la invención puede comprender además otro/s principio/s activo/s, excipiente/s y/o vehículo/s farmacéuticamente aceptable/s.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El "vehículo farmacéuticamente aceptable", al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a la obestatina y a la secuencia nucleotídica que la codifica. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

La composición de la invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. La composición de la invención también puede ser formulada en forma de liposomas, nanopartículas, nanoesferas, micropartículas, microesferas, micelas, de formulaciones de liberación sostenida o de cualquier otro sistema convencional de liberación.

Tal composición y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, oral, parenteral (intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intratecal, intralesional, intraarterial,

intramuscular, intranasal, subcutánea, intracapsular), tópica, mediante parches transdérmicos o vía rectal, mediante la administración de un supositorio, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

5 El "medicamento" al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El "medicamento de uso humano" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades o lesiones en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El "medicamento de uso veterinario" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades o lesiones animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario.

15 El medicamento de la invención puede utilizarse tanto solo como en combinación con otros medicamentos o composiciones para la regeneración muscular, preferiblemente para el tratamiento y/o prevención de lesiones o enfermedades degenerativas o genéticas que cursan con daño muscular, más preferiblemente del músculo esquelético.

20 El término "tratamiento", tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una lesión o enfermedad degenerativa o genética que cursa con daño muscular, preferiblemente con daño en el músculo esquelético, en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente humano) que incluye:

- 25 (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
 (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología; o
 (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

30 El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

35 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

40

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 **Fig. 1. Activación de enzimas reguladoras de mitogénesis y miogénesis por la obestatina en mioblastos y miotubos L6E9.** Efecto de la obestatina sobre actividad de enzimas reguladoras de la capacidad mitogénica (ERK 1/2), metabólica (Akt y AMPK) y miogénica (Akt y p38). En base a un estudio dosis-respuesta la dosis saturante para la máxima activación enzimática se establece para una concentración 5 nM. El análisis por inmunoblot muestra un perfil de activación para Akt, ERK 1/2 y p38 en mioblastos y miotubos. Se describe inactivación de AMPK en ambos modelos celulares. El perfil de activación descubre características bimodales para la acción de la obestatina: 1.- activación mitogénica en mioblastos; y, 2.- activación miogénica. Los inmunoblots son representativos de 6 ensayos independientes.

55 **Fig. 2. Efecto mitogénico de la obestatina en mioblastos L6E9.** Efecto mitogénico de diferentes dosis de obestatina (0,01-100 nM) en mioblastos L6E9 tras 48 horas de estimulación en presencia de medio de crecimiento [GM, del inglés *growth medium*: DMEN+10% FBS]. Co: número inicial de células. Control: número de células tras 48 horas en GM. GM+obestatina: número de células tras 48 horas de estimulación con obestatina en GM. Los datos están expresados como media±error estándar de 4 experimentos independientes (*, p<0,05).

60 **Fig. 3. Efecto de la obestatina sobre la expresión de los marcadores miogénicos miogenina y MHC en mioblastos L6E9.** Efecto de la estimulación con diferentes dosis de obestatina (0,01-100) sobre la expresión de los marcadores miogénicos miogenina y miosina (MHC) tras 6 días de la inducción de la

diferenciación mediante la utilización de medio de diferenciación (DM, del inglés *Differentiation medium*: DMEN+2% FBS). Los niveles de expresión de proteínas están referenciados a los niveles de mioblastos en medio de crecimiento (GM, del inglés *Growth Medium*: DMEN+10% FBS), no diferenciados. Los datos están representados como % respecto a la expresión de células en GM (media±error estándar de 6 experimentos independientes). La evaluación del grado de expresión se realizó por inmunoblot mediante la utilización del programa ImageJ64 (*, p<0,05).

Fig. 4. Índice de diferenciación asociado a la obestatina estimado en mioblastos L6E9 por inmunofluorescencia. **A:** estimación de la capacidad miogénica de la obestatina (5 nM) mediante inmunofluorescencia (índice de diferenciación). Las células fueron diferenciadas en DM (control) o en DM+obestatina (5 nM) durante 6 días. Una vez fijadas, las células fueron teñidas con el anticuerpo anti-MHC (magnificación 40x). **B:** cuantificación del índice de diferenciación de células diferenciadas en DM (control) o en DM+obestatina (5 nM) durante 6 días. Los datos están representados relativos al número de células control positivas para MHC (media±error estándar; *, p<0,05).

Fig. 5. Índice de fusión (número de núcleos por miotubo) asociado a la obestatina estimado en L6E9 por inmunofluorescencia. **A:** estimación de la capacidad de fusión de miotubos (índice de fusión) de la obestatina (5 nM) mediante inmunofluorescencia. Las células fueron diferenciadas en DM (control) o en DM+obestatina (5 nM) durante 6 días. Una vez fijadas, las células fueron teñidas con el anticuerpo anti-MHC (magnificación 40x). **B:** cuantificación del índice de fusión para las células diferenciadas en DM (control) o en DM+obestatina (5 nM) durante 6 días. Los datos están representados como % del número total células positivas para MHC con ≥ 2 núcleos (media±error estándar).

Fig. 6. Evaluación de la capacidad de cicatrización (migración/invasión) de la obestatina en mioblastos L6E9. **A:** los mioblastos L6E9 crecieron al 100% de confluencia en GM y posteriormente se indujo el daño con una pipeta estéril. Las células fueron mantenidas en GM o GM+obestatina (5 nM) durante 8 y 24 horas tras la inducción del daño celular (magnificación 40x). **B:** cuantificación del % de cicatrización (media±error estándar; *, p<0,05).

Fig. 7. Efecto de la administración crónica de obestatina sobre los marcadores miogénicos en el gastronemio y soleo de rata (modelo animal). Efecto de la administración durante 72 horas de obestatina (300 nmol/kg/24h; 72 h) mediante la implantación de minibombas sobre marcadores tempranos y tardíos de la miogénesis en tejido muscular esquelético (gastronemio y soleo) en ratas macho. **A:** análisis mediante *western-blot*. Primera columna: control; segunda columna: tratamiento con obestatina. **B:** Niveles de proteína en gastronemio. Columna blanca: control; columna gris: tratamiento con obestatina. Los niveles de proteína se expresan como % del control obtenido del grupo de animales con implantación de minibombas con salino (n=10 por grupo; media±error estándar; *, p<0,05). **C:** Niveles de proteína en soleo. Columna blanca: control; columna gris: tratamiento con obestatina. Los niveles de proteína se expresan como % del control obtenido del grupo de animales con implantación de minibombas con salino (n=10 por grupo; media±error estándar; *, p<0,05).

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la obestatina como agente miogénico y, por tanto, como regenerador muscular. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

MÉTODOS

MATERIALES. La obestatina de rata/ratón se obtuvo de California Peptide Research (CA, USA). Anticuerpos anti-pAkt HM(S473), anti-Akt, anti-pERK1/2(T202/Y204), anti-ERK 1/2, anti-AMPK α (T172), anti-AMPK α , anti-pp38(Y182), anti-p38, anti-p21 y anti-tubulin fueron de Cell Signaling Technology (MA, USA). Anticuerpo anti-cadena pesada de la miosina (MHC) se obtuvo de Abcam (Cambridge, UK). Anticuerpo anti miogenina, anti-MyoD, anti-Myf5, anti-Pax-7, anti-Myf6 y anti-Six-1 fueron de Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Anticuerpo cabra anti-ratón conjugado con FITC se obtuvo de Invitrogen (CA, USA). Los anticuerpos secundarios y el *Enhanced Chemiluminescence Detection System* fueron de Pierce (IL, USA). Minibombas

osmóticas Alzet® (modelo 1003D) se adquirieron a Alzet Corporation (CA, USA). Los demás reactivos fueron de Sigma-Aldrich (Mo, USA).

CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE LOS MIOBLASTOS L6E9. Los estudios se realizaron en base a la utilización de mioblastos de rata L6E9 que fueron mantenidos en medio de cultivo (GM, del inglés *growth medium*) constituido por DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés *Fetal bovine serum*), 100 U/mL penicilina, y 100 U/mL estreptomycin. Para la diferenciación, las células se cultivaron al 80-100% de confluencia en GM y se sustituyó por medio de diferenciación (DM, del inglés *differentiation medium*) constituido por DMEM suplementado con 2% de FBS, 100 U/mL penicilina, y 100 U/mL estreptomycin durante 6 días.

ANÁLISIS POR INMUNOBLOT. Las muestras de tejido o células fueron directamente lisadas en tampón RIPA [Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM; NaCl, 150 mM; EDTA, 1 mM; NP-40, 1% (v/v); Deoxicolato sódico, 0,25% (p/v); inhibidores de proteasas (Sigma); inhibidores de fosfatasa (Sigma)]. Los lisados fueron clarificados por centrifugación (14,000xg durante 15 min a 4°C) y la concentración de proteínas se cuantificó utilizando QuantiPro™ BCA assay kit (Sigma). Para inmunoblot, se cargaron cantidades iguales de proteína que fueron fraccionadas en geles de SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las bandas inmunoreactivas fueron detectadas por quimioluminiscencia Pierce ECL *Western Blotting Substrate*; Thermo Scientific, IL, USA).

ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE INMUNOFLORESCENCIA. Las células L6E9 fueron cultivadas y diferenciadas sobre portas de microscopía confocal en medio DM suplementado o no con obestatina (5 nM) durante 6 días. Las células fueron fijadas utilizando una solución tamponada de PBS-paraformaldehído durante 15 min, lavadas, permeabilizadas y bloqueadas con PBT [1% Triton X-100, 1% Tween-20, 5% suero inactivado, 0,2% BSA en tampón PBS] durante 30 min, y posteriormente incubadas con anticuerpo anti-MHC diluido en PBT (1:400) durante 12 h a 4°C. Después de tres lavados con PBS, las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario (anticuerpo cabra anti-ratón conjugado con) en PBT (1:1000) durante 45 min a 37°C. El DAPI fue utilizado para la tinción del núcleo. Las imágenes digitales de los cultivos celulares fueron adquiridas con un microscopio confocal Leica TCS-SP2. Se tomaron cinco campos de tres experimentos independientes para cada grupo. El grado de diferenciación se evaluó en base al número de células positivas a MHC entre el número total de núcleo. El número de núcleos dentro de los miotubos (≥ 2 núcleos) fueron cuantificados para 20-50 miotubos. Los miotubos fueron agrupados en dos categorías, aquellos con 2-3 núcleos y con 4 o más núcleos. El porcentaje de miotubos en cada categoría se calculó relativo al número total de células.

ENSAYOS DE INVASIÓN/MIGRACIÓN. Las células L6E9 fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia del 100% en GM. Alcanzada dicha confluencia, el daño se produjo mediante la utilización de una punta de pipeta estéril que permitió realizar dos canales lineales y perpendiculares. Tras el daño, las células fueron lavadas y cultivadas con GM o GM+obestatina (5 nM). El progreso de la migración se fotografió inmediatamente después del daño y a las 8 y 24 horas, cerca del punto de cruce. El área "invadida" se calculó trazando el borde de "cicatrización" y utilizando el software ImageJ64. El porcentaje de cicatrización se calculó en base a la siguiente ecuación: %cicatrización=[(área 0h-área xh)/ área 0 h]x100.

MODELOS ANIMALES. Para los ensayos *in vivo* se utilizaron ratas Sprague-Dawley (250 g; n=20) mantenidas en ciclos de luz-oscuridad de 12h con libre acceso a dieta estándar y agua. Las minibombas Alzet® (modelo 1003D) fueron implantadas a nivel subcutáneo. Los animales fueron asignados a uno de los dos grupos experimentales (n=10/grupo): 1) grupo control (minibombas con salino); y, 2) grupo obestatina (minibombas implantadas conteniendo obestatina 300 nmol/kg peso/24h). Estas minibombas permiten un flujo de difusión de 1 microl/h. Después de 72 h, las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical bajo tratamiento anestésico, y los tejidos soleo y gastrónemio se extrajeron para análisis por inmunoblot.

EJEMPLO 1. Estudio dosis respuesta para la activación de enzimas mitogénicos y miogénicos en mioblastos y miotubos L6E9.

Para definir el efecto mitogénico y miogénico de la obestatina, se estudió la capacidad de activación de dianas intracelulares reguladoras de la proliferación (ERK1/2) y/o diferenciación (p38 y Akt). En mioblastos, la activación de Akt [pAkt(S473)], p38 [pp38(Y138)] y ERK 1/2 [pERK1/2(T202/Y204)] se observó a concentraciones 0,1 nM de obestatina, en los que los niveles de fosforilación alcanzaban valores saturables a una concentración de 5 nM. La Figura 1 muestra que el tratamiento con obestatina (5 nM) en mioblastos L6E9 produce un aumento dosis-dependiente para pAkt(S473), pp38(Y138) y pERK1/2(T202/Y204), que alcanza niveles máximos a los 10 min post-estímulo. Al mismo tiempo, la obestatina (5 nM) defosforila la AMPK α en T172 [pAMPK α (T172)], inactivando este enzima. Dicha dinámica de activación fue similar en

miotubos L6E9 bajo la estimulación con obestatina (5 nM). Estos datos indican posible capacidad mitogénica y miogénica.

EJEMPLO 2. Estudio dosis respuesta para la capacidad mitogénica de la obestatina en mioblastos L6E9.

Estudios dosis-dependientes realizados en mioblastos con diferentes concentraciones de obestatina (0,01-100 nM) en GM (condiciones proliferativas) muestran un aumento máximo del número de células a las 48 horas post estimulación a una concentración de 5,0 nM de obestatina (~2,2-incremento en relación al control; Figura 2). Ello demuestra la capacidad proliferativa de la obestatina sobre mioblastos, paso previo a la diferenciación celular.

EJEMPLO 3. Estudio dosis respuesta para la expresión de marcadores miogénicos realizado en células L6E9 (mioblastos de rata).

Las células L6E9 fueron cultivadas en DM complementado con diferentes concentraciones de obestatina en un rango de 0,01-100 nM durante seis días. Como muestra la Figura 3, los niveles de proteína de miogenina y MHC, detectados por inmunoblot, mostraron un aumento de expresión para las células tratadas con obestatina, siendo el efecto máximo observado a una concentración de 5 nM para la expresión de miogenina (aumento de ~1,7 en relación a las células control) y MHC (aumento de ~1,6 en relación a las células control).

EJEMPLO 4 y 5. Estudios de microscopía de fluorescencia para la estimación del índice de diferenciación y fusión para el tratamiento con obestatina en células L6E9.

Los datos muestran que el tratamiento con obestatina incrementa ~150% la capacidad de diferenciación en relación a las células control (Figura 4). Además, aproximadamente el 22% de los miotubos control presentaron ≥ 4 núcleos, frente al ~67% de las células bajo tratamiento con obestatina (Figura 5). Este efecto representa un incremento de ~3,4 en el índice de fusión para el tratamiento con obestatina.

EJEMPLO 6. Evaluación de la capacidad de cicatrización (migración/invasión) de la obestatina en mioblastos L6E9.

Los ensayos realizados en mioblastos L6E9 para la valoración de la capacidad del índice de migración (cicatrización) de la obestatina (5 nM) muestran un aumento del 53% a las 8 horas de la inducción del daño celular en relación a células control (Figura 6). Este aumento es del 21% a las 24 horas tras la inducción del daño celular. El trabajar con tiempos cortos permite eliminar la contribución propia de la mitogénesis en el proceso de migración.

EJEMPLO 7. Estudio de expresión de factores propios de la mitogénesis en ratas bajo la administración crónica de obestatina.

En base a la corta vida media de la obestatina en plasma, se utilizaron minibombas osmóticas para la administración *in vivo* de este péptido. Se trabajó con dos grupos de ratas macho: un grupo de 10 ratas macho recibieron la infusión subcutánea continuada de obestatina durante 72h (300 nmol/kg peso corporal/24h); y otro grupo de 10 ratas recibieron el volumen equivalente de PBS durante 72h. Los animales fueron sacrificados, y los músculos gastronemio y soleo fueron extraídos y procesados para el análisis de la expresión de factores clave de la diferenciación muscular por inmunoblot. Los niveles de MyoD (de sus siglas en inglés *Myogenic regulatory factor D*), Myf5 (de sus siglas en inglés *Myogenic regulatory factor 5*), Pax-7 (de sus siglas en inglés *Paired box protein 7*), miogenina, Myf6 (de sus siglas en inglés *Myogenic factor 6*) y MHC fueron significativamente aumentados en músculo gastronemio y soleo de las ratas bajo el tratamiento con obestatina en relación al grupo de ratas control (Figura 7). Six-1 (de sus siglas en inglés *Homeobox protein SIX1*) mostró un aumento significativo en las muestras de soleo, mientras que no se observó efecto alguno en las muestras de gastronemio. El aumento en ambos tipos de músculo de la familia de factores reguladores de diferentes etapas de la miogénesis muestra una clara capacidad regenerativa del músculo para la obestatina.

REIVINDICACIONES

1. Uso de la obestatina o de una secuencia nucleotídica que la codifique como agente miogénico “*in vitro*”.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1 donde la obestatina consiste en un péptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3 o de la secuencia nucleotídica que lo codifica.
3. Uso según la reivindicación 1 donde la obestatina consiste en un péptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 o de la secuencia nucleotídica que lo codifica.
- 10 4. Uso de la obestatina, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la secuencia nucleotídica forma parte de un vector de expresión.
- 15 5. Uso de la obestatina o de una secuencia nucleotídica que la codifique para la elaboración de un medicamento para la regeneración muscular.
6. Uso de la obestatina según la reivindicación 5 donde la obestatina consiste en un péptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3 o de la secuencia nucleotídica que lo codifica.
- 20 7. Uso de la obestatina según la reivindicación 5 donde la obestatina consiste en un péptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 o de la secuencia nucleotídica que lo codifica.
8. Uso de la obestatina o de la secuencia nucleotídica que lo codifica, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 donde la secuencia nucleotídica forma parte de un vector de expresión.
- 25 9. Uso de la obestatina, o de la secuencia nucleotídica que lo codifica, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades o lesiones musculares seleccionadas de la lista que comprende: miopatías neurogénicas, necrosis muscular, atrofia muscular, torceduras, distensiones, calambres, tendinitis, contracturas, distrofia muscular, miositis, infecciones musculares, dolor miofacial, miopatías metabólicas, fasciculaciones musculares, hipotonía, miopatías congénitas, parálisis muscular, rabdomiólisis o síndrome compartimental.
- 30 10. Uso de la obestatina, o de la secuencia nucleotídica que lo codifica, según la reivindicación 9, donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades o lesiones musculares seleccionadas de la lista que comprende: miopatías neurogénicas, necrosis muscular, atrofia muscular o distrofia muscular.
- 35 11. Uso de una composición farmacéutica que comprende:
 - 40 (i) obestatina, o
 - (ii) una secuencia nucleotídica que codifica para (i),
 para la elaboración de un medicamento para la regeneración muscular.
- 45 12. Uso de una composición farmacéutica según la reivindicación 11 donde la obestatina de (i) consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.
- 50 13. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 11 donde la obestatina de (i) consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
14. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 donde la secuencia nucleotídica de (ii) forma parte de un vector de expresión.
- 55 15. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades o lesiones musculares seleccionadas de la lista que comprende: miopatías neurogénicas, necrosis muscular, atrofia muscular, torceduras, distensiones, calambres, tendinitis, contracturas, distrofia muscular, miositis, infecciones musculares, dolor miofacial, miopatías metabólicas, fasciculaciones musculares, hipotonía, miopatías congénitas, parálisis muscular, rabdomiólisis o síndrome compartimental.
- 60

16. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 15 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades o lesiones musculares seleccionadas de la lista que comprende: miopatías neurogénicas, necrosis muscular, atrofia muscular o distrofia muscular.

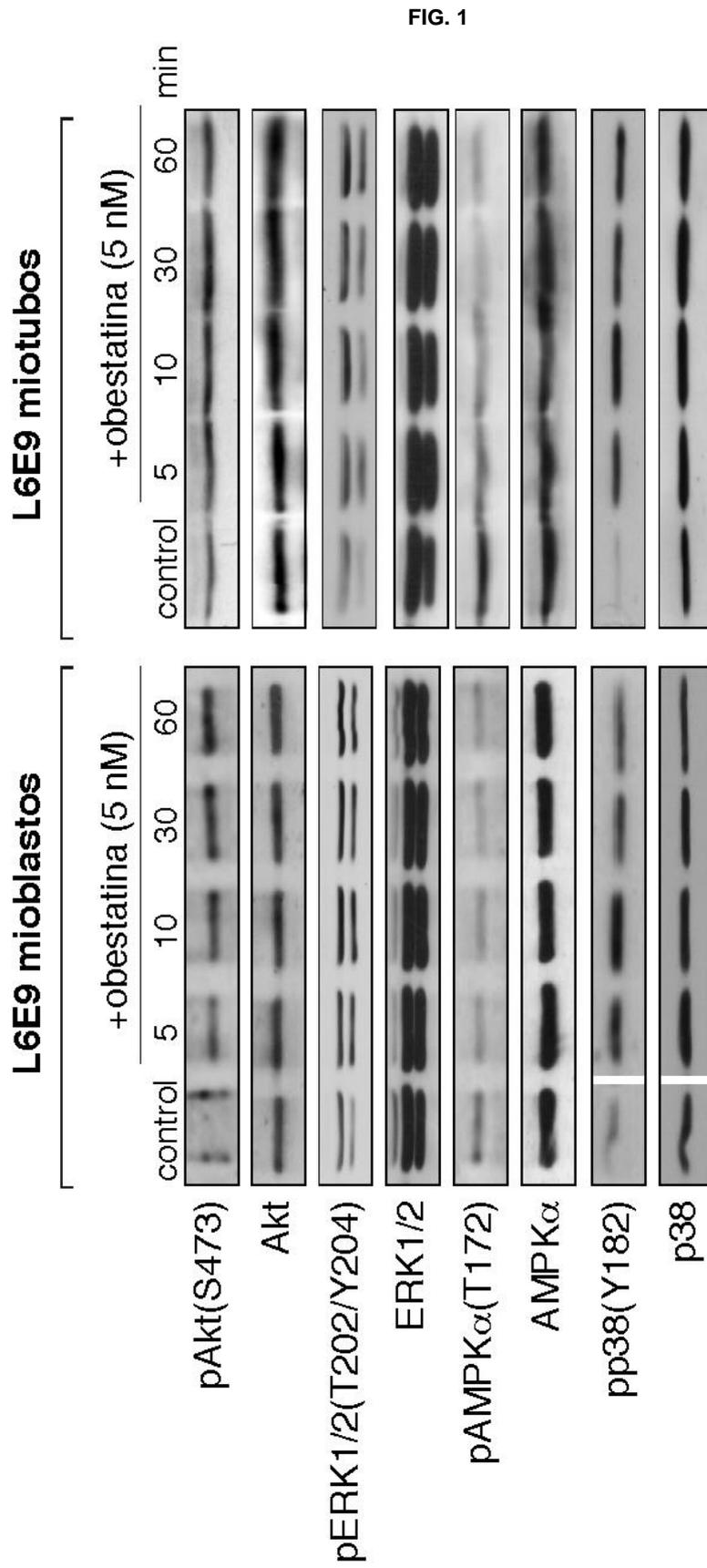


FIG. 2

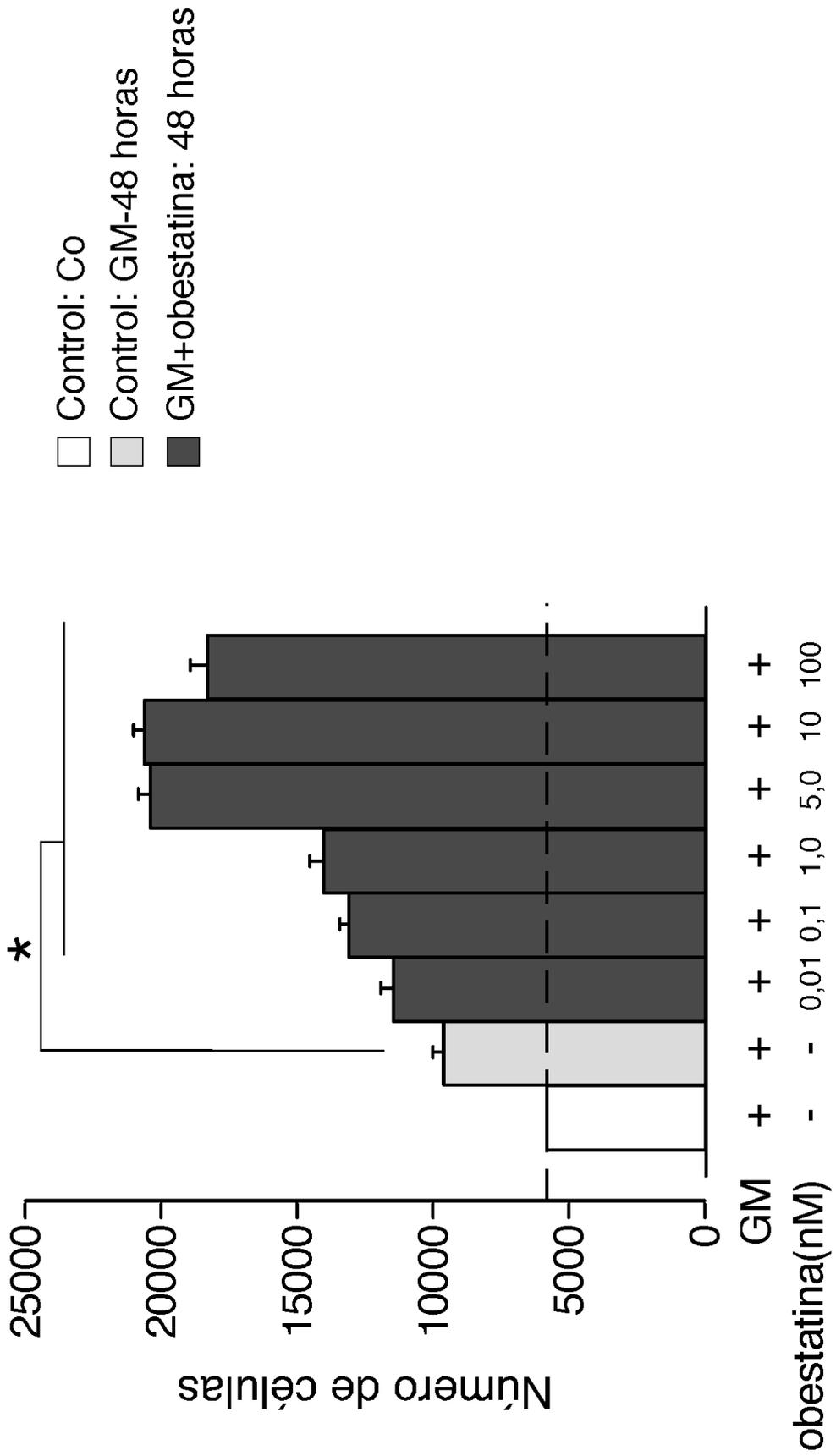


FIG. 3

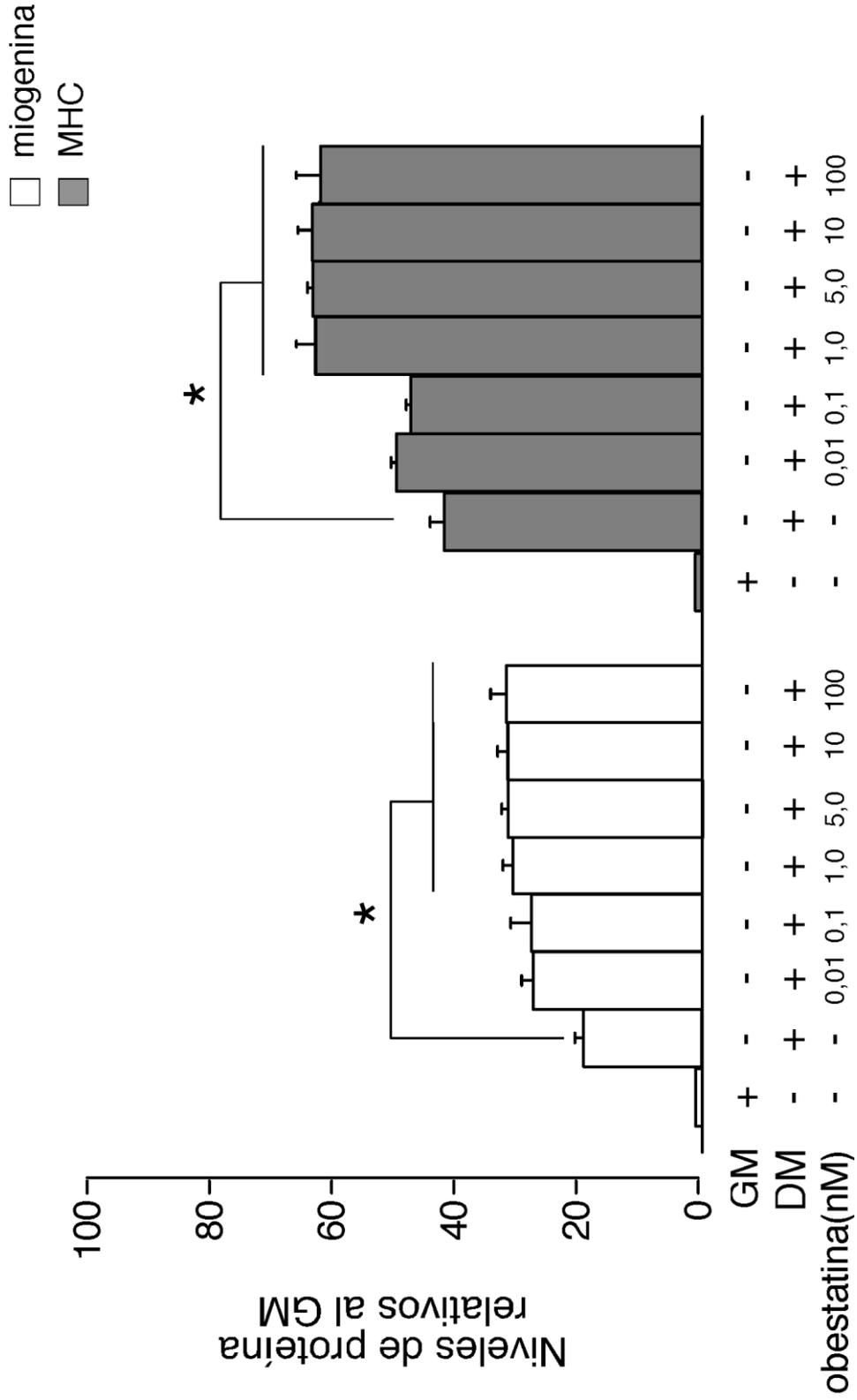


FIG. 4

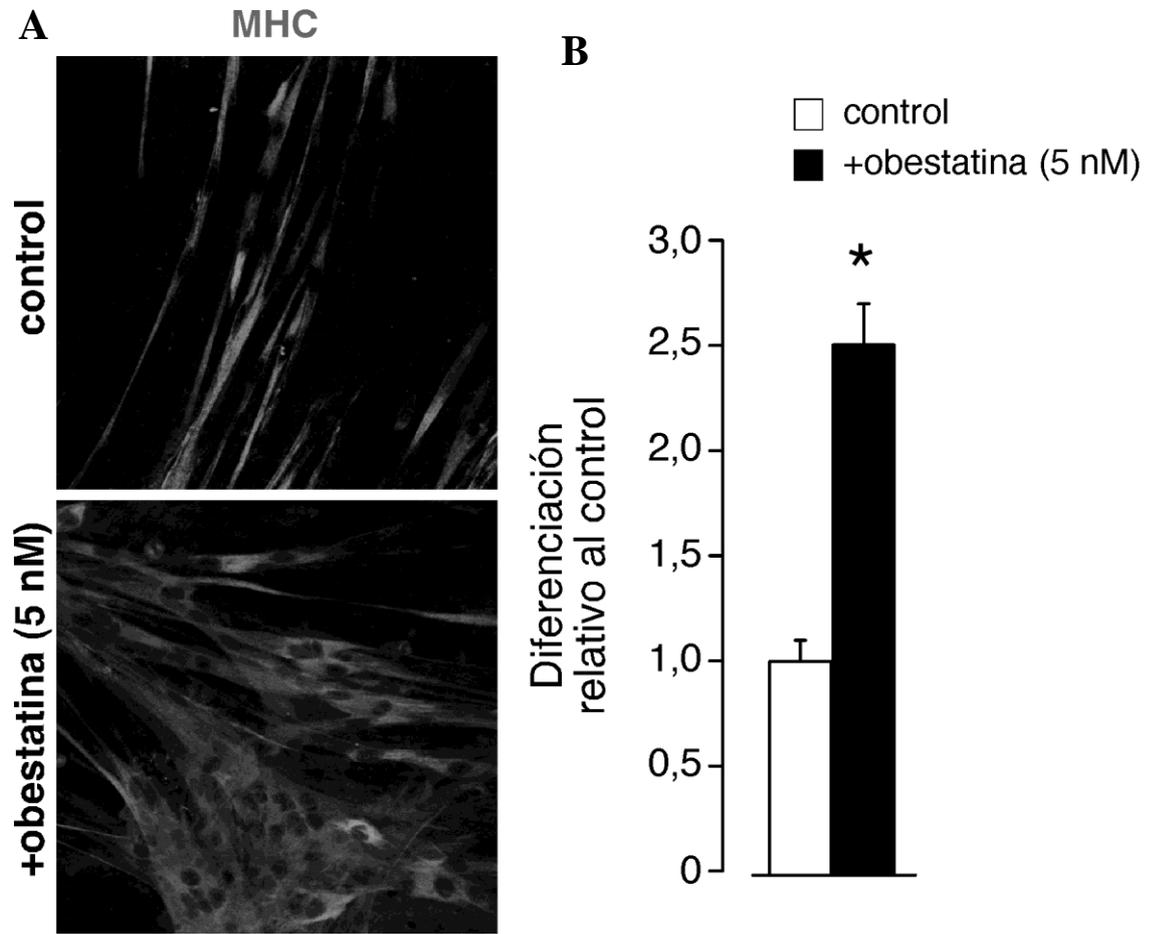


FIG. 5

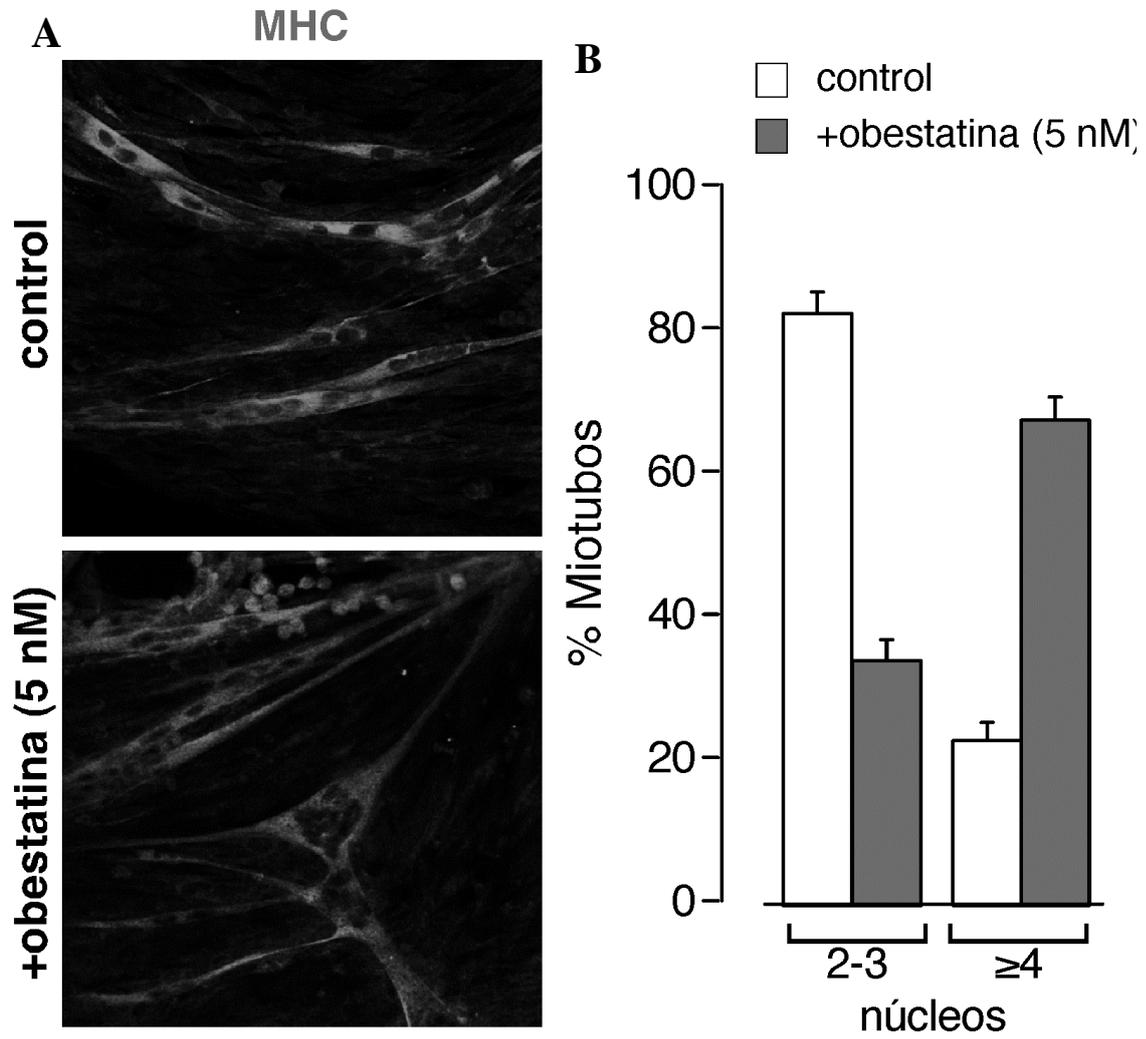


FIG. 6

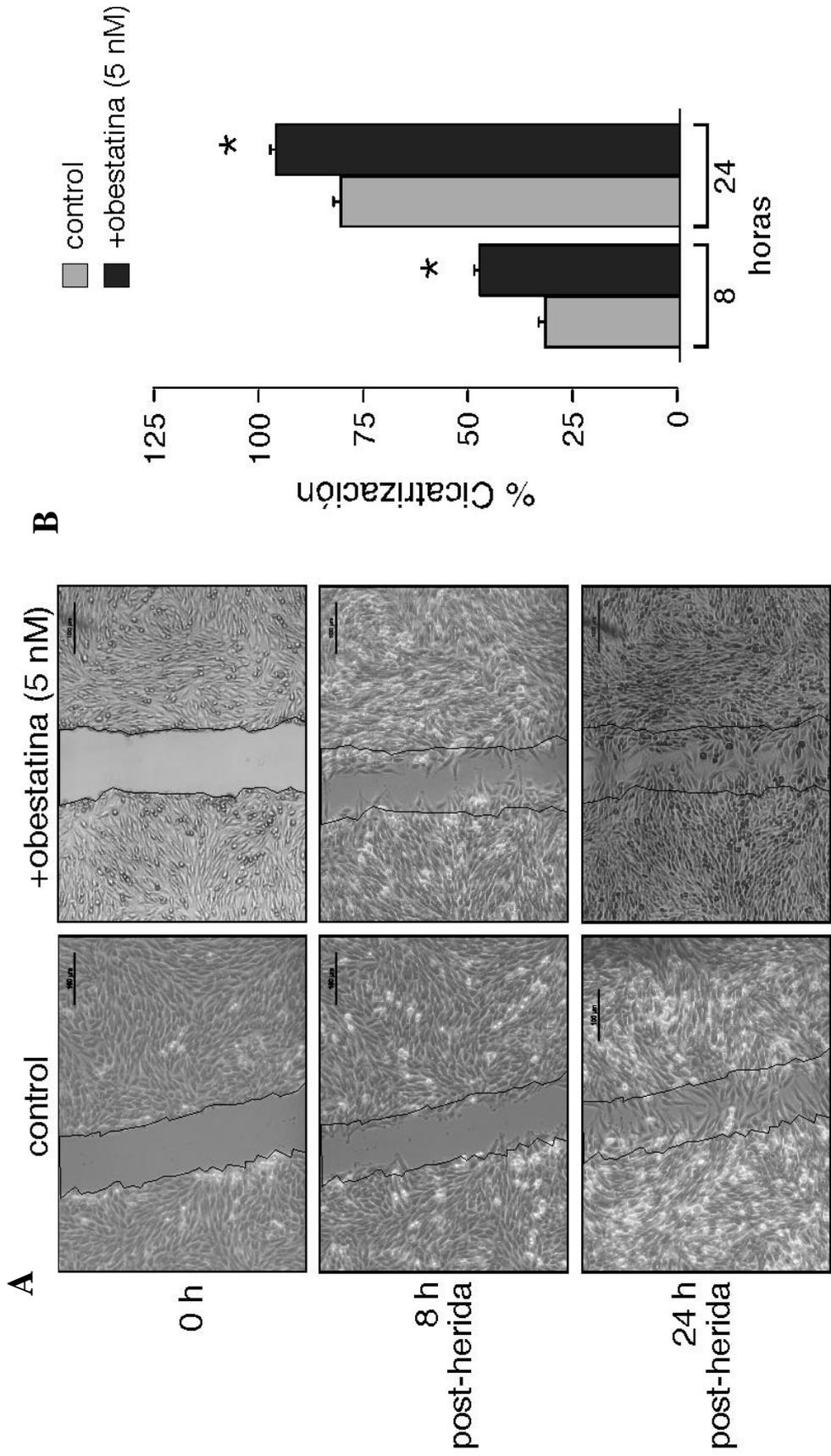


FIG. 7

A

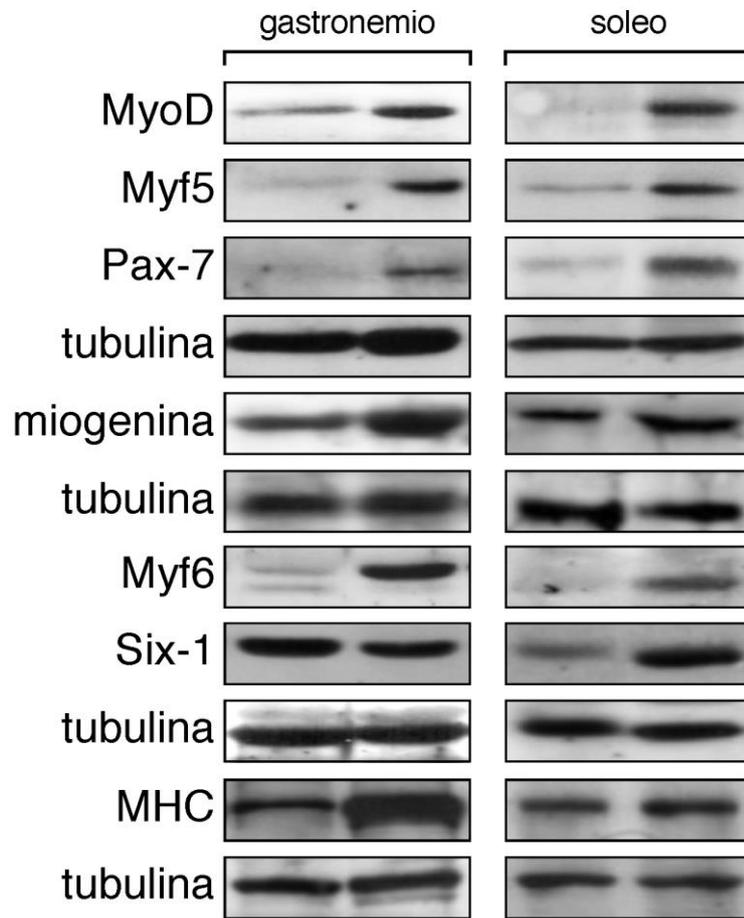
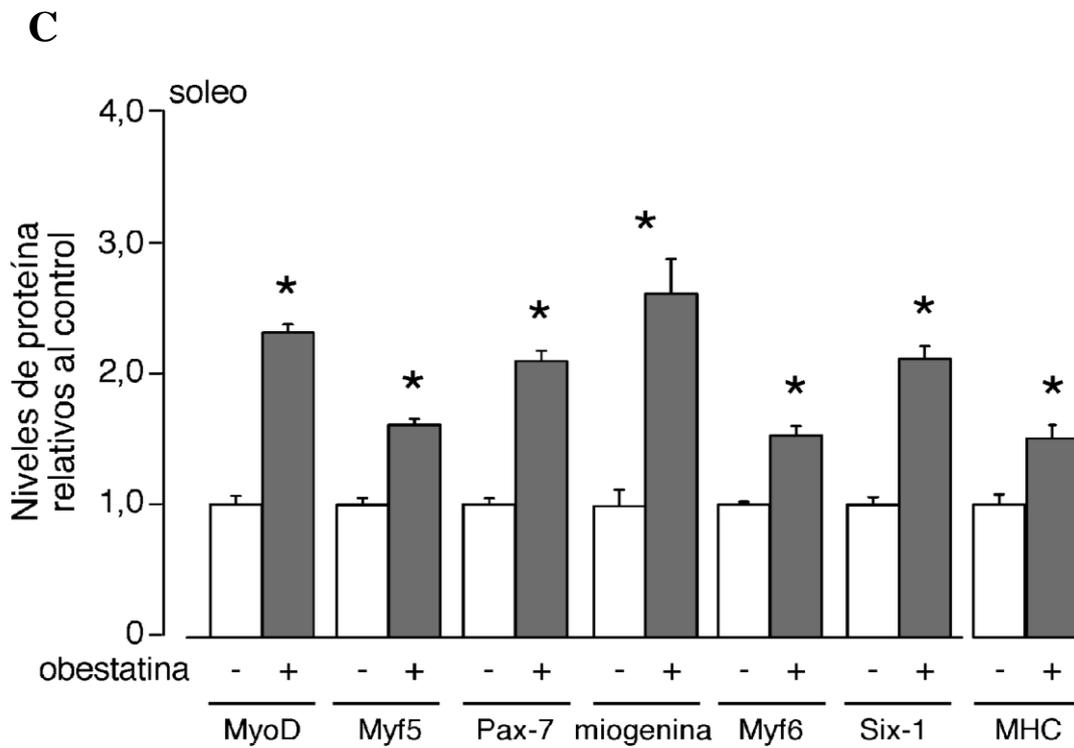
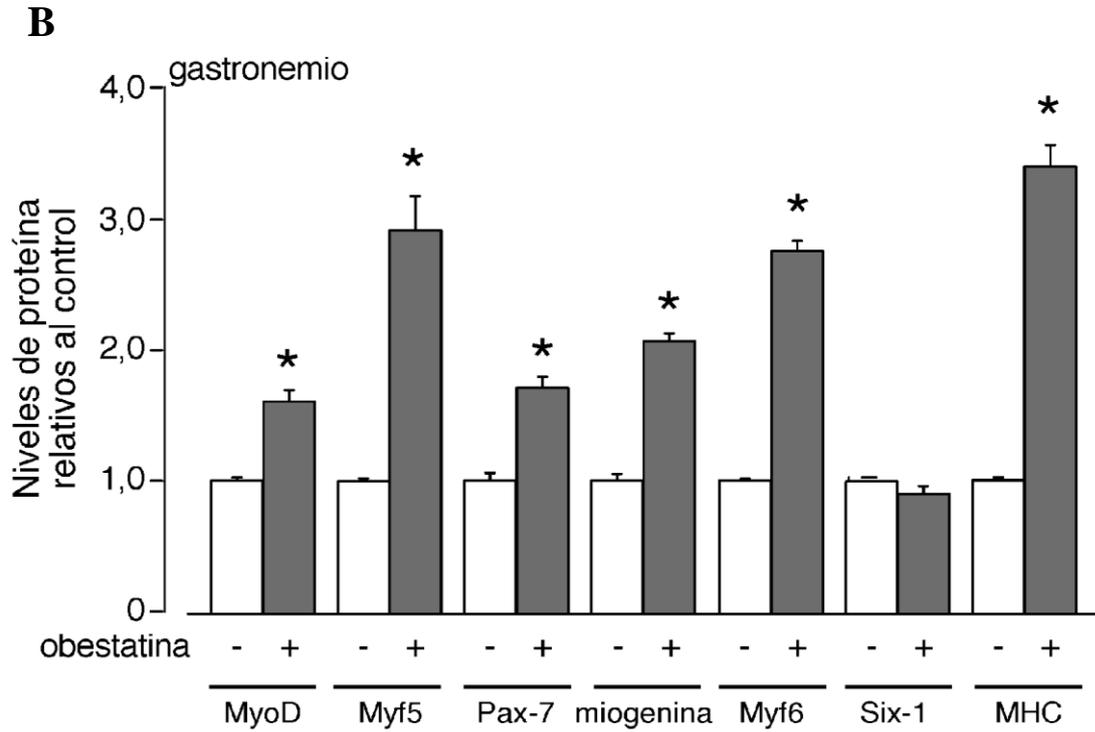


FIG. 7



LI STADO DE SECUENCI AS

<110> Universidade de Santiago de Compostela
 Servizo Galego de Saúde (SERGAS)
 <120> Uso de la obestati na para la regeneraci3n muscular
 <130> ES1596.40
 <140> P201230367
 <141> 2012-03-12
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Mus muscul us
 <400> 1

Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr
 1 5 10 15

Gln Gln His Gly Arg Ala Leu
 20

<210> 2
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Mus muscul us

<400> 2
 ttcaatgctc ccttcgatgt tggcatcaag ctgtcaggag ctcagtatca gcagcatggc 60
 cgggccctg 69

<210> 3
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapi ens

<400> 3
 Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr
 1 5 10 15

Gln Gln His Ser Gln Ala Leu
 20

<210> 4
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Homo sapi ens

<400> 4
 ttcaacgccc cctttgatgt tggaatcaag ctgtcagggg ttcagtacca gcagcacagc 60
 caggccctg 69

<210> 5

ES 2 425 448 B2

<211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu
 1 5 10 15
 Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
 20 25 30
 Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
 35 40 45
 Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln
 50 55 60
 Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe
 65 70 75 80
 Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln
 85 90 95
 Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu
 100 105 110
 Ala Pro Ala Asp Lys
 115

<210> 6
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 atgccctccc cagggaccgt ctgcagcctc ctgctcctcg gcatgctctg gctggacttg 60
 gccatggcag gctccagctt cctgagccct gaacaccaga gagtccagca gagaaaggag 120
 tcgaagaagc caccagccaa gctgcagccc cgagctctag caggctggct ccgcccggaa 180
 gatggaggtc aagcagaagg ggcagaggat gaactggaag tccggttcaa cgcccccttt 240
 gatgttgaa tcaagctgtc aggggttcag taccagcagc acagccaggc cctggggaag 300
 tttcttcagg acatcctctg ggaagaggcc aaagaggccc cagccgacaa gtga 354

<210> 7
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 7

Met Leu Ser Ser Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu
 1 5 10 15
 Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
 Pági na 2

ES 2 425 448 B2

20

25

30

Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
35 40 45

Gln Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln
50 55 60

Ala Glu Glu Thr Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe
65 70 75 80

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg
85 90 95

Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu
100 105 110

Ala Pro Ala Asp Lys
115

<210> 8
<211> 354
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 8
atgctgtctt caggcaccat ctgcagtttg ctgctactca gcatgctctg gatggacatg 60
gccatggcag gctccagctt cctgagccca gagcaccaga aagcccagca gagaaaggaa 120
tccaagaagc caccagctaa actgcagcca cgagctctgg aaggctggct ccacccagag 180
gacagaggac aagcagaaga gacagaggag gagctggaga tcaggttcaa tgctcccttc 240
gatgttggca tcaagctgtc aggagctcag tatcagcagc atggccgggc cctggggaag 300
tttcttcagg atatcctctg ggaagaggtc aaagaggcgc cagctgacaa gtaa 354

<210> 9
<211> 23
<212> PRT
<213> Bubalus bubalis

<400> 9

Phe Asn Ala Pro Phe Asn Ile Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser
1 5 10 15

Leu Gln His Gly Gln Leu Thr
20

<210> 10
<211> 23
<212> PRT
<213> Cricetus griseus

<400> 10

Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr
Pági na 3

