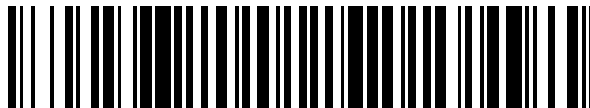


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 009**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 5/50 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61K 31/135 (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2009 E 09774707 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2355838**

54 Título: **Glucoproteínas que tienen propiedades de movilización de lípidos y usos terapéuticos de las mismas**

30 Prioridad:

07.11.2008 US 112623 P
19.10.2009 US 253023 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.12.2014

73 Titular/es:

ASTON UNIVERSITY (100.0%)
Aston Triangle
Birmingham B4 7ET , GB

72 Inventor/es:

TISDALE, MICHAEL, J. y
RUSSELL, STEVEN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 525 009 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

Glucoproteínas que tienen propiedades de movilización de lípidos y usos terapéuticos de las mismas

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en general al campo de la medicina y del tratamiento de la hiperglucemia y la obesidad, más particularmente a composiciones y procedimientos para mejorar los síntomas asociados con la hiperglucemia.

Información básica

15 La diabetes se caracteriza por una alteración del metabolismo de la glucosa que se manifiesta entre otras cosas por un nivel de glucosa elevado en el paciente diabético. Los defectos subyacentes conducen a una clasificación de la diabetes en dos grupos principales. La diabetes de tipo 1, o diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), surge cuando los pacientes carecen de células beta productoras de insulina en las glándulas pancreáticas. La diabetes de tipo 2, o diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), se produce en pacientes con la función de las células beta alterada y alteraciones de la acción de la insulina.

20 La diabetes tanto de tipo 1 como de tipo 2 está asociada con pérdida de masa muscular esquelética, que se ha atribuido a un incremento de la degradación de las proteínas miofibrilares, por un incremento de la actividad de la ruta de la ubiquitina-proteasoma. Aunque este es un tipo prevalente en la diabetes de tipo 1, solo se explica parcialmente por la privación de insulina y en estudios experimentales en ratones db/db se muestra que la resistencia a la insulina produce emaciación muscular.

25 La pérdida de músculo esquelético se produce en los modelos de diabetes hipoinsulinémica grave (inducida por estreptozocina) y muy resistente a insulina (ob/ob) en ratones. La pérdida de proteína muscular en diabetes se asocia tanto con una depresión de síntesis de proteínas como con un incremento en la degradación proteica en el músculo esquelético. El incremento en la degradación proteica está asociado con un aumento de la actividad de la caspasa 3 y del proteasoma.

30 La obesidad está asociada con la resistencia a la insulina y con la diabetes de tipo 2. En los adipocitos se observa una alteración de la lipólisis inducida por catecolaminas y la reducción de la expresión de la lipasa sensible a hormonas (HSL) en la obesidad, que se ha sugerido que contribuyen al desarrollo, o mantenimiento, de las reservas tisulares adiposas incrementadas. Por el contrario los adipocitos de los sujetos caquéxicos muestran un incremento de dos o tres veces la respuesta lipolítica con un incremento de la expresión de la HSL.

35 La Zinc- α_2 -glucoproteína (ZAG) se ha identificado como un factor movilizador de lípidos (FML) con el potencial de inducir pérdida de grasa en la caquexia por cáncer. Se ha demostrado que la ZAG induce lipólisis en los adipocitos blancos mediante la interacción con el receptor β_3 -adrenérgico, mientras que, in vivo, aumentó la expresión de la proteína 1 de desacoplamiento (UCP-1) en el tejido adiposo marrón (TAM) e indujo pérdida de grasa corporal. Además de algunos tumores, el tejido adiposo blanco (TAB) y el TAM también producen ZAG y su expresión está regulada por incremento en la caquexia. Por el contrario la expresión de ZAG en el tejido adiposo de los seres humanos obesos fue únicamente el 30% de la que se encuentra en los sujetos no obesos. Esto sugiere que la pérdida de expresión de ZAG en el TAB podría constituir algunas de las características de la obesidad. Ciertamente, la inactivación de ambos alelos de la ZAG en ratones condujo a un incremento del peso corporal que fue más pronunciado cuando los animales recibieron una dieta rica en grasas. La respuesta lipolítica a varios agentes disminuyó significativamente en los adipocitos de animales deficientes en ZAG.

40 Hasta la fecha todos los estudios sobre el efecto movilizador de lípidos de ZAG se han llevado a cabo en ratones, usando ZAG humana, aunque la identidad de la secuencia de aminoácidos de ZAG entre el ratón y el ser humano es de únicamente un 58,6 %. Dado que la homología de secuencia entre ratas y ratones es del 88,5 %, esto sugiere que si la ZAG humana se une al receptor del ratón, también debe ser eficaz en la rata. En el estudio actual se investiga el efecto antiobesidad de la ZAG humana en ratas Wistar macho maduras.

55 El documento US 6890899 divulga que un polipéptido denominado factor movilizador de lípidos reduce los niveles de glucosa en sangre en un modelo animal in vivo.

60 El documento WO 03/050281 divulga que se puede usar la proteína de interacción Genset ZAG para disminuir los niveles de glucosa en sangre.

Sumario de la invención

La presente invención está basada en el hallazgo de que la Zn- α_2 -glucoproteína (ZAG) tiene un efecto sobre el peso corporal y la respuesta a la insulina en ratones hiperglucémicos obesos adultos (ob/ob) y en ratas Wistar maduras, como modelos de la diabetes de tipo 2. Dicho hallazgo es útil en procedimientos para mejorar los síntomas asociados con la hiperglucemia.

Por tanto la presente invención se refiere a un polipéptido que tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID N.º: 1 para uso en la mejora de los síntomas de hiperglucemia administrando al sujeto una dosificación terapéuticamente eficaz durante un periodo de 21 días o mayor, en el que existe una mejora continua de los síntomas de hiperglucemia durante el curso del tratamiento.

De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación proporciona un procedimiento de mejora de los síntomas de hiperglucemia en un sujeto. El procedimiento incluye administrar al sujeto que necesite dicho tratamiento una dosificación terapéuticamente eficaz de un polipéptido que tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID N.º: 1 durante un periodo de aproximadamente 21 días o mayor, lo que tiene como resultado una mejora de los síntomas asociados con la hiperglucemia tras el tratamiento. El polipéptido se puede administrar dos veces al día. El polipéptido se puede administrar por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal u oral. El polipéptido se puede administrar en combinación con uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en un antagonista del receptor β_3 -adrenérgico (β_3 -AR) y un agonista de β_3 . En una opción, el antagonista de β_3 -AR es SR59230A. En otra opción, el agonista de β_3 es AMNI-BRL37344 (BRL37344). En otra opción, el polipéptido está glucosilado.

La mejora de los síntomas asociada con la hiperglucemia incluye, pero no está limitada a, una disminución de los niveles de glucosa en suero, una disminución de los niveles de triglicéridos en suero, una disminución de los niveles de insulina en suero y una disminución de los niveles de ácidos grasos no esterificados en suero, en comparación con los niveles en suero antes del tratamiento. En una realización, la mejora de los síntomas incluye un incremento de la temperatura corporal de aproximadamente 0,4 a 1 °C en un plazo de 1 día desde el inicio del tratamiento, en comparación con la temperatura corporal antes del tratamiento. En otra realización, la mejora de los síntomas incluye una disminución de los niveles de insulina en plasma en un plazo de 3 días desde el inicio del tratamiento, en comparación con los niveles de insulina en plasma antes del tratamiento. Los niveles de insulina y/o glucosa y triglicéridos en plasma se pueden disminuir tanto como un 36 % en comparación con los niveles de insulina y/o glucosa y triglicéridos en plasma antes del tratamiento. En otra realización, la mejora de los síntomas comprende la normalización de los niveles de glucosa en sangre y la secreción de la insulina en respuesta a la glucosa intravenosa (2 g/kg) en un plazo de 3 días desde el inicio del tratamiento. En otra realización, la mejora de los síntomas comprende un incremento de los niveles de insulina pancreática, en comparación con los niveles de insulina pancreática antes del tratamiento. En aún otra realización, la mejora de los síntomas comprende un incremento de la expresión de la proteína 1 de desacoplamiento (UCP-1) y la proteína 3 de desacoplamiento (UCP3) en el tejido adiposo marrón, en comparación con la expresión de UCP1 y UCP3 antes del tratamiento. En otra realización, la mejora de los síntomas comprende un incremento de la expresión de la UCP3 en el músculo esquelético, en comparación con la expresión de UCP3 antes del tratamiento. En otra realización, el polipéptido está glucosilado.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de disminución de los niveles de insulina en plasma en un sujeto. El procedimiento incluye administrar al sujeto una dosificación terapéuticamente eficaz de un polipéptido que tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID N.º: 1. La disminución de los niveles de insulina en plasma se puede producir en un plazo de 3 días desde la administración del polipéptido. En otra opción, el polipéptido se administra en combinación con uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en un antagonista del receptor β_3 -adrenérgico (β_3 -AR) y un agonista de β_3 . En una opción, el antagonista de β_3 -AR es SR59230A. En otra opción, el agonista de β_3 es AMNI-BRL37344 (BRL37344). En otra opción, el polipéptido está glucosilado.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de aumento de la masa muscular esquelética en un sujeto. El procedimiento incluye administrar al sujeto un polipéptido que tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID N.º: 1. En una realización, el músculo esquelético es un músculo gastrocnemio o un músculo sóleo. En otra opción el polipéptido se administra en combinación con uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en un antagonista del receptor β_3 -adrenérgico (β_3 -AR) y un agonista de β_3 . En una opción, el antagonista de β_3 -AR es SR59230A. En otra opción, el agonista de β_3 es AMNI-BRL37344 (BRL37344). En otra opción, el polipéptido está glucosilado.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de un sujeto para producir una reducción del peso o una reducción de la obesidad. El procedimiento incluye administrar al sujeto que necesite dicho tratamiento una dosificación terapéuticamente eficaz de un polipéptido que tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID N.º: 1 en combinación con uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en un antagonista del receptor β_3 -adrenérgico (β_3 -AR) y un agonista de β_3 . En una forma, el antagonista de β_3 -AR es SR59230A. En otra opción, el agonista de β_3 es AMNI-BRL37344 (BRL37344). En otra forma, el polipéptido está glucosilado.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de un sujeto para producir una reducción del peso o una reducción de la obesidad. El procedimiento incluye administrar al sujeto que necesite dicho tratamiento una dosificación terapéuticamente eficaz de un polipéptido que tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID N.º: 1 en combinación con uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en un antagonista del receptor β 3-adrenérgico (β 3-AR) y un agonista de β 3. En una forma el antagonista de β 3-AR es SR59230A. En otra forma el agonista de β 3 es AMNI-BRL37344 (BRL37344). En otra forma, el polipéptido está glucosilado.

En otro aspecto, la presente divulgación de invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que tiene la secuencia como se muestra en la SEC ID N.º: 1 y un agente seleccionado del grupo que consiste en un antagonista del receptor β 3-adrenérgico (β 3-AR) y un agonista de β 3. En una forma, el antagonista de β 3-AR es SR59230A. En otra opción, el agonista de β 3 es AMNI-BRL37344 (BRL37344). En otra forma, el polipéptido está glucosilado.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A es un diagrama ilustrado que muestra la caracterización de ZAG y su efecto sobre la lipólisis y el peso corporal de los ratones ob/ob. Tinción de Coomassie tras una SDS-PAGE al 12 % que muestra las proteínas totales en medio celular 293 y se purificó ZAG como se ha descrito.

La Figura 1B es un diagrama ilustrado que muestra los resultados de una transferencia de tipo Western que muestra la expresión de ZAG en medio de cultivo y ZAG purificada.

La Figura 1C es un diagrama gráfico que muestra los niveles de ARNm de ZAG en el tejido adiposo y el tejido hepático en ratones MAC16 que sufren pérdida de peso. * $P < 0,01$.

La Figura 1D es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la lipólisis en adipocitos epididimarios de ratones no obesos (■) y ob/ob (□) en respuesta a la isoprelina (Iso) y ZAG. Las diferencias con respecto a ratones no obesos se muestran como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

La Figura 1E es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la lipólisis en adipocitos de depósitos epididimarios (ep), subcutáneos (sc) y viscerales (vis) de ratones obesos (ob/ob) y no obesos (no ob) sin tratamiento (■), isoprenalina (10 μ M) (□) o ZAG (0,46 μ M) (○). Las diferencias con los adipocitos epididimarios se muestran como ** $p < 0,01$.

La Figura 1F es un diagrama gráfico que muestra el efecto de ZAG (■) sobre el peso corporal de ratones ob/ob en comparación con PBS (◆) como se ha descrito en los procedimientos. Las diferencias en el peso desde el tiempo cero y los controles de PBS se muestran como *** $p < 0,001$.

La Figura 1G es un diagrama gráfico que muestra el efecto de ZAG (□) sobre la temperatura corporal de los ratones mostrada en e en comparación con los controles PBS (■). Las diferencias con respecto a los controles se muestran como *** $p < 0,001$.

La Figura 2A es un diagrama gráfico que muestra tolerancia a la glucosa, captación de glucosa en adipocitos y el músculo gastrocnemio de ratones ob/ob tratados con ZAG. Los niveles de glucosa en plasma de ratones ob/ob en estado alimentado tratados con ZAG (■) o PBS (◆) durante 3 días tras la administración i.v. de glucosa (2 g/kg). $p < 0,001$ de PBS. Las muestras de sangre se extrajeron de la vena de la cola a intervalos tras la administración de la glucosa y se usaron para la medición de glucosa e insulina.

La Figura 2B es un diagrama gráfico que muestra los niveles de insulina en plasma en ratones ob/ob tratados con ZAG tras la administración oral de glucosa (1 g/kg). $p < 0,001$ con respecto al PBS.

La Figura 2C es un diagrama gráfico que muestra la captación de glucosa en adipocitos epididimarios (ep.), visceral (vis) y subcutáneos (s.c.) de ratones ob/ob tratados con ZAG durante 5 días en presencia de insulina 0 (■), 1 (□) o 10 nM (○). Las diferencias en la presencia de ZAG se indican como *** $p < 0,001$.

La Figura 2D es un diagrama gráfico que muestra la captación de 2-desoxi-D-glucosa en el músculo gastrocnemio de ratones ob/ob tratados con ZAG o PBS durante 5 días en ausencia o presencia de insulina (100 nM). Las diferencias en presencia de insulina se muestran como * $p < 0,05$ o ** $p < 0,01$, aunque las diferencias en la presencia de ZAG se muestran como *** $p < 0,001$.

La Figura 2E es un diagrama ilustrativo que muestra el efecto de ZAG sobre la síntesis y degradación de proteínas en el músculo esquelético de ratones ob/ob. Tras el tratamiento de los ratones ob/ob durante 5 días se extrajo músculo esquelético y se realizó transferencia de tipo Western para determinar la expresión de GLUT4.

La Figura 3A es un diagrama gráfico que muestra el efecto de ZAG sobre la síntesis y degradación de proteínas en el músculo esquelético de ratones ob/ob. Tras el tratamiento de los ratones ob/ob durante 5 días se extrajo músculo esquelético y se usó para la medición de la síntesis de proteínas. Las diferencias con respecto a los controles de PBS o los animales no obesos se muestran como *** $p < 0,001$.

La Figura 3B es un diagrama gráfico que muestra el efecto de ZAG sobre la síntesis y degradación de proteínas en el músculo esquelético de ratones ob/ob. Tras el tratamiento de los ratones ob/ob durante 5 días se extrajo músculo esquelético y se usó para la medición de la degradación de proteínas. Las diferencias con respecto a los controles de PBS o los animales no obesos se muestran como *** $p < 0,001$.

La Figura 3C es un diagrama gráfico que muestra el efecto de ZAG sobre la síntesis y degradación de proteínas en el músculo esquelético de ratones ob/ob. Tras el tratamiento de los ratones ob/ob durante 5 días se extrajo músculo esquelético y se usó para la medición de la actividad enzimática de tipo quimotripsina. Las diferencias con respecto a los controles de PBS o los animales no obesos se muestran como *** $p < 0,001$.

La Figura 3D es un diagrama ilustrativo que muestra el efecto de ZAG sobre la síntesis y degradación de proteínas en el músculo esquelético de ratones ob/ob. Tras el tratamiento de los ratones ob/ob durante 5 días se extrajo músculo esquelético y se realizó transferencia de tipo Western para determinar la expresión de las subunidades α del proteasoma 20S.

La Figura 3E es un diagrama ilustrativo que muestra el efecto de ZAG sobre la síntesis y degradación de proteínas en el músculo esquelético de ratones ob/ob. Tras el tratamiento de los ratones ob/ob durante 5 días se extrajo músculo esquelético y se realizó transferencia de tipo Western para determinar la expresión de p42.

La Figura 3F es un diagrama ilustrativo que muestra el efecto de ZAG sobre la síntesis y degradación de proteínas en el músculo esquelético de ratones ob/ob. Tras el tratamiento de los ratones ob/ob durante 5 días se extrajo músculo esquelético y se realizó transferencia de tipo Western para determinar la expresión de miosina.

La Figura 3G es un diagrama ilustrativo que muestra el efecto de ZAG sobre la síntesis y degradación de proteínas en el músculo esquelético de ratones ob/ob. Tras el tratamiento de los ratones ob/ob durante 5 días se extrajo músculo esquelético y se realizó transferencia de tipo Western para determinar la expresión de actina.

La Figura 4A es un diagrama ilustrativo que muestra el efecto de ZAG sobre las rutas de señalización catabólica en el músculo esquelético mediante transferencia de tipo Western de fosfo PKR en el músculo gastrocnemio de ratones ob/ob tras el tratamiento bien con PBS o bien con ZAG 5 días. Las formas totales de las proteínas sirven como controles de carga. Las diferencias con respecto a los controles de PBS se muestran como *** $p < 0,001$, mientras que las diferencias con respecto a los ratones no obesos se muestran como # $p < 0,001$.

La Figura 4B es un diagrama ilustrativo que muestra el efecto de ZAG sobre las rutas de señalización catabólica en el músculo esquelético mediante transferencia de tipo Western de fosfo eIF2 α en el músculo gastrocnemio de ratones ob/ob tras el tratamiento bien con PBS o bien con ZAG durante 5 días. Las formas totales de las proteínas sirven como controles de carga. Las diferencias con respecto a los controles de PBS se muestran como *** $p < 0,001$ mientras que las diferencias con respecto a los ratones no obesos se muestran como # $p < 0,001$.

La Figura 4C es un diagrama ilustrativo que muestra el efecto de ZAG sobre las rutas de señalización catabólica en el músculo esquelético mediante transferencia de tipo Western de fosfo PLA $_2$ en el músculo gastrocnemio de ratones ob/ob tras el tratamiento bien con PBS o bien con ZAG durante 5 días. Las formas totales de las proteínas sirven como controles de carga. Las diferencias con respecto a los controles de PBS se muestran como *** $p < 0,001$, mientras que las diferencias con respecto a los ratones no obesos se muestran como # $p < 0,001$.

La Figura 4D es un diagrama ilustrativo que muestra el efecto de ZAG sobre las rutas de señalización catabólica en el músculo esquelético mediante transferencia de tipo Western de fosfo p38MAPK en el músculo gastrocnemio de ratones ob/ob tras el tratamiento bien con PBS o bien con ZAG durante 5 días. Las formas totales de las proteínas sirven como controles de carga. Las diferencias con respecto a los controles de PBS se muestran como *** $p < 0,001$, mientras que las diferencias con respecto a los ratones no obesos se muestran como # $p < 0,001$.

La Figura 4E es un diagrama ilustrativo que muestra el efecto de ZAG sobre las rutas de señalización catabólica en el músculo esquelético mediante la actividad de la caspasa-3 (■) y la caspasa-8 (□) en el músculo gastrocnemio de ratones ob/ob tras el tratamiento con PBS o ZAG durante 5 días.

La Figura 5A es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de HSL y de ATGL en respuesta a ZAG. Las transferencias de tipo Western muestran la expresión de fosfo HSL en adipocitos de ratones no obesos 3 horas después sin tratamiento (Con) o con tratamiento con isoprenalina (10 μ M) o ZAG (0,46 μ M) solos o en presencia de PD98059 (25 μ M) tras 5 días de tratamiento con ZAG.

- La Figura 5B es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de HSL mediante inmunotransferencia en adipocitos epididimarios (ep) tras 5 días de tratamiento con ZAG.
- 5 La Figura 5C es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de HSL mediante inmunotransferencia en adipocitos subcutáneos (sc) tras 5 días de tratamiento con ZAG.
- La Figura 5D es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de HSL mediante inmunotransferencia en adipocitos viscerales (vis) tras 5 días de tratamiento con ZAG.
- 10 La Figura 5E es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de ATGL en adipocitos epididimarios tras 5 días de tratamiento con ZAG.
- La Figura 5F es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de ATGL en adipocitos subcutáneos tras 5 días de tratamiento con ZAG.
- 15 La Figura 5G es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de ATGL en adipocitos viscerales tras 5 días de tratamiento con ZAG.
- La Figura 5H es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de ERK en adipocitos epididimarios tras 5 días de tratamiento con ZAG.
- 20 La Figura 5I es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de ERK en adipocitos subcutáneos tras 5 días de tratamiento con ZAG.
- 25 La Figura 5J es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de ERK en adipocitos viscerales tras 5 días de tratamiento con ZAG.
- La Figura 5K es un diagrama gráfico que muestra la respuesta de los adipocitos de depósitos epididimarios (ep), subcutáneos (sc) y viscerales (vis) de ratones ob/ob tratados con PBS o ZAG durante 5 días al efecto lipolítico de BRL37344. Las diferencias de los controles de PBS se indican como *** $p < 0,01$, mientras las diferencias en presencia de PD98059 se muestran como # $p < 0,001$.
- 30 La Figura 6A es un diagrama ilustrativo que muestra el efecto del tratamiento de los ratones ob/ob durante 5 días con ZAG sobre la expresión de ZAG y HSL en TAB, UCP1 y UCP3 en TAM y UCP3 en el músculo gastrocnemio. Transferencia de tipo Western que muestra la expresión de ZAG en adipocitos ep, sc y vis. El día 0 representa el día que se extrajeron los adipocitos de los ratones.
- 35 La Figura 6B es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de ZAG en adipocitos epididimarios suspendidos en medio RMPI como se describe en los procedimientos. Las muestras se sacaron a intervalos diarios y se realizó transferencia de tipo Western para la expresión de ZAG. El día 0 representa el día que se extrajeron los adipocitos de los ratones.
- 40 La Figura 6C es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de HSL en adipocitos epididimarios suspendidos en medio RMPI como se describe en los procedimientos. Las muestras se sacaron a intervalos diarios y se realizó transferencia de tipo Western para la expresión de HSL. El día 0 representa el día que se extrajeron los adipocitos de los ratones.
- 45 La Figura 6D es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de UCP1 en TAM extraído de ratones. Las diferencias con respecto a los ratones tratados con PBS se muestran como *** $p < 0,001$.
- 50 La Figura 6E es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de UCP3 en TAM extraído de ratones. Las diferencias con respecto a los ratones tratados con PBS se muestran como *** $p < 0,001$.
- La Figura 6F es un diagrama ilustrativo que muestra la expresión de UCP3 en músculo gastrocnemio extraído de ratones. Las diferencias con respecto a los ratones tratados con PBS se muestran como *** $p < 0,001$.
- 55 La Figura 7A es un diagrama gráfico que muestra la pérdida de peso de los ratones ob/ob durante el estudio de 21 días. Se inyectó ZAG los días 1, 4, 5, 8, 13, 16, 18 y 19; se inyectó PBS en los mismos puntos de tiempo.
- 60 La Figura 7B es un diagrama gráfico que muestra el cambio de peso (g) de los ratones ob/ob (peso 80-90 g) durante el tratamiento con ZAG.
- La Figura 7C es un diagrama gráfico que muestra el incremento de la temperatura corporal de los ratones ob/ob durante el estudio de 21 días. Se inyectó ZAG los días 1, 4, 5, 8, 13, 16, 18 y 19; se inyectó PBS en los mismos puntos de tiempo.
- 65

- La Figura 8A es un diagrama gráfico que muestra la disminución progresiva de la excreción de glucosa en orina durante los primeros 5 días de tratamiento.
- 5 La Figura 8B es un diagrama gráfico que muestra la disminución progresiva de la excreción de glucosa en orina durante el estudio de 21 días.
- La Figura 9 es un diagrama gráfico que muestra la liberación de glicerol estimulada por adipocitos aislados con isoprenalina (iso) que se han cultivado durante hasta 5 días de ratones ob tratados con y sin ZAG.
- 10 La Figura 10 es un diagrama ilustrativo que muestra la secuencia completa de aminoácidos (SEC ID N.º: 1) de la Zn- α_2 -glucoproteína en plasma humana, tal como publica T. Araki et al. (1988) "Complete amino acid sequence of human plasma Zn- α_2 -glycoprotein and its homology to histocompatibility antigens."
- 15 La Figura 11 es un diagrama gráfico que muestra la actividad lipolítica de ZAG humana en adipocitos epididimarios aislados de rata en comparación con isoprenalina (10 μ M) en ausencia o presencia de SR59230A (10 μ M) o anticuerpos anti-ZAG (1:1000) (IgG). Cada valor es un promedio de 5 estudios distintos. Las diferencias con respecto al control se muestran como b, $p < 0,01$ o c, $p < 0,001$, mientras que las diferencias con respecto a ZAG solo se indican como e, $p < 0,01$ o f, $p < 0,001$.
- 20 La Figura 12A es un diagrama gráfico que muestra el efecto de la administración i.v. diaria de ZAG ((50 μ g/100 g p.c.) en 100 μ l PBS (■) o PBS solo (♦) sobre el peso corporal de ratas Wistar macho en un periodo de 10 días. El protocolo para el experimento se proporciona en la sección de procedimientos.
- 25 La Figura 12B es un diagrama gráfico que muestra la temperatura corporal de ratas macho Wistar a las que se ha administrado ZAG (■) o PBS (♦) como se describe en la Figura 12A.
- La Figura 12C es un diagrama gráfico que muestra la captación de 2-desoxi-D-glucosa en adipocitos epididimarios de ratas Wistar macho tras 10 días de tratamiento bien con ZAG (recuadros vacíos) o bien con PBS (recuadros rellenos) durante 10 días, como se muestra en la Figura 12A, en ausencia o presencia de insulina (60 μ U/ml).
- 30 La Figura 12D es un diagrama gráfico que muestra la captación de la glucosa en el músculo gastrocnemio en TAM de ratas Wistar macho tras 10 días de tratamiento bien con ZAG o bien con PBS, en ausencia o presencia de insulina (60 μ U/ml). Las diferencias entre animales tratados con ZAG y con PBS se muestran como a, $p < 0,05$, b, $p < 0,01$ o c, $p < 0,001$, mientras que las diferencias en presencia de insulina se muestran como o f, $p < 0,001$.
- 35 La Figura 12E es un diagrama gráfico que muestra el Rg tisular en ratones ob/ob a los que se ha administrado ZAG. c, $p < 0,001$ con respecto a PBS.
- 40 Las Figuras 13A-13C son diagramas ilustrativos de transferencias de tipo Western que muestran la expresión de GLUT4 en TAM (Figura 13A) y TAB (Figura 13B) en el músculo gastrocnemio (Figura 13C) de ratas Wistar macho tratadas bien con PBS o bien con ZAG durante 10 días como se muestra en la Figura 12. Las diferencias entre los animales tratados con ZAG y PBS se muestran como c, $p < 0,001$.
- 45 Las Figuras 14A y 14B son diagramas ilustrativos de transferencias de tipo Western que muestran la expresión de UCP1 y UCP3 en TAM (Figura 14A) y TAB (Figura 14B) de ratas Wistar macho tratadas bien con PBS o bien con ZAG durante 10 días como se muestra en la Figura 12. Las diferencias entre los animales tratados con ZAG y PBS se muestran como c, $p < 0,001$.
- 50 Las Figuras 15A y 15B son diagramas ilustrativos de transferencias de tipo Western que muestran la expresión de ATGL (Figura 15A) y HSL (Figura 15B) en tejido adiposo epididimario de ratas Wistar macho tratadas bien con PBS o bien con ZAG durante 10 días como se muestra en la Figura 12. Las diferencias entre los animales tratados con ZAG y PBS se muestran como c, $p < 0,001$.
- 55 Las Figuras 16A-16C son diagramas ilustrativos de transferencias de tipo Western que muestran la expresión de ZAG en el músculo gastrocnemio (Figura 16A), TAB (Figura 16B) y TAM (Figura 16C). Los tejidos se escindieron de ratas Wistar macho tratadas bien con PBS o bien con ZAG durante 10 días como se muestra en la Figura 12. Las diferencias entre los animales tratados con ZAG y PBS se muestran como $p < 0,001$.
- 60 Las Figuras 17A y 17B son diagramas ilustrativos de transferencias de tipo Western que muestran la expresión de formas fosforiladas y totales de PKR (Figura 17A) y eIF2 α (Figura 17B) en el músculo gastrocnemio de ratas Wistar tratadas bien con PBS o bien con ZAG durante 10 días como se muestra en la Figura 12. El análisis densitométrico es la proporción entre fósforo y las formas totales, expresada como un porcentaje del valor para las ratas tratadas con PBS.

Las Figuras 18A y 18B son un diagrama gráfico que muestra la liberación de fenilalanina (Figura 18A) y la síntesis de proteínas (Figura 18B) en miotubos C2C12 tratados con o sin ZAG durante 4 horas en presencia de varias concentraciones de glucosa. Estadísticamente significativo c, $P < 0,001$ con respecto al control; f, $P < 0,001$ de la glucosa sola.

5 La Figura 19 es un diagrama gráfico que muestra la liberación de fenilalanina en miotubos C2C12 tratados con y sin ZAG en presencia de varias concentraciones de glucosa y con y sin SR59230A. Estadísticamente significativo b, $P < 0,01$ y c, $P < 0,001$ con respecto al control; e, $P < 0,05$ y f, $P < 0,001$ con respecto a la glucosa sola.

10 La Figura 20 es un diagrama gráfico que muestra la síntesis de proteínas en miotubos C2C12 tratados con y sin ZAG en presencia de varias concentraciones de glucosa y con y sin SR59230A. Estadísticamente significativo b, $P < 0,01$ y c, $P < 0,001$ con respecto al control; e, $P < 0,05$ y f, $P < 0,001$ con respecto a la glucosa sola. I, $P < 0,001$ con respecto a glucosa+SR.

15 La Figura 21 es un diagrama gráfico que muestra la actividad de ROS en miotubos C2C12 tratados con varias concentraciones de glucosa con y sin ZAG. Estadísticamente significativo c, $P < 0,001$ con respecto al control; f, $P < 0,001$ de la glucosa sola.

20 La Figura 22A es un diagrama ilustrativo de una transferencia de tipo Western que muestra PKR en miotubos C2C12 con glucosa con y sin ZAG. Estadísticamente significativo c, $P < 0,001$ con respecto al control; f, $P < 0,001$ de la glucosa sola.

25 La Figura 22B es un diagrama ilustrativo de una transferencia de tipo Western que muestra eIF2 α en miotubos C2C12 con glucosa con y sin ZAG. Estadísticamente significativo c, $P < 0,001$ con respecto al control; f, $P < 0,001$ de la glucosa sola.

Las Figuras 23A y 23B son diagramas gráficos que muestran los resultados de una prueba de tolerancia a la insulina en ratones ob/ob tratados con y sin ZAG. Estadísticamente significativo, b, $P < 0,05$ y c, $P < 0,001$ con respecto a ZAG.

30 La Figura 24 es un diagrama gráfico que muestra la oxidación de D-[U- 14 C glucosa] en 14 CO $_2$ en ratones ob/ob.

La Figura 25 es un diagrama gráfico que muestra la producción de 14 CO $_2$ de [14 C carboxi] trioleína en ratones ob/ob.

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención se basa en la observación de que la Zn- α 2-glicoproteína (ZAG) humana recombinante produce una disminución del peso corporal y un incremento de la capacidad de respuesta a la insulina en ratones ob/ob y en ratas Wistar sin efectos sobre la ingesta de comida. Como tal, la divulgación proporciona procedimientos para mejorar los síntomas de hiperglucemia en un sujeto, disminuyendo los niveles de insulina en plasma en un
40 sujeto e incrementando la masa de músculo esquelético en un sujeto. También se proporcionan tratamientos combinatorios para producir una reducción del peso o una reducción de la obesidad en un sujeto.

45 Antes de describir las presentes composiciones y procedimientos, debe entenderse que la presente invención no está limitada a las composiciones, procedimientos y condiciones experimentales concretas descritas, ya que dichas composiciones, procedimientos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria descriptiva es para el fin de describir únicamente formas de realización concretas y no se pretende que limite el ámbito de la presente invención, que solo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

50 Como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, las referencias al "el procedimiento" incluyen uno o más procedimientos y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de esta divulgación y así sucesivamente.

55 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los procedimientos y materiales preferidos.

60 La secuencia de aminoácidos completa de ZAG se ha publicado en un artículo titulado "Complete amino acid sequence of human plasma Zinc- α 2-glycoprotein and its homology to histocompatibility antigens" de T. Araki et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85, 679-683, en el que se demostró que la glicoproteína estaba formada por una única cadena polipeptídica de 276 residuos de aminoácidos que tienen tres estructuras de dominio distintas (A, B y C) e incluye dos puentes disulfuro junto con glicanos unidos por N en tres sitios de glucosilación. Esta secuencia de aminoácidos del componente polipeptídico se establece en la Figura 10 de las figuras adjuntas. Aunque algunas
65 publicaciones posteriores han indicado que la composición de la ZAG humana puede variar algo cuando se aísla en

diferentes fluidos corporales o tejidos, todas las preparaciones de este material tienen sustancialmente las mismas características inmunológicas. Como han indicado H. Ueyama, et al. (1991) "Cloning and nucleotide sequence of a human Zinc- α 2-glycoprotein cDNA and chromosomal assignment of its gene", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 696-703, se ha aislado el ADNc de ZAG de bibliotecas de hígado humano y glándula prostática y también se ha aislado el gen, como indican Ueyama et al., (1993) "Molecular cloning and chromosomal assignment of the gene for human Zinc- α 2-glycoprotein", *Biochemistry* 32, 12968-12976. H. Ueyama et al. también han descrito en *J. Biochem.* (1994) 116, 677-681, estudios sobre ADNc de ZAG de hígado de rata y ratón que, junto con la glucoproteína expresada por los correspondientes ARNm, se han secuenciado y comparado con el material humano. Aunque se encontraron diferencias detalladas como cabría esperar de diferentes especies, se encontró un elevado grado de homología de la secuencia de aminoácidos con más de un 50 % de identidad con el homólogo humano (más de un 70 % de identidad dentro del dominio B de la glucoproteína). De nuevo, se han observado propiedades inmunológicas comunes entre la ZAG humana, de rata y de ratón.

La ZAG purificada tratada anteriormente se preparó a partir de plasma humano sustancialmente de acuerdo con el procedimiento descrito por Ohkubo et al. (Ohkubo et al. (1988) "Purification and characterisation of human plasma Zn- α 2-glycoprotein" *Prep. Biochem.*, 18, 413-430). Se apreciará que en algunos casos se pueden producir fragmentos del factor movilizador de lípidos aislado o de ZAG sin que se pierda la actividad lipolítica o movilizadora de lípidos y se pueden realizar diversas adiciones, deleciones o sustituciones que tampoco afectarán sustancialmente a esta actividad. Como tales, los procedimientos de la invención también incluyen el uso de fragmentos funcionales de ZAG. La glucoproteína o fragmento de la misma usada en estas aplicaciones terapéuticas pueden además producirse mediante técnicas de ADN recombinante como las que se conocen bien en la técnica basadas posiblemente en la secuencia de ADNc conocida para Zn- α 2-glycoproteína que se ha publicado en, por ejemplo, H. Ueyama et al. (1994) "Structure and Expression of Rat and Mouse mRNAs for Zn- α 2-glycoprotein" *J. Biochem.*, 116, 677-681. Además, la glucoproteína o fragmento de la misma usada en estas aplicaciones terapéuticas pueden además incluir modificaciones del polipéptido posteriores a la expresión, por ejemplo glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como no naturales.

Anteriormente se ha demostrado que la ZAG produce una reducción del peso o reducción de la obesidad en mamíferos, como se divulga en la patente n.º 6.890.899, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Además, se ha observado que un agente movilizador de lípidos que tiene características similares de ZAG y/o fragmentos de la misma también se ha usado para producir una reducción del peso o reducción de la obesidad en mamíferos, como se divulga en la solicitud publicada de EE.UU. n.º 20060160723. La presente invención demuestra que ZAG y/o fragmentos funcionales de la misma aumentan la capacidad de respuesta a la insulina de los adipocitos y del músculo esquelético y producen un incremento de la masa muscular a través de un incremento de la síntesis de proteínas acoplado a una disminución de la degradación de proteínas con independencia de si se observa una reducción del peso o reducción de la obesidad durante el tratamiento. Por tanto, se ha contemplado que los procedimientos de la presente invención proporcionan un efecto detectable sobre los síntomas asociado con hiperglucemia y/o emaciación muscular antes de cualquier reducción detectable del peso o reducción de la obesidad.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de mejora de los síntomas de hiperglucemia en un sujeto. Por ejemplo, el régimen de tratamiento puede ser durante meses (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses) o años. El polipéptido se administra durante un periodo de 21 días o mayor. La mejora de los síntomas se puede detectar en días (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días), semanas (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 semanas) o meses (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses) desde la iniciación del tratamiento. El régimen de tratamiento puede ser de aproximadamente 21 días en los que existe una mejora de los síntomas asociada con hiperglucemia tras el tratamiento.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier paciente o individuo en el que se realizan los procedimientos. En general, el sujeto es humano, aunque los expertos en la técnica apreciarán que el sujeto puede ser un animal. Por tanto, otros animales, incluyendo mamíferos tales como roedores (incluidos ratones, ratas, hámster y cobayas), gatos, perros, conejos, animales de granja, incluidos vacas, caballos, cabras, ovejas, cerdos etc. y primates (incluidos monos, chimpancés, orangutanes y gorilas) están incluidos dentro de la definición del sujeto.

Ejemplos de caracterizaciones de la hiperglucemia y/o trastornos asociados con ella incluyen, entre otros, prediabetes, diabetes de tipo 2, diabetes de tipo 1, tolerancia a la glucosa alterada, síndrome del ovario poliquístico, enfermedad del hígado graso no alcohólico, enfermedades de emaciación muscular, estados de resistencia a insulina no productores de hiperglucemia detectable, diabetes gestacional, riesgo cardiovascular e infarto de miocardio. Ejemplos de enfermedades de emaciación muscular incluyen, pero no están limitadas a, cáncer, SIDA, septicemia, EPOC, insuficiencia renal, artritis, insuficiencia cardíaca congestiva, distrofia muscular, diabetes, sarcopenia de la edad, traumatismo grave (p. ej., inmovilización ortopédica de una extremidad), acidosis metabólica, atrofia por denervación y falta de peso. Debe entenderse que un sujeto que tiene hiperglucemia y/o diabetes puede tener un peso corporal normal o promedio. Dichos individuos, denominados "diabéticos delgados" a menudo exhiben uno o más de los síntomas asociados con hiperglucemia y/o diabetes sin un incremento del peso ni obesidad.

Además, una proporción determinada de diabéticos que tienen sobrepeso o son obesos son, de hecho, diabéticos delgados con sobrepeso/obesidad superpuesto sobre la diabetes.

5 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" significa la cantidad de un compuesto o composición farmacéutica que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano buscada por el investigador, veterinario, médico u otro clínico.

10 El término "administración" o "administrar" se definen de modo que incluye un acto de proporcionar un compuesto o composición farmacéutica de la invención a un sujeto que necesite tratamiento. Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usan en la presente memoria descriptiva significan modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, normalmente por vía oral o mediante inyección e incluyen, sin limitaciones, la inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal y la infusión. Las frases "administración sistémica" o "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado por vía periférica", como se usa en el presente documento, significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material de forma distinta a directamente en el sistema nervioso central, de modo que entra en el sistema del sujeto y por tanto, está sujeto al metabolismo y a otros procesos similares, por ejemplo administración subcutánea.

20 Como se usa en el presente documento, el término "mejorar" o "tratar" significa que los signos clínicos y/o los síntomas asociados con la hiperglucemia disminuyen como resultado de las acciones realizadas. Los signos o síntomas que se van a vigilar serán característicos de la hiperglucemia y serán conocidos por el clínico experto, como lo serán los procedimientos para vigilar los signos y afecciones. Ejemplos de los síntomas asociados con la hiperglucemia incluyen, pero no están limitados a, incrementos de los niveles de glucosa en suero, incrementos de los niveles de triglicéridos en suero, incrementos de los niveles de insulina en suero e incrementos de los niveles de ácidos grasos no esterificados (NEFA) en suero, en comparación con un sujeto normal o un sujeto que no tiene hiperglucemia. Como tal, una mejora de los síntomas asociados con hiperglucemia incluye, pero no están limitada a, disminución de los niveles de glucosa en suero, disminución de los niveles de triglicéridos en suero, disminución de los niveles de insulina en suero, disminución de los niveles de ácidos grasos no esterificados en suero, disminución de los niveles de insulina en plasma, incremento de los niveles de insulina pancreática e incremento de la masa muscular.

35 Como se usan en el presente documento, los términos "reducen" e "inhiben" se usan juntos porque se ha reconocido que, en algunos casos, una disminución puede reducirse por debajo del nivel de detección de un ensayo concreto. Como tal, no siempre puede estar claro si el nivel de expresión o actividad se "reduce" por debajo de un nivel de detección de un ensayo o está completamente "inhibido". No obstante, se podrá determinar claramente, tras un tratamiento de acuerdo con los presentes procedimientos, que el nivel de, por ejemplo, insulina en suero, se reduce al menos con respecto al nivel anterior al tratamiento.

40 Se ha atribuido a la ZAG una serie de papeles biológicos, pero su papel como una adipocina que regula la movilización y la utilización de lípidos es de la mayor importancia en la regulación de la composición corporal. En estudios anteriores se ha sugerido que el incremento en la síntesis de proteínas se debía a un incremento en el AMP cíclico a través de la interacción con el β -adrenoceptor, mientras que la disminución de la degradación de proteínas se debía a una reducción de la actividad de la ruta proteolítica de la ubiquitina-proteasoma. Los estudios en ratones db/db muestran que la resistencia a la insulina produce emaciación muscular por un aumento de la actividad de la ruta de la ubiquitina-proteasoma. Un incremento de la fosforilación tanto de PKR como de eIF2 α reducirá la síntesis de proteínas mediante el bloqueo del inicio de la traducción, mientras que la activación de la PKR aumentará la degradación de proteínas por la activación del factor κ B (NF- κ B) nuclear, incrementando la expresión de subunidades del proteasoma. Los estudios in vitro realizados con miotubos en presencia de niveles elevados de glucosa extracelular mostraron que la activación de PKR conducía a la activación de p38MAPK y a la formación de especies de oxígeno reactivas (ROS). p38MAPK puede fosforilar y activar cPLA₂ en Ser-505, lo que produce la liberación de ácido araquidónico, una fuente de ROS. La hiperactivación de p38MAPK en el músculo esquelético se ha observado en modelos de obesidad inducida por la dieta. Además se ha demostrado un incremento de la actividad de la caspasa-3 en el músculo esquelético de animales diabéticos, lo que puede ser parte de la cascada de señalización, ya que puede escindir la PKR conduciendo a activación. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, la capacidad de ZAG para atenuar estas rutas de señalización proporciona una explicación con respecto a su capacidad para aumentar la masa muscular.

60 De acuerdo con lo anterior, en otro aspecto la divulgación proporciona un procedimiento de aumentar la masa muscular esquelética en un sujeto. El procedimiento incluye administrar al sujeto un polipéptido que tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID N.º: 1.

65 Además, se ha demostrado que la ZAG incrementa la oxidación de la glucosa e incrementa la tasa metabólica de la glucosa tisular en ratones macho adultos. Esta mayor utilización de la glucosa explicaría el descenso tanto de los niveles de glucosa en sangre como de los niveles de insulina en ratones ob/ob a los que se ha administrado ZAG. La utilización de triglicéridos también aumentó en ratones a los que se ha administrado ZAG, lo que explicaría el

descenso en plasma de ácidos grasos no esterificados (NEFA) y de triglicéridos (TG) a pesar del incremento del glicerol en plasma, indicativo de un aumento de la lipólisis. La mayor utilización de lípidos se podría prever a partir del incremento de la expresión de UCP1 y UCP3 en TAM y de UCP3 en músculo esquelético, lo que tiene como resultado un incremento de la temperatura corporal. Como tal, en una opción, la mejora de los síntomas asociados con la hiperglucemia también incluye un incremento de la temperatura corporal de aproximadamente 0,5 °C a aproximadamente 1 °C durante el tratamiento. En una opción, el incremento de la temperatura corporal se produce en los 4 días posteriores al inicio del tratamiento. En otra opción, la mejora de los síntomas asociados con la hiperglucemia también incluye un incremento de la insulina pancreática en comparación con los niveles de insulina pancreática antes del tratamiento, ya que la insulina es necesaria para controlar la glucosa en sangre como resultado de la presencia de ZAG.

Por tanto, se identifica a la ZAG como factor movilizador de lípidos capaz de inducir lipólisis en adipocitos blancos de ratón en un proceso dependiente del GTP, similar al inducido por las hormonas lipolíticas. Los datos presentados en el presente documento avalan estos hallazgos al demostrar que la ZAG tiene un efecto lipolítico similar en adipocitos de rata y además, produce una disminución del peso corporal y de la grasa de la carcasa en ratas macho maduras, a pesar del hecho de que la homología de secuencia entre la ZAG humana y de rata es de solo el 59,4 %.

La ZAG también cuenta con algunas de las características metabólicas del estado diabético incluyendo una reducción de los niveles de insulina en plasma y una respuesta mejorada en la prueba de la tolerancia a la glucosa. Por tanto, en otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de disminución de los niveles de insulina en plasma en un sujeto. El procedimiento incluye administrar al sujeto una dosificación terapéuticamente eficaz de un polipéptido que tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID N.º: 1. En una forma, la disminución de la insulina en plasma se produce en los 3 días posteriores al inicio del tratamiento. El régimen de tratamiento se administra durante 21 días o más.

Además la ZAG aumenta la capacidad de respuesta de los adipocitos epididimarios al efecto lipolítico de un estimulante β 3-adrenérgico. La ZAG también aumenta la expresión de HSL y ATGL en tejido adiposo epididimario que se ha descubierto que está reducida en el estado insulino-resistente obeso. Los factores que regulan la expresión de HSL y ATGL no se conocen. No obstante, el inhibidor de ERK específico, PD98059 reguló por disminución la expresión de HSL en respuesta a ZAG, lo que sugiere un papel de la MAPK en este proceso. Los ratones que carecen de MAPK fosfatasa-1 presentan actividades incrementadas de ERK y p38MAPK en TAB y son resistentes a la obesidad inducida por la dieta debido a un mayor gasto de energía. Los estudios anteriores han sugerido un papel de la MAPK en la expresión inducida por ZAG de UCP3 en el músculo esquelético. La activación de ERK puede regular la lipólisis en adipocitos mediante la fosforilación de residuos de serina de la HSL, tal como Ser-600, uno de los sitios fosforilados por la proteína cinasa A.

Los resultados presentados en el presente documento muestran que la administración de ZAG a la rata también aumenta la expresión de ATGL y HSL en la rata. La ATGL puede ser importante en el almacenamiento excesivo de las grasas en la obesidad, ya que los ratones deficientes en ATGL tienen depósitos de grasa grandes y liberación de NEFA del TAB reducida en respuesta a isoproterenol, aunque sí mostraron una sensibilidad normal a la insulina. Por el contrario los ratones sin HSL cuando se les alimentó con una dieta normal tenían pesos corporales similares a los animales salvajes. No obstante, la expresión tanto de ATGL como de HSL se ha reducido en el TAB humano en el estado de obesidad resistente a la insulina en comparación con el estado sensible a la insulina y la reducción del peso también disminuyó los niveles de ARNm y de proteínas.

Como tal, en una opción, la mejora de los síntomas asociados con la hiperglucemia también incluye un incremento de la expresión de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1) y la proteína de desacoplamiento 3 (UCP3) en el tejido adiposo marrón durante el tratamiento. En otra opción, la mejora de los síntomas asociados con la hiperglucemia también incluye un incremento de la expresión de UCP3 en músculo esquelético durante el tratamiento.

La estimulación de la lipólisis sola no eliminará los depósitos de grasa corporal, ya que sin una disminución de la energía, los NEFA liberados se volverían a sintetizar en triglicéridos en los adipocitos. Para reducir la grasa corporal, la ZAG no solo aumenta la lipólisis, como demuestra un incremento del glicerol en plasma sino que también aumenta la utilización de los lípidos, como demuestra la disminución de los niveles en plasma de triglicéridos y NEFA. Esta energía se canaliza en calor, como pone de manifiesto el incremento de 0,4 °C en la temperatura corporal en ratas tratadas con ZAG. El incremento de la utilización de energía muy probablemente surge del incremento de la expresión de UCP1, que se ha demostrado tanto en TAM como en TAB tras la administración de ZAG. Cabría esperar que un incremento de la expresión de UCP1 disminuya los niveles en plasma de NEFA, ya que son los principales sustratos de la termogénesis en TAM. TAM también tiene una capacidad elevada de utilización de glucosa, lo que explicaría en parte la disminución de la glucosa en sangre. Además hubo un incremento de la expresión de GLUT4 en músculo esquelético en TAB, lo que ayuda a mediar en el incremento de la captación de glucosa en presencia de insulina. En ratones tratados con ZAG, se produjo un incremento de la utilización/oxidación de glucosa por el cerebro, el corazón, el TAM y el músculo gastrocnemio y producción incrementada de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de D-[U- ^{14}C] glucosa, así como [^{14}C carboxi] trioleína (Figura 24). También existe un incremento por tres de la captación de oxígeno por el TAM de ratones ob/ob tras la administración de ZAG.

Aunque la ZAG aumentó la expresión de HSL en adipocitos epididimarios no hubo incremento alguno ni en los adipocitos subcutáneos ni en los viscerales. Se observó una situación similar con la expresión de la lipasa adiposa de triglicéridos (ATGL). La expresión de HSL y ATGL se correlacionó con la expresión de la forma activa (fosfo) de ERK. La expresión de HSL y ATGL en adipocitos epididimarios correlacionó con un incremento de la respuesta lipolítica al agonista de β_3 , BRL37344. Este resultado sugiere que ZAG puede actuar sinérgicamente con agonistas de β_3 .

Como se usa en el presente documento, el término "agonista" hace referencia a un agente o análogo que es capaz de inducir una respuesta farmacológica completa o parcial. Por ejemplo, un agonista se puede unir de forma productora a un receptor y reproducir la reacción fisiológica del mismo. Como tales, los procedimientos de la invención pueden incluir además administrar ZAG, o un fragmento de la misma, en combinación con un agonista de β_3 tal como BRL37344.

Se ha sugerido que la inducción de la lipólisis en adipocitos de rata por la ZAG está mediada por un β_3 -AR y el efecto de la ZAG sobre el tejido adiposo y la masa corporal magra también puede deberse a su capacidad para estimular el β_3 -AR. Se ha demostrado que la inducción de la expresión de UCP1 por ZAG está mediada por la interacción con un β_3 -AR. El incremento de la expresión de UCP1 en TAB también puede ser un efecto del β_3 -AR a través del remodelado de precursores de adipocitos del tejido marrón, ya que se produce con el agonista de β_3 -AR CL316.243. Usando ratones defectivos el efecto antiobesidad de la estimulación de β_3 -AR se ha atribuido principalmente a UCP1 en TAM y menos a UCP2 y UCP3 a través de la degradación dependiente de UCP1 de los NEFA liberados por el TAB. La captación de glucosa en tejidos periféricos de animales se estimula mediante la exposición al frío, un efecto también mediado por el β_3 -AR. Sin embargo, apuntar al β_3 -AR ha sido más difícil en seres humanos que en roedores, ya que β_3 -AR desempeña un papel menos prominente que los subtipos β_1 - y β_2 -AR en el control de la lipólisis y el flujo sanguíneo nutritivo en el tejido adiposo abdominal subcutáneo humano. Sin embargo, a pesar de esto se ha demostrado que el agonista de β_3 -AR CL316.243 aumenta la oxidación de las grasas en voluntarios jóvenes sanos de sexo masculino. Esto puede deberse a la capacidad de los agonistas β -adrenérgicos para aumentar el número de β_3 -AR en las membranas plasmáticas de TAM.

Resultados recientes sugieren que la expresión ZAG en el tejido adiposo puede ser más importante localmente que la ZAG circulante, actuando de una manera paracrina. Por lo tanto en seres humanos, mientras que los niveles de ARNm de ZAG en la grasa visceral y subcutánea correlacionaron de forma negativa con el IMC, la masa grasa y la resistencia a la insulina, los niveles séricos, determinados mediante ELISA, correlacionaron positivamente con los parámetros de adiposidad (IMC y circunferencia de la cintura) y la resistencia a la insulina. Por tanto la capacidad de ZAG para inducir su propia expresión en el músculo gastrocnemio, TAB y TAM puede ser crítica para su capacidad para aumentar la lipólisis y la utilización de energía.

Estos resultados proporcionan pruebas de la capacidad de ZAG para movilizar y utilizar los lípidos en ratas, lo que confirma un efecto independiente de la especie y sugieren que puede ser útil como agente contra la obesidad en seres humanos. De acuerdo con lo anterior, en otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de un sujeto para producir una reducción del peso o una reducción de la obesidad. El procedimiento incluye administrar al sujeto que necesite dicho tratamiento una dosis terapéuticamente eficaz de un agonista de β_3 en combinación con un polipéptido que tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID N.º: 1. En otra opción el procedimiento de tratamiento de un sujeto para lograr una reducción de peso o reducción de la obesidad incluye administrar al sujeto que necesite dicho tratamiento una dosificación terapéuticamente eficaz de un antagonista de β_3 -AR en combinación con un polipéptido que tiene la secuencia como se muestra en la SEC ID N.º: 1.

Todos los procedimientos pueden incluir además la etapa de poner el o los ingredientes activos (por ejemplo, ZAG o fragmentos funcionales de ZAG) en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, que constituye uno o más ingredientes accesorios. Como tal, la invención también proporciona composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de sujetos que tienen síntomas asociados con hiperglucemia. La composición incluye como constituyente activo una cantidad terapéuticamente eficaz de ZAG o factor de movilización de lípidos glucoproteico como se ha tratado anteriormente, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles para la formulación de una composición para administración a un sujeto son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas tales como agua o solución salina fisiológicamente tamponada u otros disolventes o vehículos tales como glicoles, glicerol, aceites tales como aceite de oliva o ésteres orgánicos inyectables. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede contener además compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar o incrementar la absorción del conjugado. Dichos compuestos fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, hidratos de carbono, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizantes o excipientes. Un experto en la técnica sabría que la elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de las características fisicoquímicas del agente terapéutico y de la vía de administración de la composición, que puede ser, por ejemplo, por vía oral o parenteral tal como por vía intravenosa y mediante inyección, intubación, u otro procedimiento conocido en la técnica. La composición farmacéutica también puede contener un segundo (o

más) compuesto(s) tales como un reactivo diagnóstico, sustancia nutritiva, toxina, o agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico contra el cáncer y/o vitamina(s).

5 Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse en forma de unidades pequeñas, tales como cápsulas, sellos, comprimidos o pastillas, en las que cada una contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo en forma de polvo o gránulos; o como una suspensión del compuesto activo en un líquido acuoso o un líquido no acuoso, tal como un jarabe, un elixir, una emulsión de una poción.

10 De acuerdo con lo anterior, en otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de ZAG o un agente movilizador de lípidos, según se define en el presente documento, para la fabricación de un medicamento útil en medicina humana para el tratamiento de síntomas y/o afecciones asociadas con hiperglucemia. Tal medicamento también puede ser útil para estimular el desarrollo muscular y aumentar la masa muscular, disminuyendo los niveles de glucosa en suero, disminuyendo los niveles de triglicéridos en suero, disminuyendo los niveles de insulina en suero, disminuyendo los niveles de ácidos grasos no esterificados, en suero, disminuyendo los niveles de insulina en plasma, y/o aumentando los niveles de insulina del páncreas.

15 La cantidad total de un compuesto o composición que se va a administrar en la práctica de un procedimiento de la divulgación se puede administrar a un sujeto en una dosis única, ya sea como un bolo o por infusión durante un período relativamente corto de tiempo, o se puede administrar utilizando un protocolo de tratamiento fraccionado, en el que se administran dosis múltiples durante un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, etc.). Un experto en la técnica sabría que la cantidad de ZAG o fragmento funcional de la misma para tratar los síntomas asociados con la hiperglucemia en un sujeto depende de muchos factores, incluyendo la edad y el estado de salud general del sujeto así como la vía de administración y el número de tratamientos a administrar. En vista de estos factores, el experto en la técnica ajustará la dosis concreta según sea necesario. En general, la formulación de la composición farmacéutica y las vías y la frecuencia de administración se determinan, en un principio, utilizando ensayos clínicos de fase I y de fase II.

20 De acuerdo con lo anterior, en ciertas opciones, los procedimientos de la divulgación incluyen un régimen de tratamiento espaciado. Se observó que la administración diaria a largo plazo de ZAG en ratones ob/ob tiene como resultado un cese de la pérdida de peso. Como tal en una opción, el tratamiento se administra en días alternos. En otra opción, el tratamiento se administra cada dos días. En otra opción, el tratamiento se administra cada tres días. En otra opción, el tratamiento se administra cada cuatro días.

25 Por lo tanto, la invención demuestra que se produce pérdida de peso adicional y/o mejora de los síntomas asociados con hiperglucemia cuando la administración de ZAG se interrumpe durante aproximadamente 3-4 días, seguido de repetición de la infusión. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, esto puede ser porque se está administrando demasiada cantidad o porque existe desensibilización de los receptores como se ve con TNF. Se realizó un estudio piloto con 2 ratones en cada grupo y se observó una pérdida de peso de 8 – 10 g en un ratón de 90 g en aproximadamente 3 semanas. De por sí, se contempla que se pueden usar dosis más pequeñas de ZAG o un fragmento funcional de la misma para mejorar los síntomas de la hiperglucemia en un sujeto antes de una disminución observable de la obesidad o una reducción de peso.

30 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente las ventajas y características de la presente invención, pero no se desean para limitar el alcance de la invención. Aunque son típicos de los que podrían utilizarse, como alternativa pueden utilizarse otros procedimientos, metodologías, o técnicas conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplo 1

50 La cinc- α_2 -glucoproteína atenúa la hiperglucemia

Para evaluar la capacidad de la cinc- α_2 -glucoproteína (ZAG) para atenuar la obesidad y la hiperglucemia, se administró ZAG a ratones ob/ob lo que indujo una pérdida de peso corporal y un aumento de la temperatura corporal, lo que sugiere un aumento del gasto de energía. La expresión de las proteínas de desacoplamiento 1 y 3 en el tejido adiposo marrón aumentó, mientras que se produjo una disminución de los niveles séricos de glucosa, triglicéridos y ácidos grasos no esterificados, a pesar de un aumento del glicerol, indicativo de aumento de la lipólisis. Se produjo disminución de la insulina en plasma y una mejor respuesta a la glucosa intravenosa junto con un incremento de la captación de glucosa en adipocitos y músculo esquelético. Aumentó la expresión de la lipasa sensible a hormonas en los adipocitos epididimarios. Hubo un incremento de la masa muscular esquelética debido a un aumento de la síntesis de proteínas y a disminución de la degradación proteica. Esto sugiere que ZAG puede ser eficaz en el tratamiento de la hiperglucemia.

55 El medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y el medio Freestyle se adquirieron en Invitrogen (Paisley, Reino Unido), mientras que el suero bovino fetal procedía de Biosera (Sussex, Reino Unido). 2-[1- 14 C] Desoxi-D-glucosa (sp.act.1.85GBq mmol $^{-1}$) y L-[2,6- 3 H] fenilalanina (sp.act.37Bq mmol $^{-1}$) eran de American Radiolabeled Chemicals (Cardiff, Reino Unido). Los anticuerpos policlonales de conejo frente a fosfo (Thr-202) y ERK1 total, p38MAPK total,

fosfo HSL (Ser-552), transportador de glucosa 4 (GLUT4), lipasa adiposa de triglicéridos, la lipasa sensible a hormonas y la fosfo PLA₂ (Ser-505) y frente a ATGL humana se adquirieron de Abcam (Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo monoclonal de ratón frente a la ZAG humana de longitud completa era de Santa Cruz (California, EE.UU.) y el anticuerpo monoclonal de ratón frente a la cadena pesada de miosina de tipo II era de Novacastra (via Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido). Los anticuerpos monoclonales de ratón frente a las subunidades α del proteasoma 20S y p42 eran de Affiniti Research Products (Exeter, Reino Unido). Los anticuerpos monoclonales de ratón frente a fosfo (Thr-180/Tyr-182) p38MAPK y antisueros policlonales de conejo frente a (Thr-451) PKR total y fosfo, eIF2 α fosfo (Ser-162) y frente a eIF2 α total eran de England Biosciences (Herts, Reino Unido). Los anticuerpos policlonales de conejo frente a UCP1, UCP3 y PKR total y el reactivo de extracción PHOSPHOSAFE™ eran de Calbiochem (via Merk Chemicals, Nottingham, Reino Unido). Los anticuerpos anti-conejo de cabra y anti-ratón de conejo conjugados con peroxidasa se adquirieron de Dako (Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo policlonal de conejo frente a la β -actina de ratón y el kit de ensayo de triglicéridos se adquirieron en Sigma Aldrich (Dorset, Reino Unido). Las membranas de nitrocelulosa Hybond A y los kits de desarrollo de quimioluminiscencia potenciados (ECL) eran de Amersham Pharmacia Biotech (Bucks, Reino Unido). Un kit de ensayo colorimétrico WAKO para NEFA se adquirió de Alpha Laboratories (Hampshire, UK) y un kit de ELISA de insulina de ratón se adquirió de DRG (Marburgo, Alemania). Las medidas de los niveles de glucosa se realizaron usando un kit de glucosa en plasma Boots (Nottingham, Reino Unido).

Producción de ZAG recombinante -células HEK293F recombinantes se transfectaron con ADNc de ZAG humana de longitud completa en el vector de expresión pcDNA 3.1 y se mantuvieron en medio FreeStyle en atmósfera de CO₂ al 5 % en el aire a 37 °C. Se secretó ZAG al medio, que se recogió y los niveles máximos de la proteína (16 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) se obtuvieron después de 14 días de cultivo. Para purificar la ZAG, el medio (200 ml) se centrifugó a 700 g durante 15 minutos para eliminar las células y se concentró en un volumen de 1 ml de PBS estéril usando un filtro de centrifuga Amicon Ultra-15 con un valor de corte de 10 kDa. El concentrado (aproximadamente 2 mg de proteína) se añadió a 2 g de celulosa DEAE suspendida en 20 ml de Tris 10 mM, a pH 8,8 y se agitó durante 2 horas a 4 °C. La celulosa DEAE se unió a ZAG y se sedimentó por centrifugación (1.500 g durante 15 minutos) y la ZAG se eluyó mediante agitación con 20 ml de Tris 10 mM, a pH 8 que contenía NaCl 0,3M durante 30 minutos a 4 °C. El eluato se lavó y se concentró en un volumen de 1 ml en PBS estéril usando un filtro de centrifuga Amicon. La ZAG purificada estaba libre de endotoxina, según se determinó con un kit de ensayo único LAL Pyrogen (Lonza, Bucks, Reino Unido).

Cultivo celular y purificación de ZAG. Se prepararon suspensiones de una sola célula de adipocitos blancos a partir de depósitos adiposos triturados mediante incubación a 37 °C durante 2 horas en tampón de bicarbonato de Krebs-Ringer que contenía 1,5 mg/ml^{-1} de colagenasa y seroalbúmina bovina al 4 % en una atmósfera de oxígeno al 95 %: CO₂ al 5 % como se ha descrito anteriormente. Para los estudios de curso en el tiempo los adipocitos se suspendieron en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 % a una concentración de 10⁵ células ml^{-1} y se mantuvieron en atmósfera de CO₂ al 10 % en aire a 37 °C. Las células 293 humanas transfectadas con un plásmido que contiene ZAG humana se sembraron a una concentración de 10⁵ células ml^{-1} en medio FreeStyle y se mantuvieron en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire a 37 °C. Los niveles máximos de la proteína (16 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) se obtuvieron después de 14 días de cultivo. Después el medio (200 ml) se centrifugó a 700 g durante 15 minutos para eliminar las células y se concentró en un volumen de 1ml de PBS estéril usando un filtro de centrifuga Amicon Ultra-15 con un valor de corte de 10 kDa. Después de medir la concentración de la proteína de la muestra (aproximadamente 2 mg) se añadió a 2 g de celulosa DEAE suspendida en 20 ml de Tris 10 mM, a pH 8,8 y se agitó a 4 °C durante 2 horas. La ZAG estando cargada negativamente se une a la celulosa DEAE, que se sedimentó mediante centrifugación (1.500 g durante 15 minutos) y se eluyó mediante agitación con 20 ml de Tris 10 mM, a pH 8,8 que contiene NaCl 0,3M durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se lavó y se concentró hasta un volumen de 1 ml en PBS estéril utilizando el filtro de centrifuga Amicon.

Animales -ratones. En el presente estudio se usaron ratones obesos homocigóticos (ob/ob) de la colonia mantenida en la Universidad de Aston. El origen y las características de los ratones ob/ob de Aston se han descrito anteriormente. Los ratones macho (20-21 semanas de edad, peso 90-100 g) se agruparon en tres por jaula en una habitación con aire acondicionado a 22 \pm 2 °C con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y se les alimentó con una dieta de cría para ratas y ratones (Special Diet Services, Witham, Reino Unido) y con disponibilidad de agua *ad libitum*. Se les administró ZAG (35 μg) en PBS (100 μl) dos veces al día mediante administración i.v. y el peso corporal y la ingesta de alimentos y agua se monitorizaron a diario. Los ratones de control recibieron PBS solo. La temperatura corporal se midió a diario mediante el uso de un termómetro rectal (RS Components, Northants, Reino Unido). Todos los experimentos con animales se realizaron de conformidad con la Ley de 1986 (Procedimientos Científicos con Animales) del Reino Unido. No se observaron efectos adversos después de la administración de ZAG.

Animales -ratas. Ratas Wistar macho maduras (un año de edad de nuestra propia colonia) con un peso de 540 \pm 82,5 g se alojaron individualmente y se trataron i.v. una vez al día, ya sea con ZAG en PBS (100 μl) (50 μg por 100 g de peso corporal) o con PBS (100 μl) como un control. Tanto la ingesta de comida como de agua y el peso corporal se midieron diariamente. Se proporciona a los animales acceso libre al alimento (Special Diet Services, Essex, Reino Unido) y al agua *ad libitum*. El experimento con animales se llevó a cabo conforme a las condiciones de bienestar

impuestas por el Ministerio del Interior británico. Después de 10 días de tratamiento se sacrificó a los animales y se determinó la composición corporal. Los animales se calentaron hasta 80-90 °C durante 7 días hasta que se alcanzó un peso constante. A continuación se determinó el contenido de agua a partir de la diferencia entre el peso húmedo y el peso seco. Se extrajeron los lípidos de la carcasa seca usando una secuencia de cloroformo:metanol (1:1), etanol/acetona (1:1) y éter dietílico (120 ml de cada uno) como describen Lundholm et al (14). Los disolventes se evaporaron y se pesó la grasa. La masa de la carcasa sin grasa se calculó como la diferencia entre el peso inicial de la carcasa y el peso del agua y la grasa.

Ensayo lipolítico. Las muestras a analizar se incubaron con de 10^5 a 2×10^5 adipocitos durante 2 horas en 1 ml de tampón de bicarbonato de Krebs-Ringer, a pH 7,2. La concentración de glicerol liberado se determinó enzimáticamente mediante el procedimiento de Wieland (Wieland, O. Glycerol UV method. en *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer, H.U.) (Academic Press, Londres, Reino Unido, pág. 1404-1409, 1974)). Se analizaron las muestras de control que contienen adipocitos solo para determinar la liberación espontánea de glicerol. La actividad se expresó como μmol de glicerol liberados/ 10^5 de adipocitos/2 horas.

Determinaciones de metabolitos en suero. Los ácidos grasos no esterificados (NEFA) se determinaron utilizando un kit Wako-ASC-ACOD (Wako Química GmbH, Neuss, Alemania). Los triglicéridos se determinaron utilizando un kit de triglicéridos (Sigma Chemical Co., Poole, Reino Unido) y 3-hidroxiobutirato mediante un kit de determinación enzimática cuantitativa (Sigma). La glucosa se midió usando un analizador de glucosa (Beckman, Irvine, Calif.) y el glicerol se determinó enzimáticamente usando el procedimiento de Wieland como se describe en *Methods of Enzymatic Analysis*" (Ed. Bergmeyer, H. U.) vol. 3, páginas 1404-1409, publicado por la Academic Press, Londres (1974).

Aislamiento de membranas plasmáticas de adipocitos de ratón. En un procedimiento típico se aislaron adipocitos blancos de almohadillas de grasa del epidídimo de ratón a las que se ha hecho referencia anteriormente salvo porque las células se lavaron en sacarosa 250 mM, etilenglicol bis (β -aminoetiléter)-N,N,N' (EGTA) 2 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4). Los adipocitos se resuspendieron en 20 ml del tampón anterior y se homogeneizaron mediante la aspiración a través de un filtro de Swinny al menos 10 veces. El homogeneizado celular se centrifugó a continuación a 300 g durante 5 minutos, la torta de grasa se eliminó de la superficie y el sedimento que queda y el infranadante se transfirieron a tubos limpios. Estos se centrifugaron a 30.000 g durante 1 hora a 4 °C y el sedimento de membrana formado se resuspendieron en el tampón de sacarosa (de 200 a 400 μl). Las membranas plasmáticas se separaron de otras membranas de orgánulos en un gradiente de autoformación de partículas de sílice coloidal Percoll™. Los constituyentes fueron sacarosa 250 mM, EGTA 2 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4; Percoll™; y sacarosa 2M, EGTA 8 mM, Tris-HCl 80 mM, pH 7,4, mezclados en una proporción de 32:7:1 junto con la suspensión de membranas (en un volumen total de 8 ml). Esta mezcla se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos a 4 °C. El gradiente se fraccionó en porciones de 0,75 ml y cada porción se analizó para determinar la presencia de succinato deshidrogenasa, NADH-citocromo c reductasa, lactato deshidrogenasa y 5'-nucleotidasa para localizar la fracción de membrana plasmática. Las fracciones de membrana se resuspendieron en NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y se centrifugaron a 10.000 g a 4 °C durante 2 minutos. El proceso se repitió dos veces. Las membranas plasmáticas lavadas se diluyeron después en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, sacarosa 250 mM, EGTA 2 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 4 μM a 1-2 mg/ml, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Actividad lipolítica en adipocitos de rata. Se prepararon adipocitos blancos a partir de tejido adiposo de epidídimo finamente triturado de ratas Wistar macho (400 g) utilizando digestión con colagenasa, tal como se describe (Beck SA, et al. Production of lipolytic and proteolytic factors by a murine tumor-producing cachexia in the host. *Cancer Res* 47:5919-5923, 1987). La actividad lipolítica se determinó incubando 10^5 - 2×10^5 adipocitos durante 2 horas en 1 ml de tampón de bicarbonato de Krebs-Ringer, pH 7,2 y la extensión de la lipólisis se determinó midiendo el glicerol liberado (Wieland O. Glycerol UV method. *Methods of Enzymatic Analysis*, editado por Bergmeyer HU. Academic Press, Londres, pág. 1404-1409, 1974). La liberación espontánea de glicerol se midió incubando los adipocitos solos. La actividad lipolítica se expresó como μmol de glicerol liberados/ 10^5 de adipocitos/2 horas.

Electroforesis en gel. Los geles se prepararon de acuerdo con el procedimiento de Laemmli y generalmente consistían en un gel de apilamiento al 5 % y un gel de resolución SDS-PAGE al 15 % (condiciones de desnaturalización o reducción) o un gel de resolución de SDS-PAGE al 10 % (condiciones no desnaturalizantes o no reductoras). Las muestras se cargaron a 1-5 μg /carril. Las bandas se visualizaron mediante tinción bien con azul brillante de Coomassie R-250 o bien con plata. Las muestras se prepararon para condiciones reductoras mediante calentamiento durante 5 minutos a 100 °C en Tris-HCl 0,0625M, pH 6,8, glicero al 10 %, SDS al 1 %, azul de bromofenol al 0,01 % y 2-mercaptoetanol al 5 %.

Captación de glucosa en adipocitos. Los adipocitos aislados (5×10^4) se lavaron dos veces en el 1 ml de tampón de bicarbonato de Krebs-Ringer, pH 7,2 (KRBS) y se incubaron adicionalmente durante 10 minutos a temperatura ambiente en 0,5 ml de KRBS que contienen 18,5 MBq de 2- [^{14}C] desoxi-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa no radiactiva hasta una concentración final de 0,1 mM. La captación se terminó mediante la adición de 1 ml de KRBS libre de glucosa enfriado en hielo y las células se lavaron tres veces con 1 ml de KRBS, se lisaron mediante la

adición de 0,5 ml de NaOH 1M y se dejaron durante al menos 1 hora a temperatura ambiente antes de determinar la radiactividad mediante recuento de centelleo líquido.

5 Captación de glucosa en el músculo gastrocnemio. Los músculos gastrocnemios se incubaron en tampón de bicarbonato de Krebs-Henseleit durante 45 minutos a 37 °C y después se incubaron durante 10 minutos adicionales en 5 ml de tampón de Krebs-Henseleit que contiene 185 MBq de 2-[1-¹⁴C] desoxi-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa no radiactiva a una concentración final de 0,1 mM. Después se extrajeron los músculos y se lavaron en NaCl al 0,9 % durante 5 minutos, seguido de disolución en 0,5 ml de NaOH 1M y se determinó la radiactividad mediante recuento de centelleo líquido.

10 Captación de glucosa en el músculo sóleo. Los músculos sóleos se incubaron en tampón de bicarbonato de Krebs-Henseleit durante 45 minutos a 37 °C y después se incubaron durante 10 minutos adicionales en 5 ml en tampón de Krebs-Henseleit que contiene 185 MBq de 2-[1-¹⁴C] desoxi -D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa no radiactiva a una concentración final de 0,1 mM. Después se extrajeron los músculos y se lavaron en NaCl al 0,9 % durante 5 minutos, seguido de disolución en 0,5 ml de NaOH 1 mM y se determinó la radiactividad mediante recuento de centelleo líquido.

20 Síntesis y degradación de proteínas en el músculo. El procedimiento para la determinación de la síntesis y degradación de proteínas en el músculo ya se ha descrito anteriormente (Smith, KL y Tisdale, MJ. Increased protein degradation and decreased protein synthesis in skeletal muscle during cancer cachexia. Br. J. Cancer 67, 680-685 (1993)). Los músculos gastrocnemios se escindieron usando ligaduras y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en medio RPMI 1640 medio sin rojo de fenol y se saturaron con O₂:CO₂ (19:1) y después se lavaron con PBS. La síntesis de proteínas se midió mediante la incorporación de L-[2,6-³H]fenilalanina (640 MBq) en material insoluble en ácido utilizando un período de 2 horas en el que los músculos se incubaron a 37 °C en RPMI/640 sin rojo fenol y se saturaron con O₂:CO₂ (19:1). A continuación los músculos se aclararon en un medio no radiactivo, se realizó transferencia y se homogeneizaron en ácido perclórico al 2 %. El índice de síntesis de proteínas se calculó dividiendo la cantidad de radiactividad unida a las proteínas por la cantidad de radiactividad soluble en ácido. La degradación de proteínas se determinó mediante la liberación de tirosina desde el músculo gastrocnemio durante un período de 2 horas en 3 ml de tampón de Krebs-Henseleit oxigenado, pH 7,4, que contiene glucosa 5 mM y cicloheximida 0,5 mM.

35 Medición del proteasoma y actividad de la caspasa. La actividad "de tipo quimotripsina" del proteasoma se determinó fluorométricamente mediante la medición de la liberación de 7-amido-4-metilcumarina (AMC) a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm del sustrato fluorogénico N-succinil Lys Lys Val Tyr.AMC (SEC ID N.º: 2) como se ha descrito previamente para los miotubos (Whitehouse, A.S. & Tisdale, M.J. Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF-κB. Br. J. Cancer 89, 1116-1122 (2003)). El músculo gastrocnemio se homogeneizó en Tris 20 mM, pH 7,5, ATP 2 mM, MgCl₂ 5 mM y TDT 50 mM a 4 °C, se sonicó y se centrifugó a 18.000 g durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar el material insoluble y se utilizó el sobrenadante resultante para medir la actividad de la enzima 'de tipo quimotripsina' en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma lactacistina (10 µM). Solo la actividad suprimible de lactacistina se consideró como verdadera actividad proteasómica. La actividad de la caspasa-3 se determinó mediante la liberación de AMC desde AcAsp.Gly.Val.Asp.AMC (SEC ID N.º: 3) y la actividad de la caspasa-8 se determinó mediante la liberación de 7-amino-4-trifluorometilcumarina (AFC) desde el sustrato específico Z-Ile Glu Phe Thr Asp-AFC (SEC ID N.º: 4), utilizando el sobrenadante de lo anterior (50 µg de proteína) y o bien el sustrato de caspasa-3 u -8 (10 µM) durante 1 hora a 37 °C, en presencia o ausencia de inhibidores de la caspasa-3 (AcAspGluValAsp-CHO) (SEC ID N.º: 5) o de la caspasa-8 (Ile Glu Phe Thr Asp-CHO) (SEC ID N.º: 6) (100 µM). El aumento de la fluorescencia debido a la AFC se determinó como anteriormente, mientras que el aumento de la fluorescencia debido a la AFC se midió con una longitud de onda de excitación de 400 nm y una longitud de onda de emisión de 505 nm. La diferencia en los valores en ausencia y presencia de los inhibidores de caspasa fue una medida de la actividad.

60 Análisis de transferencia de tipo Western. Los músculos gastrocnemios recién extirpados se lavaron en PBS y se lisaron en reactivo de extracción PHOSPHOSAFE™ durante 5 minutos a temperatura ambiente seguido de ultrasonidos a 4 °C. El lisado se aclaró mediante centrifugación a 18,000 g durante 5 minutos a 4 °C y las muestras de proteína citosólica (5 µg) se resolvieron en electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida al 12 % a 180 V durante aproximadamente 1 hora. A esto le siguió la transferencia a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm, que después se bloquearon con Marvel al 5 % en solución salina tamponada con Tris, pH 7,5, a 4 °C durante la noche. Los anticuerpos tanto primarios como secundarios se usaron a una dilución de 1:1000 salvo la anti-miosina (1:250). La incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente y el desarrollo se efectuó mediante ECL. Las transferencias se escanearon con un densitómetro para cuantificar las diferencias.

65 Las muestras de TAB, TAM y músculo gastrocnemio extirpadas de ratas tratadas con ZAG o PBS durante 5 días se homogeneizaron en sacarosa 0,25 M, HEPES 1 mM, pH 7,0 y EDTA 0,2M y después se centrifugaron durante 10 minutos a 4.500 rpm. Las muestras de proteína citosólica (10 µg) se resolvieron en electroforesis en gel de poliácridamida-dodecilsulfato de sodio al 12 % y las proteínas se transfirieron luego a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm, que habían sido bloqueadas con Marvel al 5 % en solución salina tamponada con Tris, pH 7,5, a 4 °C

durante la noche y después de cuatro lavados de 15 minutos con Tween al 0,1 % en PBS se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. El desarrollo se realizó mediante ECL.

5 Análisis estadístico. Los resultados se muestran como medias \pm SEM de al menos tres experimentos replicados. Diferencia en las medias entre los grupos se determinó mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Los valores p inferiores a 0,05 se consideraron significativos.

10 Resultados -ratones. La purificación de ZAG dio lugar a un producto que tenía una pureza superior al 95 % (Figura 1A), confirmado como ZAG mediante inmunotransferencia (Figura 1B). La ZAG estimuló la lipólisis en los adipocitos del epidídimo (Figura 1D) pero el efecto lipolítico se redujo considerablemente en los adipocitos de los depósitos subcutáneos y viscerales, aunque estaba significativamente elevado sobre los niveles basales (Figura 1E). No se observaron diferencias significativas en la extensión de la estimulación de la lipólisis entre la isoprenalina y ZAG en cualquiera de los grupos de adipocitos, aunque ZAG fue más potente en la inducción de la lipólisis que la isoprenalina sobre una base molar. El efecto de ZAG sobre el peso corporal de los ratones ob/ob en un período de 5 días se muestra en la Figura 1F. Mientras que en los animales control el peso se mantuvo estable, los animales tratados con ZAG mostraron una pérdida de peso progresiva, de tal manera que después de 5 días se produjo una diferencia de peso de 3,5 g entre los grupos, a pesar de que la ingesta de alimentos (PBS $32 \pm 3,1$ g; ZAG $30 \pm 2,5$ g) y agua ($140 \pm 8,2$ ml PBS; ZAG $135 \pm 3,2$ ml) fue la misma durante el transcurso del experimento. Se produjo un aumento significativo de la temperatura corporal de $0,4$ °C después de 4 días de administración de ZAG (Figura 1G), indicativo de un aumento en la tasa metabólica basal. La medición de los niveles de metabolitos en plasma sugiere un aumento en la utilización del sustrato metabólico en los animales tratados con ZAG (Tabla 1). Por tanto hubo una disminución significativa en glucosa, triglicéridos (TG) y ácidos grasos no esterificados (NEFA) en plasma en los animales tratados con ZAG, a pesar de un aumento de la concentración de glicerol indicativo de una lipólisis aumentada. Se produjo una disminución del 36 % en los niveles de insulina en plasma que sugieren que ZAG es eficaz en la reducción del estado diabético. Los niveles del ARNm de ZAG en diversos tejidos se muestran en la Figura 1C.

Tabla 1. Niveles plasmáticos de metabolitos e insulina en ratones ob/ob tratados con ZAG durante 120 horas

	PBS	ZAG
Glucosa (mmol/l)	24,5 + 0,4	20,3 + 0,8 p<0,01
TG (mmol/l)	1,2 + 0,3	0,9 + 0,1 p<0,05
Glicerol (μ mol/l)	359 + 23	429 + 36 p<0,001
Insulina (ng/ml)	41,2 + 0,6	26,3 + 0,52 p<0,001
TAM (g)	0,35 \pm 0,09	0,73 \pm 0,12 p<0,01
NEFA (mEq/l)	0,6 + 0,12	0,23 + 0,05 p<0,001
Sóleo (g)	0,52 \pm 0,13	0,80 \pm 0,09 p<0,01
Gastrocnemio (g)	0,85 \pm 0,12	1,12 \pm 0,14 p<0,01
Insulina en páncreas (pg/g pancreasa)	4,52 \pm 2,91	16,3 \pm 3,1 p=0,0042

30 Para investigar esto, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa, en los animales alimentados después de 3 días de la administración de ZAG (Figura 2A). Mientras que los niveles de glucosa en sangre se elevaron significativamente en los controles de PBS, solo se produjo un pequeño incremento en los animales tratados con ZAG, que permanecieron significativamente por debajo del grupo de control a lo largo del curso del estudio. Además, los niveles de insulina en plasma fueron significativamente menores en los animales tratados con ZAG al inicio del estudio y se mantuvieron así durante los 60 minutos de la observación (Figura 2B). La administración de ZAG aumentó la captación de glucosa en los adipocitos del epidídimo, viscerales y subcutáneos en ausencia de insulina y también aumentó la captación de glucosa en los adipocitos del epidídimo y viscerales en presencia de niveles bajos (1 nM) de insulina (Figura 2C). La captación de glucosa en el músculo gastrocnemio también fue significativamente mayor en los animales tratados con ZAG tanto en ausencia como en presencia de insulina (100 nM) (Figura 2D). La captación de glucosa en el músculo gastrocnemio de ratones tratados con ZAG fue mayor que la respuesta a la insulina en los animales no tratados.

45 La administración de ZAG también atenuó el efecto de la hiperglucemia sobre la atrofia del músculo esquelético. Por tanto los ratones ob/ob tratados con ZAG mostraron un aumento significativo en el peso húmedo de los músculos gastrocnemio y sóleo (Tabla 1). Esto se asoció con un aumento de más del doble de la síntesis de proteínas en el músculo sóleo (Figura 3A) y con una disminución del 60 % en la degradación de proteínas (Figura 3B). Los músculos gastrocnemio de los ratones tratados con ZAG mostraron una disminución de la actividad de la enzima 'de tipo quimotripsina' del proteasoma (Figura 3C), que no fue significativamente diferente de la encontrada en los

ratones no obesos y una disminución de la expresión de las subunidades α del proteasoma 20S (Figura 3D) y de p42, una subunidad de la ATPasa del regulador 19S (Figura 3E), lo que sugiere una reducción de la actividad de la ruta de la ubiquitina-proteasoma. Los niveles de miosina aumentaron en los ratones tratados con ZAG (Figura 3F), mientras que los niveles de actina no cambiaron (Figura 3G). Además, se produjo una reducción del nivel de las formas fosforiladas de la proteína cinasa dependiente de ARNs (PKR) (Figura 4A) y del factor de iniciación eucariótico 2 α (eIF2 α) (Figura 4B), que se ha demostrado que son los responsables de la atrofia muscular inducida por factores catabólicos tumorales y altos niveles de glucosa extracelular. Otras enzimas en esta ruta, incluyendo la fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Figura 4C), proteína cinasa activada por mitógeno p38 (Figura 4D) y las caspasas-3 y -8 (Figura 4E) también estaban atenuadas en los músculos gastrocnemio de ratones ob/ob tratados con ZAG. Estos cambios eran proporcionales a una disminución en la señalización catabólica en el músculo en respuesta a ZAG.

La ZAG, pero no la isoprenalina, aumentó la expresión de fosfo HSL en adipocitos, que estaba completamente atenuada por el inhibidor PD98059¹⁴ de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK). Aunque la ZAG aumentó la expresión de HSL en adipocitos epididimarios no se produjo incremento alguno ni en los adipocitos subcutáneos ni en los viscerales (Figuras 5B-5D). Se observó una situación similar con la expresión de la lipasa adiposa de triglicéridos (ATGL) (Figuras 5E-5G). La expresión de HSL y ATGL correlacionaba con la expresión de la forma activa (fosfo) de ERK (Figuras 5H-5J). La expresión de HSL y ATGL en adipocitos epididimarios correlacionaba con un incremento de la respuesta lipolítica al agonista de β 3, BRL37344 (Figura 5K). Este resultado sugiere que ZAG puede actuar sinérgicamente con agonistas de β 3.

Como se notificado anteriormente, la administración ZAG aumentó su expresión en el tejido adiposo (Figura 6A). La expresión ZAG se mantuvo elevada durante otros 3 días en cultivo tisular en ausencia de ZAG (Figura 6B). La expresión de HSL también estaba elevada en los adipocitos durante 3 días en cultivo de tejidos en ausencia de ZAG (Figura 6C). La administración de ZAG incrementó la expresión de UCP1 (Figura 6D) y UCP3 (Figura 6E) en TAM (Figura 6D) y UCP3 en el músculo esquelético (Figura 6F). Se podría esperar un aumento de la expresión de las proteínas de desacoplamiento para canalizar los sustratos metabólicos en calor tal como se ha observado (Figura 1 G).

Después de 21 días, se observaron los niveles de metabolitos en plasma en los ratones ob/ob (Tabla 2), con los parámetros monitorizados mostrados en la Tabla 3. Se observaron un nuevo descenso de la glucosa en sangre (de 2,03 a 15,2 mm) y un aumento de glicerol, lo que parece mayor ya que el control es menor que antes. No se observaron cambios en los niveles de NEFA, TG o insulina el Día 21, en comparación con el Día 5 (Tabla 1). Se observó que había mucha más insulina en el páncreas en animales tratados con ZAG que mostraban la disminución de insulina en plasma, que no se debe a una menor producción de insulina (por ejemplo, como sucedería con una toxina contra las células beta del páncreas), sino más bien al hecho de que se necesita menos insulina para controlar la glucosa en sangre en los animales tratados con ZAG.

Tabla 2. Niveles plasmáticos de metabolitos e insulina en ratones ob/ob tratados con ZAG el día 21.

	PBS	ZAG	
Glucosa (mmol/l)	24,1 ± 2,3	15,2 ± 2,1	p=0,0085
NEFA (mEq/l)	0,62 ± 0,008	0,22 ± 0,06	p=0,0025
Glicerol	290 ± 25,2	450 ± 36,2	p=0,0058
Triglicéridos (mmol/l)	1,72 ± 0,05	0,89 ± 0,08	p=0,0072
Insulina (ng/ml)	39,5 ± 0,96	28,5 ± 0,34	p=0,0056
Insulina en páncreas (pg/g pancreasa)	6,2 ± 3,2	14,5 ± 2,5	p=0,0035

Tabla 3. Parámetros controlados en los ratones ob/ob tratados con ZAG el día 21.

Parámetro	PBS	ZAG	p
Peso inicial	92,5 ± 3,1	93,1 ± 1,9	
Peso final	89,9 ± 1,3	83,95 ± 2,2	
Alimento (g)	135 ± 6	145 ± 4	
Agua (ml)	268 ± 15	259 ± 20	
TAM (g)	0,36 ± 0,21	0,4 ± 0,35	
Gastrocnemio (g)	0,26 ± 0,15	0,39 ± 0,12	0,01
Sóleo (g)	0,15 ± 0,06	0,18 ± 0,07	

Además, la temperatura corporal de los ratones ob/ob aumentó de 0,5 ° a 1 °C (Figura 1G) en un plazo de cuatro días y alcanzó el máximo a 38,1 °C (Figura 7) justo antes de que perdieran la cantidad máxima de peso. Esto se correlacionaría con el peso del tejido adiposo marrón que aumenta desde 0,33 ± 0,12 g en los controles a 0,52 ± 0,08 g en los animales tratados con ZAG (Figura 7). El peso de los músculos gastrocnemio también se incrementó de 0,2 ± 0,05 g a 0,7 ± 0,1 g, mientras que hubo una disminución progresiva en la excreción de glucosa urinaria (Figuras 8A y 8B).

Resultados -ratas. El efecto lipolítico de la ZAG humana hacia los adipocitos de epidídimo de rata en comparación con la isoprenalina se muestra en la Figura 11. A concentraciones entre 233 y 700 nM de ZAG se produjo un aumento relacionado con la dosis en liberación de glicerol, que se atenuó con los anticuerpos monoclonales anti-ZAG, que muestran la especificidad de la acción. El alcance de la lipólisis en adipocitos de rata fue similar al indicado previamente para ratones. Como en el ratón, el efecto lipolítico de ZAG se vio completamente atenuado por el antagonista del receptor adrenérgico β3 (β3-AR) SR59230A, lo que sugiere que la acción de ZAG estaba mediada por el β3-AR. Estos resultados sugieren que ZAG puede ser eficaz en la inducción de la pérdida de grasa en ratas.

El efecto de inyección i.v, diaria única de ZAG (50 µg/100 g de peso corporal) sobre el peso corporal de las ratas Wistar macho maduras (540 ± 83 g) se muestra en la Figura 12A. En comparación con las ratas control a las que se ha administrado el mismo volumen de disolvente (PBS), las ratas a las que se administró ZAG mostraron una disminución progresiva del peso corporal, de tal manera que después de 10 días, mientras que las ratas tratadas con PBS mostraron un aumento de 13 g en el peso corporal, los animales tratados con ZAG mostraron una disminución de 5 g en el peso corporal (Tabla 4). No hubo diferencia en la ingesta de alimentos (ZAG: 102 ± 32g; PBS: 98 ± 25 g) o de agua (ZAG: 135 ± 35 ml; PBS: 125 ± 25 ml) entre los dos grupos durante el curso del estudio, pero los animales tratados con ZAG mostraron una elevación consistente de 0,4 °C de la temperatura corporal, que fue significativa dentro de las 24 horas posteriores a la primera administración de ZAG (Figura 12B), lo que indica un gasto energético elevado. El análisis de la composición corporal (Tabla 4) mostró que la pérdida de peso corporal inducida por ZAG se debió a una pérdida de grasa de la carcasa, que se compensó parcialmente con un aumento significativo de la masa corporal magra. Se produjo un incremento del 50 % en la concentración de glicerol en plasma en las ratas tratadas con ZAG (Tabla 5), indicativo de un aumento de la lipólisis, pero una disminución del 55 % en los niveles plasmáticos de ácidos grasos no esterificados (NEFA), lo que sugiere un aumento de la utilización. Los niveles plasmáticos de glucosa y triglicéridos también se redujeron en un 36-37 % (Tabla 5), lo que también sugiere un aumento de la utilización. Se produjo un aumento significativo en la captación de 2-desoxiglucosa en adipocitos de epidídimo de las ratas tratadas con ZAG durante 10 días, que se aumentó en presencia de insulina (Figura 12C). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la captación de glucosa en los adipocitos de los animales tratados con ZAG o con PBS en presencia de insulina (Figura 12C). Hubo un aumento pequeño, no significativo en la captación de glucosa en el músculo gastrocnemio y el TAM de las ratas tratadas con ZAG en comparación con los controles de PBS, pero un aumento significativo en la captación en presencia de insulina (Figura 12D). Estos resultados sugieren que la disminución de la glucosa en sangre se debe a una mayor utilización por el TAM, el TAB y el músculo esquelético y esto se ve avalado por un aumento de la expresión del transportador de glucosa 4 (GLUT4) en los tres tejidos (Figura 13).

Tabla 4. Composición corporal de las ratas macho tras el tratamiento con PBS o ZAG.

Tratamiento	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Cambios en el peso (g)	Agua		Grasas		No grasas	
				(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)
PBS	510 ± 30	523 ± 2	+13 ± 3	326 ± 32	62 ± 2	105 ± 14	20 ± 3	90 ± 6	17 ± 3
ZAG	530 ± 45	525 ± 1	-5 ± 1	331 ± 5	63 ± 3	92 ± 5 ^b	18 ± 1	96 ± 2 ^a	18 ± 2

Diferencias con respecto a los animales tratados con PBS se muestran como a p<0,05 o b, p<0,01

Tabla 5 – Niveles plasmáticos de metabolitos y de insulina en las ratas tratadas con PBS o ZAG durante 10 días

Metabolito	PBS	ZAG
Glucosa (mmol/l)	25,5 ± 2,3	16,2 ± 2,1 ^c
Triglicéridos (mmol/l)	1,75 ± 0,01	1,1 ± 0,09 ^a
Glicerol (umol/l)	300 ± 52	450 ± 51 ^c
NEFA (mEq/l)	0,58 ± 0,008	0,26 ± 0,06 ^b

Diferencias con respecto a los animales tratados con PBS se muestran como p<0,05; b, p<0,01 o c, p<0,001

La administración de ZAG aumentó la expresión de las proteínas de desacoplamiento (UCP)-1 y -3 tanto en TAM como TAB casi al doble (Figuras 13A y 13B), lo que contribuiría a un aumento de la utilización de sustratos. En ratas tratadas con ZAG también se produjo un aumento de la expresión de las enzimas lipolíticas lipasa adiposa de triglicéridos (ATGL) y lipasa sensible a hormonas (HSL) en el tejido adiposo de epidídimo (Figura 15), de nuevo con

un aumento de dos veces. La ATGL es principalmente responsable de la hidrólisis del primer enlace éster en una molécula de triacilglicerol que forma diacilglicerol, mientras que su conversión en monoacilglicerol se lleva a cabo por HSL. La expresión de ZAG también se incrementó significativamente en el músculo esquelético, (Figura 16A), el TAB (Figura 16B) y el TAM (Figura 16C) de ratas tratadas con ZAG durante 10 días, lo que muestra que de ZAG exógena refuerza su propia producción en los tejidos periféricos.

Se produjo una reducción significativa en la expresión de las formas fosforiladas tanto de la proteína cinasa dependiente de ARNs (PKR) como del factor de iniciación eucariótico 2 (eIF2) en la α -subunidad en el músculo gastrocnemio de ratas tratadas con ZAG, mientras que la cantidad total no cambió (Figuras 17A y 17B). Se han observado cambios similares en ratones ob/ob tratados con ZAG (resultados no publicados) y fueron consistentes con una depresión de la degradación de proteínas y un aumento de la síntesis de proteínas en el músculo esquelético.

Ejemplo 2

Intervalo de administración de cinc- α_2 -glucoproteína

Se observó que la administración diaria a largo plazo de ZAG en ratones ob/ob tiene como resultado un cese de la pérdida de peso. Como tal, se determinó que un descanso de 3-4 días, seguido de la reinfusión de ZAG tuvo como resultado pérdida de peso continuo y mejora de los síntomas asociados con la hiperglucemia.

Sin desear quedar limitados por la teoría, puede ser que los sujetos estén recibiendo demasiada ZAG o que haya desensibilización de los receptores como se ve con TNF. Se realizó un estudio piloto con 2 ratones en cada grupo para determinar la planificación óptima de administración de ZAG. Se observó una pérdida de peso de 8-10 g en un ratón de 90 g en aproximadamente 3 semanas.

Los adipocitos se extrajeron de ratones después de 5 días de ZAG y su capacidad de respuesta a la isoprenalina (iso) se midió después del cultivo en ausencia de ZAG (Figura 9). La capacidad de respuesta a la iso es mayor en los ratones tratados con ZAG y esto continúa durante otros 4 días (que fue cuando se aumentó la expresión de ZAG y HSL) y después disminuye el día 5 (cuando no se aumentó la expresión) hasta valores del control PBS.

Ejemplo 3

La cinc- α_2 -glucoproteína atenúa la atrofia muscular en ratones ob/ob

Este ejemplo demuestra el mecanismo por el que la ZAG atenúa la atrofia muscular en ratones ob/ob usando un modelo in vitro recién desarrollado (Russell et al, Exp. Cell Res. 315, 16-25, 2009). Este utiliza miotubos murinos sometidos a altas concentraciones de glucosa (10 o 25 mM). Como se muestra en la Figura 18 los niveles elevados de glucosa estimulan un aumento de la degradación de proteínas (Figura 18A) y deprimen la síntesis de proteínas (Figura 18B) y estos dos efectos se atenuaron completamente por la ZAG (25 μ g/ml). Por lo tanto se determinó si el efecto de ZAG estaba mediado por un β_3 -AR usando el antagonista SR59230A. Sin embargo, el compuesto SR (es decir, SR59230A) también puede actuar como un agonista β , lo que parecía hacer en estos experimentos. Por lo tanto la degradación de proteínas inducida tanto por glucosa 10 como por glucosa 25 mM se atenuó tanto por ZAG como por el compuesto SR y la combinación fue aditiva en lugar de antagónica (Figura 19). Para la síntesis de proteínas (Figura 20) el compuesto SR parece ser similar a ZAG sin evidencias de inversión, mientras que con glucosa 10 mM, el compuesto SR provoca un aumento de la depresión de la síntesis de proteínas.

Ejemplo 4

La cinc- α_2 -glucoproteína atenúa la formación de ROS

Se ha demostrado que la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es importante en la degradación de proteínas inducida por la alta carga de glucosa. Los datos de la Figura 21 muestran que la ZAG atenúa por completo el aumento de ROS producido por la glucosa, lo que se corresponde con la disminución de la degradación de proteínas (Figura 18A). Los niveles altos de glucosa también inducen la activación (fosforilación) de la PKR (Figura 22A) y la posterior fosforilación de eIF2 α (Figura 22B) como se ve en el músculo esquelético de ratones ob/ob, lo que también se atenuó por ZAG. Estos resultados sugieren que este modelo in vitro será útil para estudiar cómo afecta la ZAG a la masa muscular al nivel molecular.

Ejemplo 5

La cinc- α_2 -glucoproteína aumenta la tolerancia a la insulina

También se realizó una prueba de tolerancia a la insulina en ratones ob/ob a los que se administró ZAG durante 3 días (Figura 23). A los animales se les administraron dos dosis de insulina (10 y 20 U/kg) mediante inyección i.p. y la

glucosa en sangre se midió durante los siguientes 60 minutos. Como se puede ver (Figura 23A) los animales tratados con ZAG mostraron un aumento de la sensibilidad a la insulina (10 U/kg) respecto a los que recibieron PBS. A la concentración de insulina más alta (20 U/kg) esta diferencia desapareció (Figura 23B). La curva de desaparición de la glucosa para 20 U/kg + PBS fue casi idéntica a 10 U/kg + ZAG, lo que a este nivel de dosis de ZAG es reducir la necesidad de insulina en un 50 %, pero esto puede superarse administrando más insulina.

Ejemplo 6

Administración durante 5 días de cinc- α -2-glucoproteína

Los datos que se muestran en el Anexo 1 proceden de un estudio de 5 días en el que se administró ZAG a 35 μ g al día i.v. diariamente durante 5 días. Al final del experimento se extrajeron los tejidos y se transfirieron, o se llevaron a cabo ensayos funcionales con los adipocitos aislados. Como puede verse en la Figura 6A, la administración ZAG multiplicó aproximadamente por dos su expresión en la grasa del epidídimo (ep), subcutánea (sc) y visceral (vis). Cuando se prepararon tejidos adipocitos ep y se mantuvieron en cultivo tisular (RPMI 1640 + FCS al 10 %), la expresión de ZAG expresión se mantuvo durante otros 3 días, a pesar de que no se añadió ZAG al medio de cultivo (Figura 6B). Además, los adipocitos de ratones tratados con ZAG mostraron una mayor respuesta a la isoprenalina (10 μ M) y esto también se mantuvo durante 4 días en cultivo de tejidos en ausencia de ZAG (Figura 9). El aumento de la respuesta a la isoprenalina se debe a un aumento de la expresión de la HSL por ZAG y esto también se mantuvo en cultivo de tejidos durante 4 días en ausencia de ZAG (Figura 6C). Estos resultados muestran que los efectos de ZAG se mantienen durante 3 días cuando se retira la ZAG y por lo tanto no se tiene que administrar todos los días. De hecho, como se trató anteriormente, es más probable que el exceso de ZAG conduzca a la resistencia en lugar de a un aumento de la respuesta.

Un aumento de la expresión de HSL solo se observó en los adipocitos ep después de 5 días de ZAG (Figuras 5B-5D), como en ATGL (Figuras 5E-5G). Hubo un aumento en la expresión de pERK únicamente en el tejido adiposo ep (Figuras 5H-5J) y un inhibidor de pERK (PD98059 10 μ M) atenuó el aumento en la expresión de HSL en los adipocitos ep incubados con ZAG durante 3 horas (Figura 5A). ZAG aumentó la expresión de UCP1 y UCP3 en TAM (Figuras 6D y 6E) y músculo (Figura 6F) lo que explicaría el aumento de la temperatura corporal y el descenso de TG y NEFA en suero a pesar del aumento de la lipólisis.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a los ejemplos anteriores, se entenderá que se incluyen modificaciones y variaciones dentro del espíritu y alcance de la invención. De acuerdo con lo anterior, la invención está limitada solamente por las reivindicaciones siguientes.

Listado de secuencias

<110> ASTON UNIVERSITY TISDALE, Michael j. RUSSELL, Steve
 <120> GLUCOPROTEÍNAS QUE TIENEN PROPIEDADES MOVILIZADORAS DE LÍPIDOS Y USOS
 TERAPÉUTICOS DE LAS MISMAS
 <130> Documento HALSA1120-2WO
 <150> Documento US 61/253.023
 <151> 19-10-2009
 <150> Documento US 61/112.623
 <151> 7-11-2008
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400>

Gln Glu Asn Gln Asp Gly Arg Tyr Ser Leu Thr Tyr Ile Tyr Thr Gly
 1 5 10 15
 <20>
 Leu Ser Lys His Val Glu Asp Val Pro Ala Phe Gln Ala Leu Gly Ser
 20 25 30
 <20>
 Leu Asn Asp Leu Gln Phe Phe Arg Tyr Asn Ser Lys Asp Arg Lys Ser
 35 40 45
 <20>
 Gln Pro Met Gly Leu Trp Arg Gln Val Glu Gly Met Glu Asp Trp Lys
 50 55 60
 <20>
 Glu Asp Ser Gln Leu Gln Lys Ala Arg Glu Asp Met Glu Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 <20>
 Asp Ile Val Glu Tyr Tyr Asn Asp Ser Asn Gly Ser His Val Leu Gln
 85 90 95
 <20>
 Gly Arg Phe Gly Cys Glu Ile Glu Asn Asn Arg Ser Ser Gly Ala Phe
 100 105 110
 <20>
 Trp Lys Tyr Tyr Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Glu Phe Asn Lys Glu
 115 120 125
 <20>
 Ile Pro Ala Trp Val Pro Phe Asp Pro Ala Ala Gln Ile Thr Lys Gln
 130 135 140
 <20>
 Lys Trp Glu Ala Glu Pro Val Tyr Val Gln Arg Ala Lys Ala Tyr Leu
 145 150 155 160
 <20>
 Glu Glu Glu Cys Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Leu Lys Tyr Ser Lys
 165 170 175
 <20>
 Asn Ile Leu Asp Arg Gln Asp Pro Pro Ser Val Val Val Thr Ser His
 180 185 190
 <20>
 Gln Ala Pro Gly Glu Lys Lys Lys Leu Lys Cys Leu Ala Tyr Asp Phe
 195 200 205
 <20>
 Tyr Pro Gly Lys Ile Asp Val His Trp Thr Arg Ala Gly Gln Val Gln
 210 215 220
 <20>
 Glu Pro Glu Leu Arg Gly Asp Val Leu His Asn Gly Asn Gly Thr Tyr
 225 230 235 240
 <20>
 Gln Ser Trp Val Val Val Ala Val Pro Pro Gln Asp Thr Ala Pro Tyr
 245 250 255
 <20>
 Ser Cys His Val Gln His Ser Ser Leu Ala Gln Pro Leu Val Val Pro
 260 265 270
 <20>
 Trp Glu Ala Ser
 275

- <210> 2
- <211> 4
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Construcción sintética
- <400> 2
- Lys Lys Val Tyr
- 10 I
- <210> 3
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética
<400> 3
Asp Gly Val Asp
1
5 <210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
10 <223> Construcción sintética
<400> 4
Ile Glu Phe Thr Asp
1 5
<210> 5
<211> 4
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Construcción sintética
<400> 5
Asp Glu Val Asp
1
20 <210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> Construcción sintética
<400> 6
Ile Glu Phe Thr Asp
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID N.º: 1 para uso en la mejora de los síntomas de hiperglucemia administrando al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz durante un periodo de 21 días o mayor, en el que existe una mejora continua de los síntomas de hiperglucemia durante el curso del tratamiento.
- 10 2. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la dosis es diaria durante 21 días, o en días alternos, cada 2 días, o cada 3 días durante 21 días.
- 15 3. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mejora de los síntomas comprende uno o más de los síntomas seleccionados entre el grupo que consiste en una disminución de los niveles séricos de glucosa, una disminución de los niveles séricos de triglicéridos, una disminución de los niveles séricos de insulina y una disminución de los niveles séricos de ácidos grasos no esterificados, en comparación con los niveles séricos antes del tratamiento.
- 20 4. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mejora de los síntomas incluye un incremento de la temperatura corporal de aproximadamente 0,4 a 1 °C en un plazo de 4 días desde el inicio del tratamiento, en comparación con la temperatura corporal antes del tratamiento.
- 25 5. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mejora de los síntomas incluye una disminución de los niveles de insulina en plasma en un plazo de 3 días desde el inicio del tratamiento, en comparación con los niveles de insulina en plasma antes del tratamiento.
- 30 6. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que se produce una disminución del 36 % en los niveles de insulina en plasma en comparación con los niveles de insulina en plasma antes del tratamiento.
- 35 7. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que se produce una disminución del 36 % en los niveles de glucosa en plasma y en los niveles de triglicéridos en plasma en comparación con los niveles de glucosa en plasma y con los niveles de triglicéridos en plasma antes del tratamiento.
- 40 8. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mejora de los síntomas comprende la normalización de los niveles de glucosa en sangre y la secreción de insulina en respuesta a glucosa intravenosa en un plazo de 3 días desde el inicio del tratamiento.
- 45 9. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mejora de los síntomas comprende un incremento de los niveles de insulina en páncreas, en comparación con los niveles de insulina en páncreas antes del tratamiento.
- 50 10. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mejora de los síntomas comprende un incremento de la expresión de la proteína 1 de desacoplamiento (UCP-1) y la proteína 3 de desacoplamiento (UCP3) en el tejido adiposo marrón, en comparación con la expresión de UCP1 y UCP3 antes del tratamiento.
- 55 11. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mejora de los síntomas comprende un incremento de la expresión de UCP3 en músculo esquelético, en comparación con la expresión de UCP3 antes del tratamiento.
12. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido se administra dos veces al día.
13. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido se administra por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal u oral.
14. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido se administra una vez cada tres días.
15. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido está glucosilado.

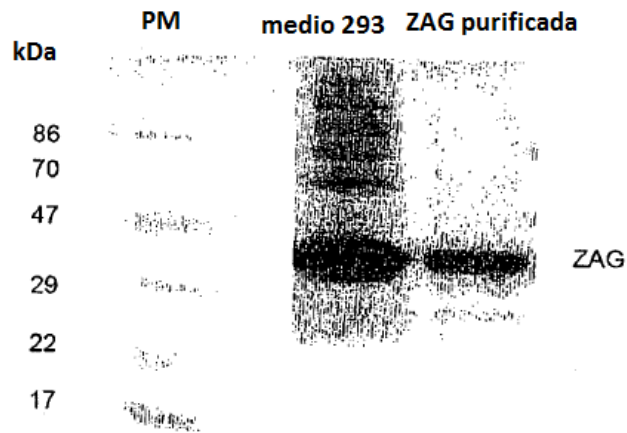


FIG. 1A

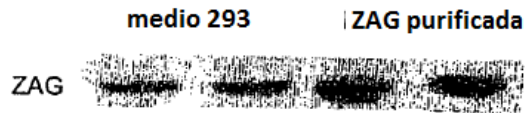


FIG. 1B

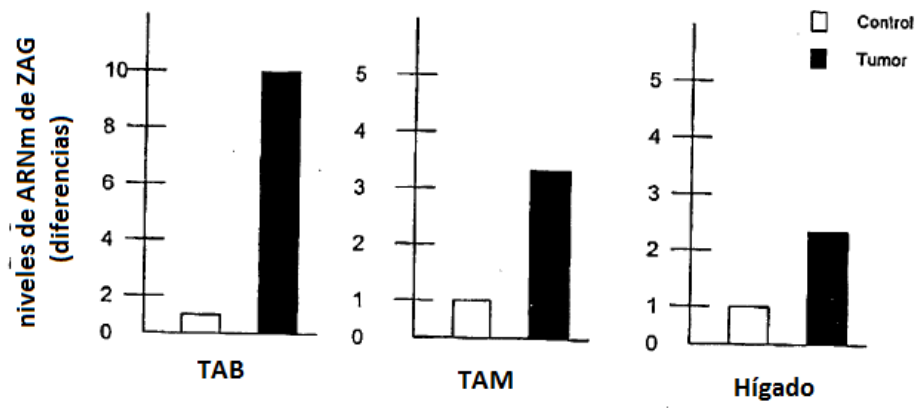


FIG. 1C

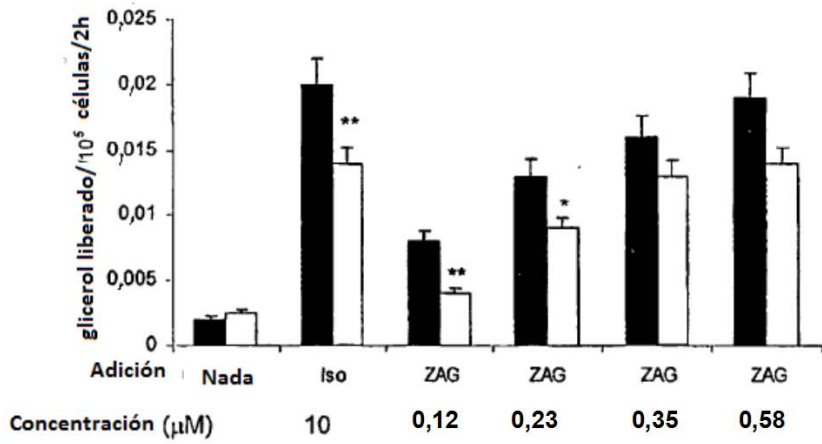


FIG. 1D

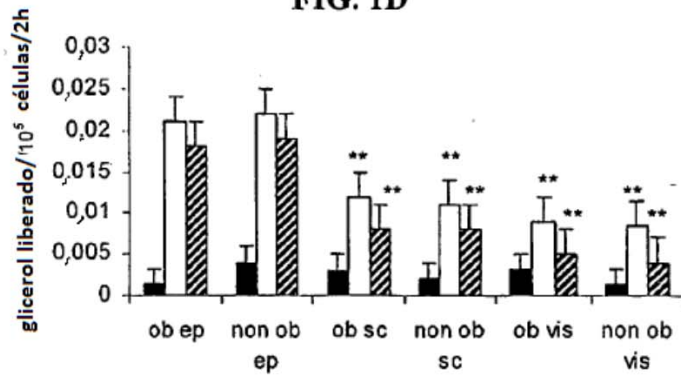


FIG. 1E

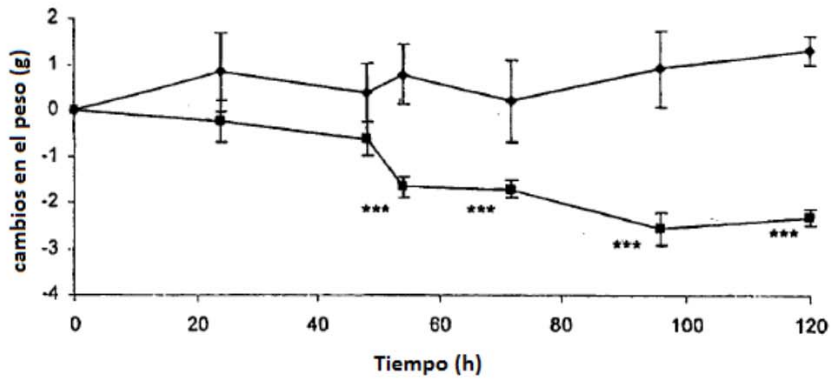


FIG. 1F

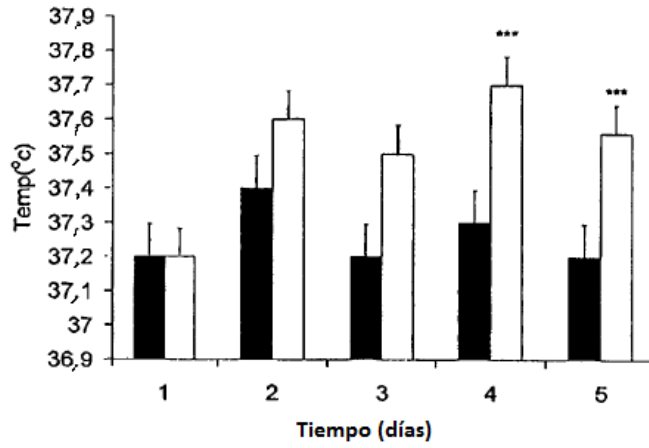


FIG. 1G

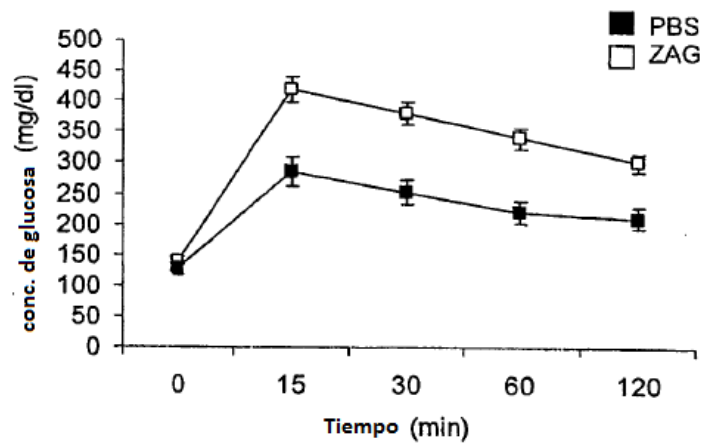


FIG. 2A

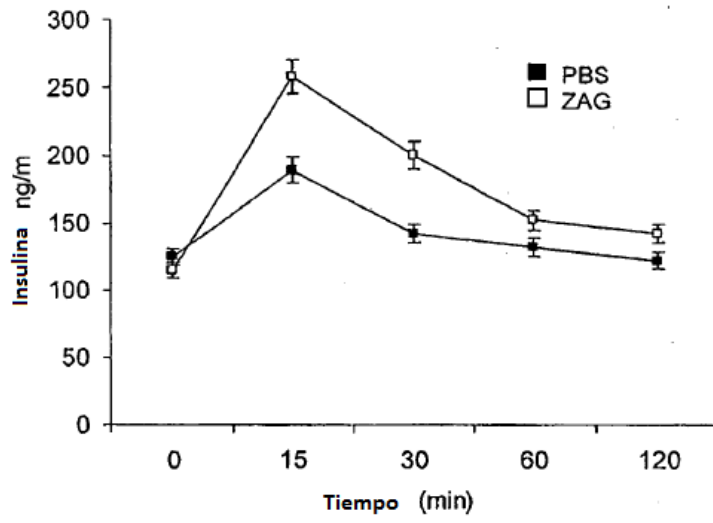


FIG. 2B

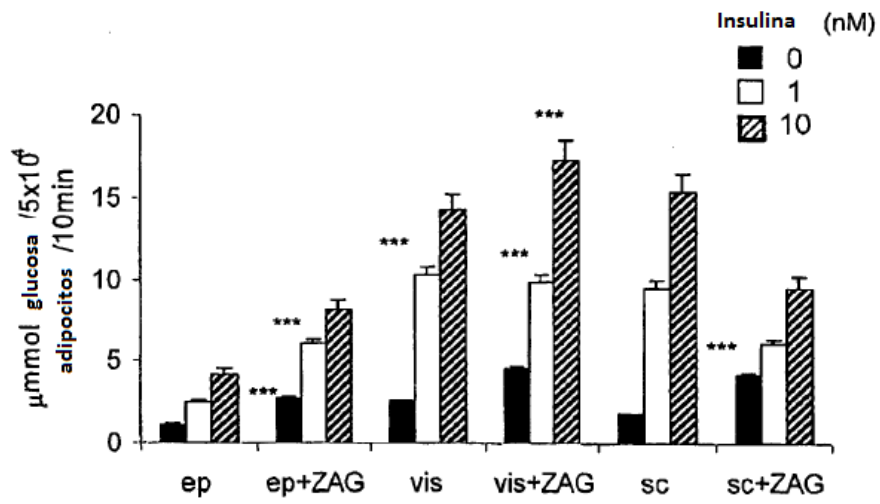


FIG. 2C

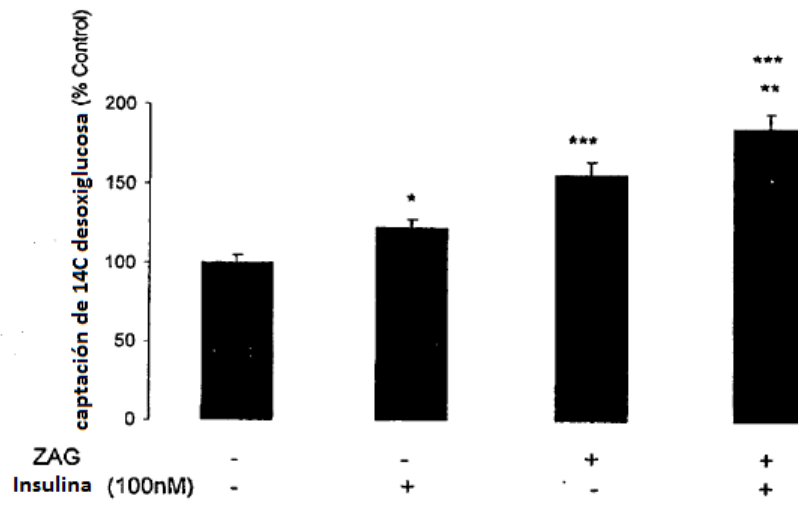


FIG. 2D

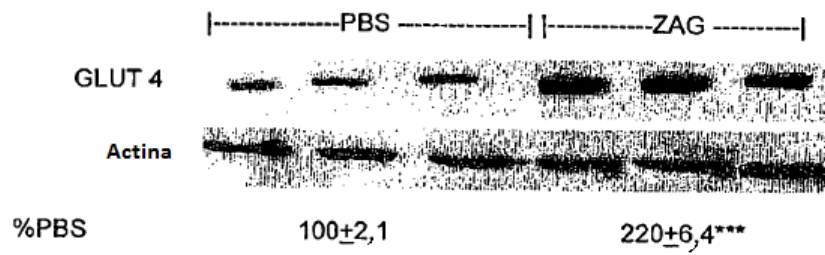


FIG. 2E

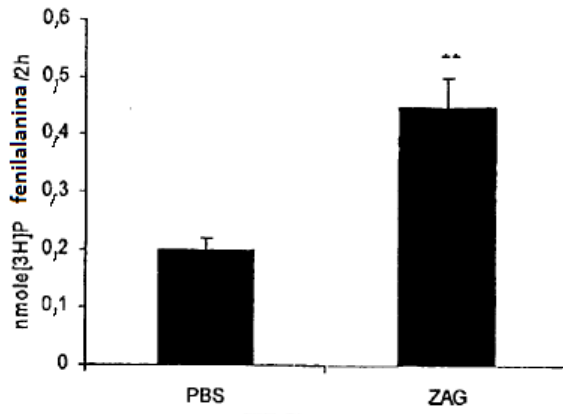


FIG. 3A

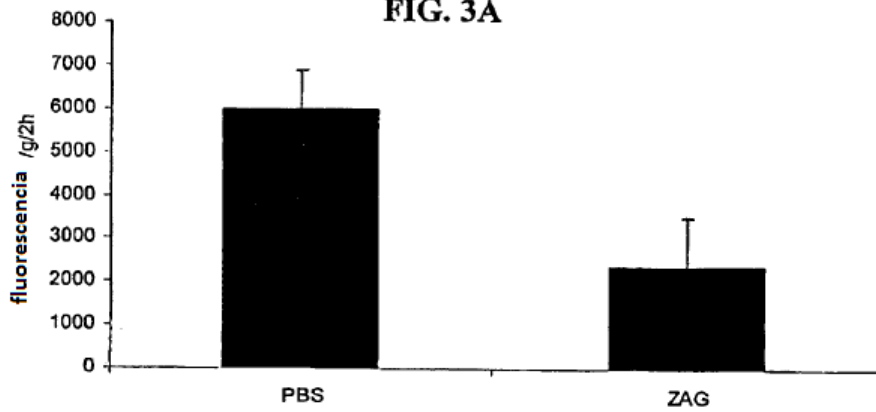


FIG. 3B

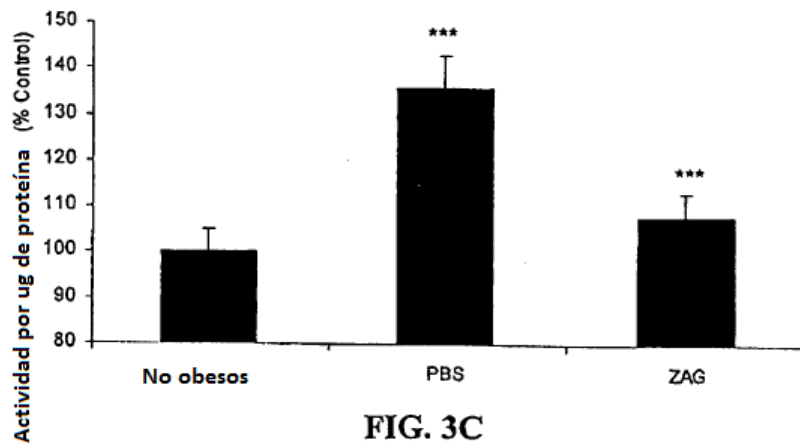


FIG. 3C

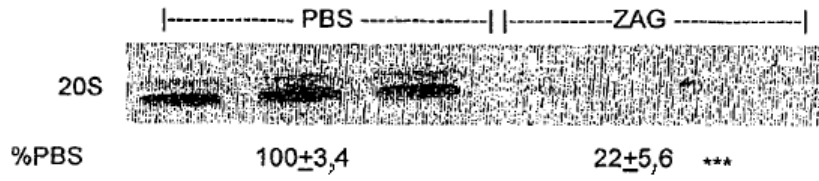


FIG. 3D

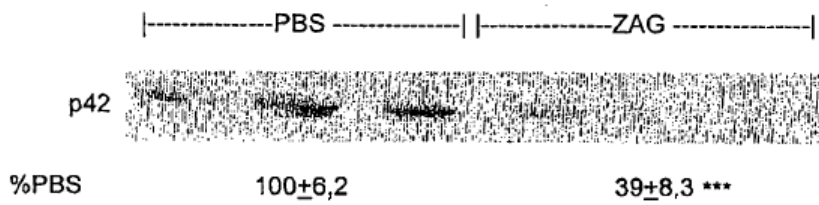


FIG. 3E

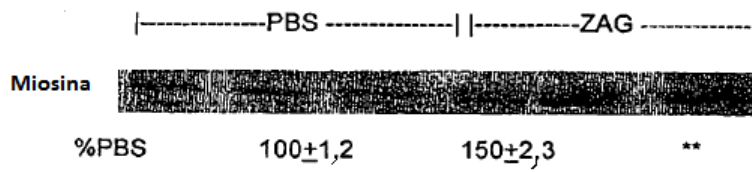


FIG. 3F

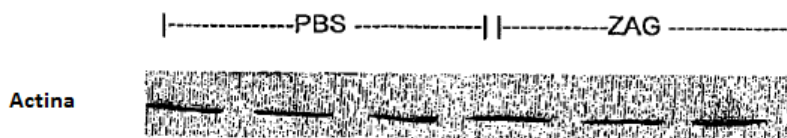


FIG. 3G

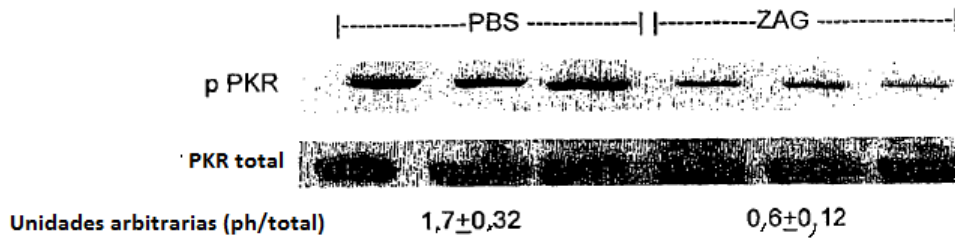


FIG. 4A

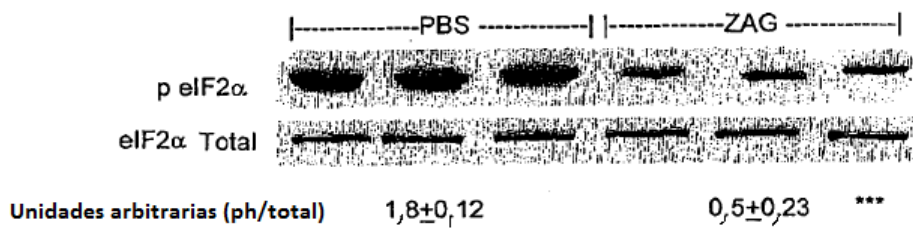


FIG. 4B

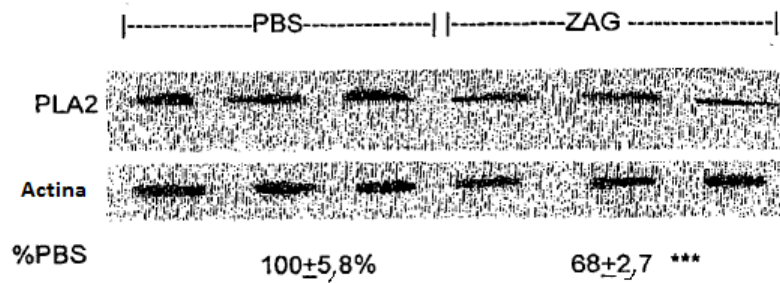


FIG. 4C

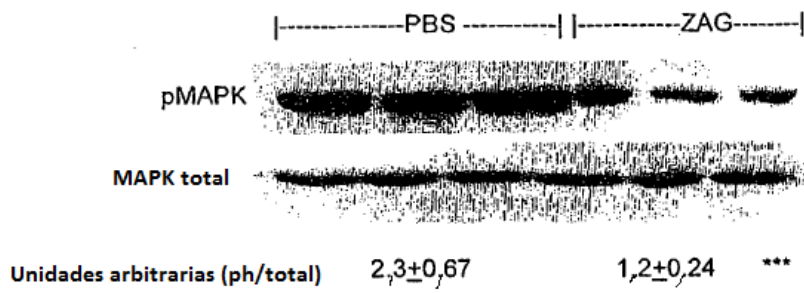


FIG. 4D

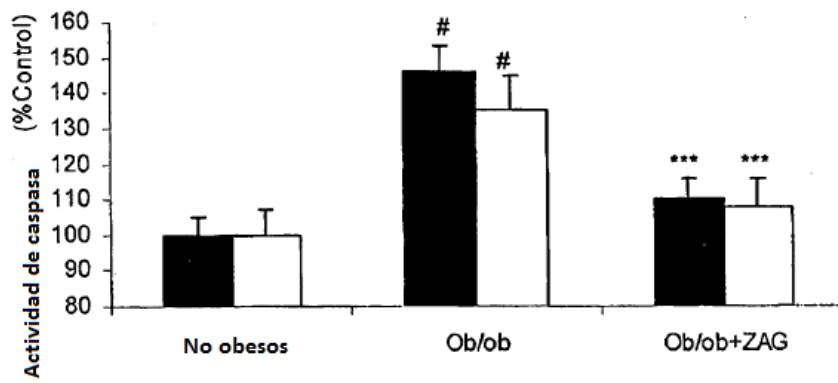


FIG. 4E

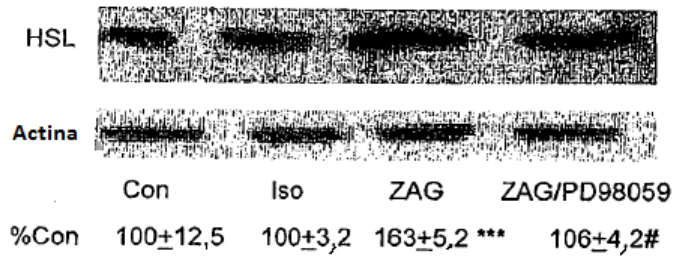


FIG. 5A

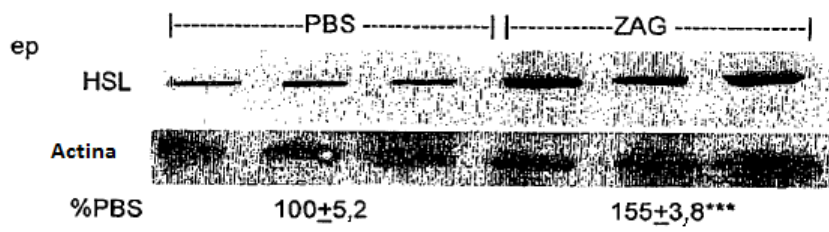


FIG. 5B

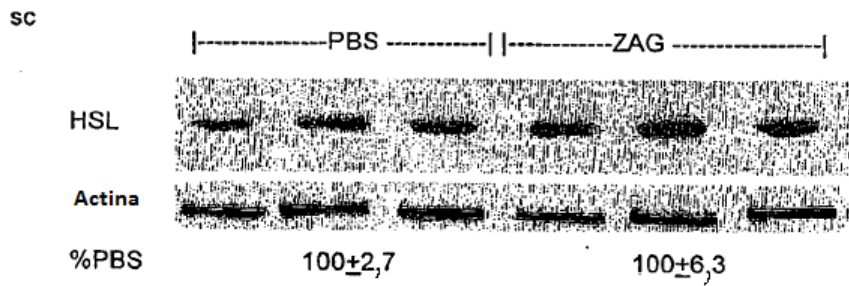


FIG. 5C

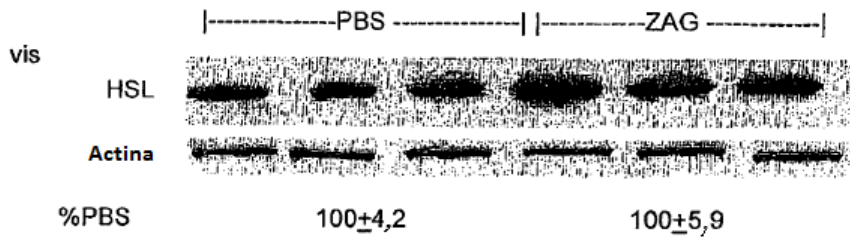


FIG. 5D

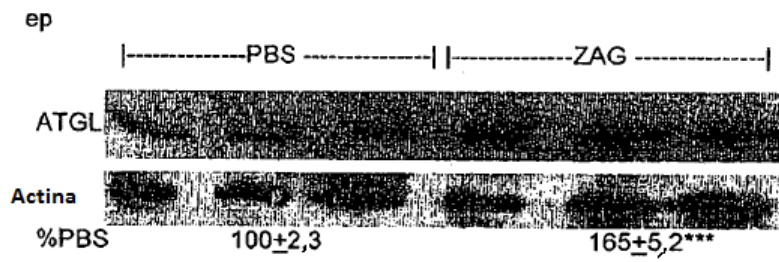


FIG. 5E

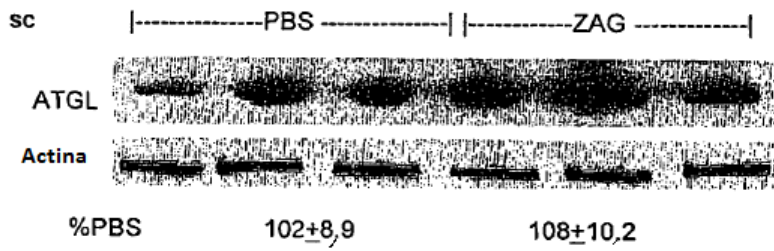


FIG. 5F

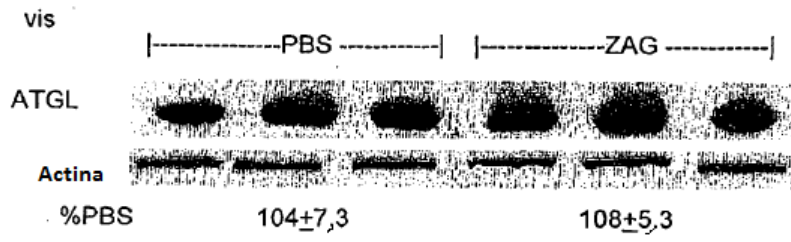


FIG. 5G

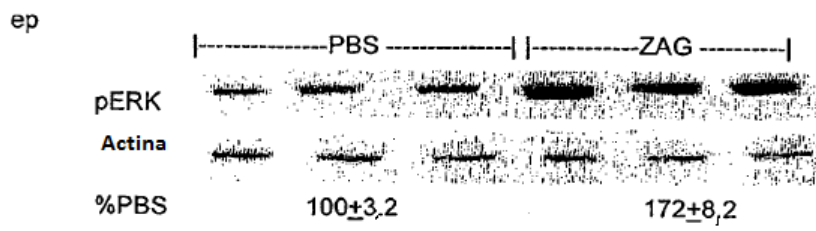


FIG. 5H

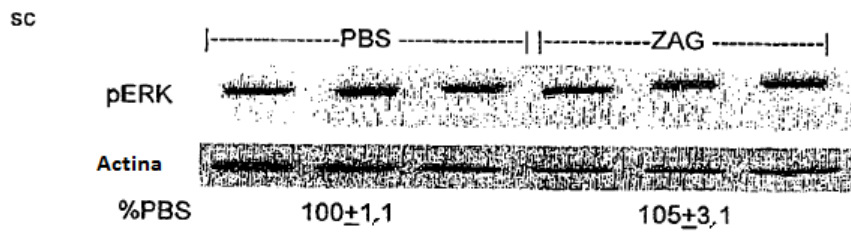


FIG. 5I

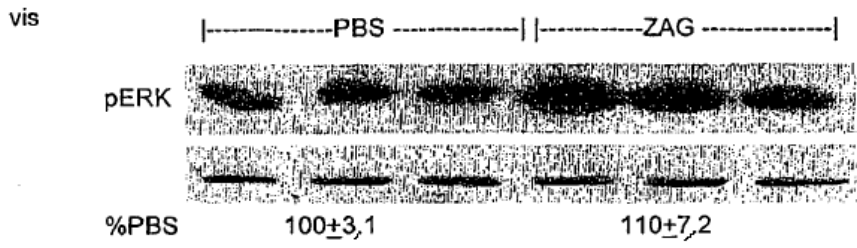


FIG. 5J

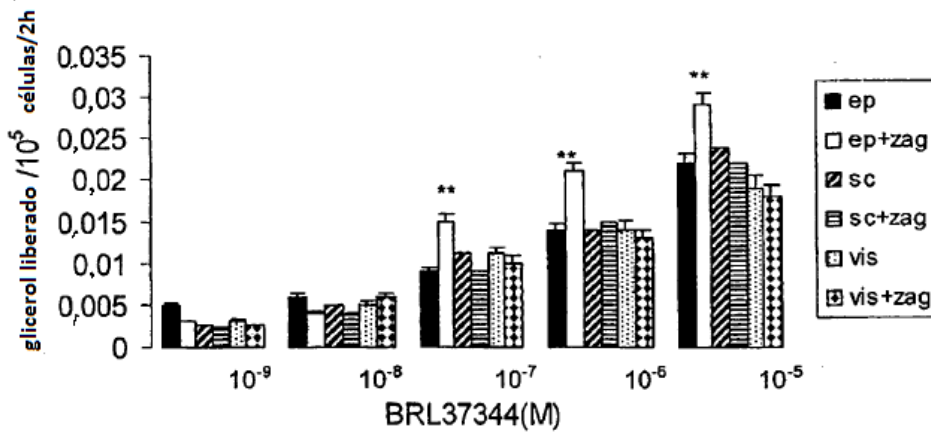


FIG. 5K

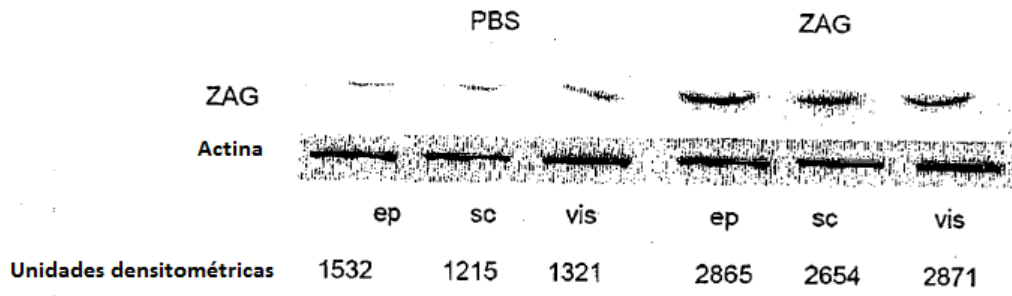


FIG. 6A

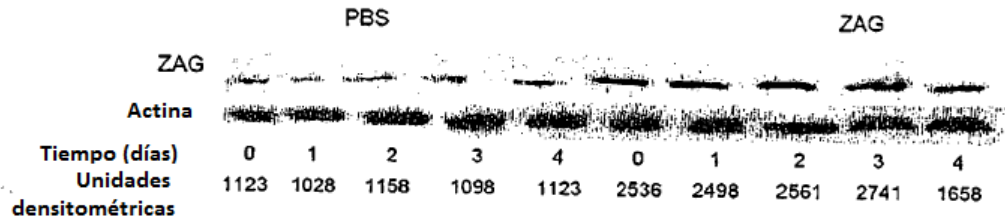


FIG. 6B

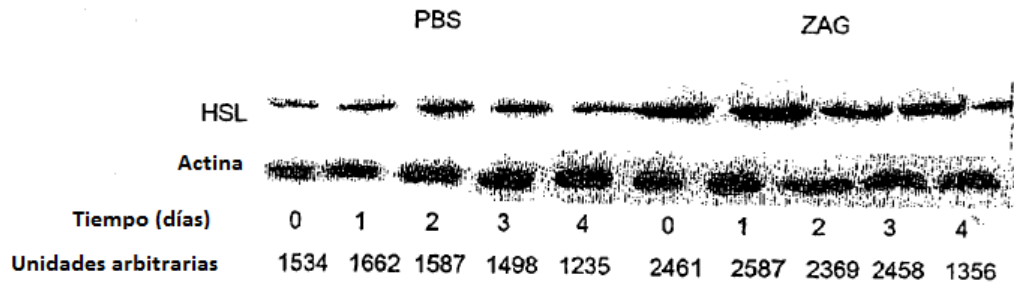


FIG. 6C

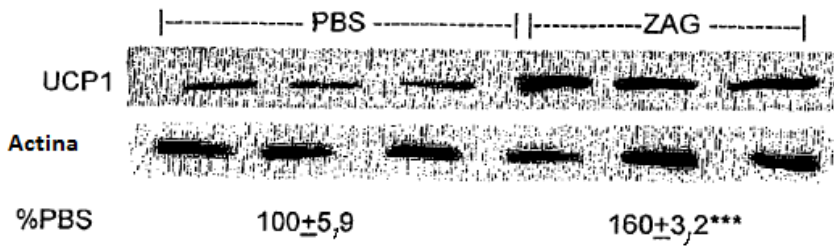


FIG. 6D

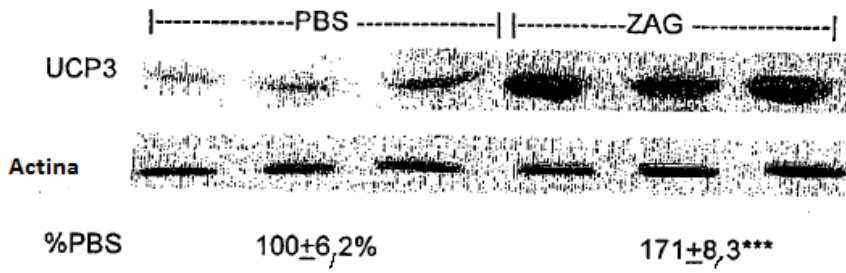


FIG. 6E

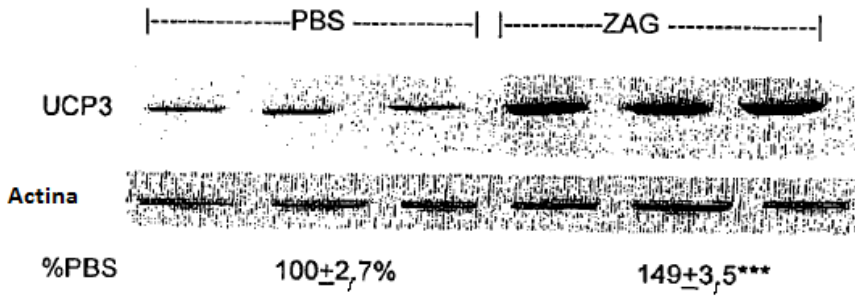


FIG. 6F

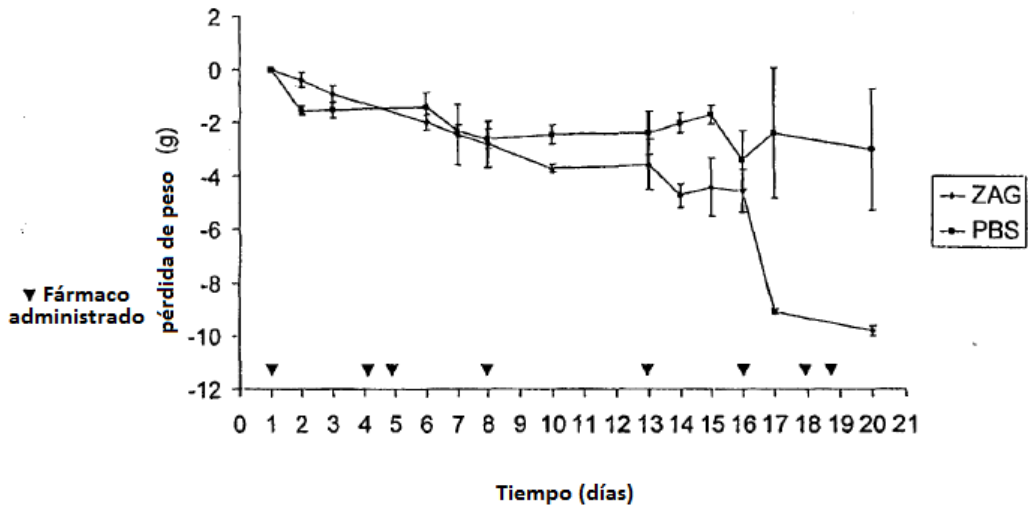


FIG. 7A

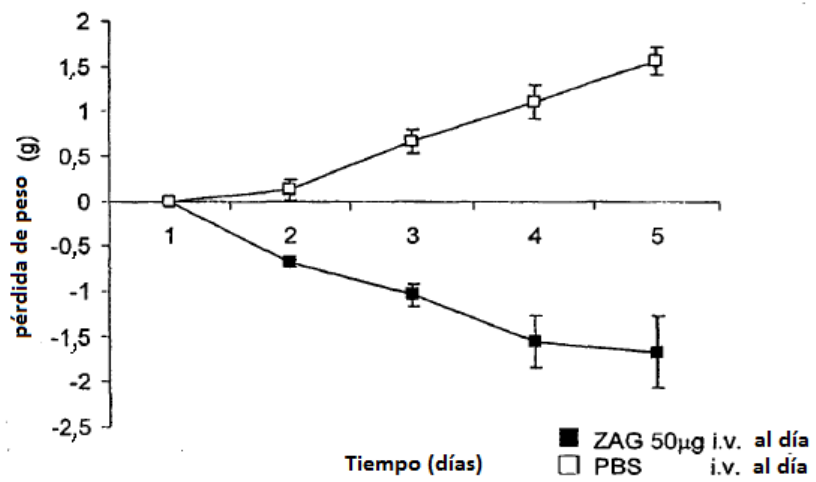


FIG. 7B

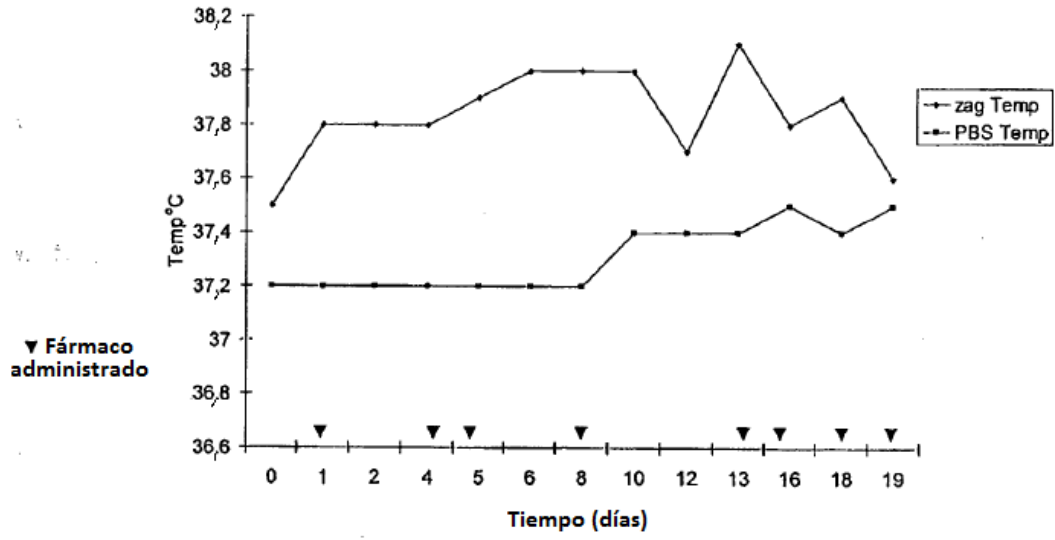


FIG. 7C

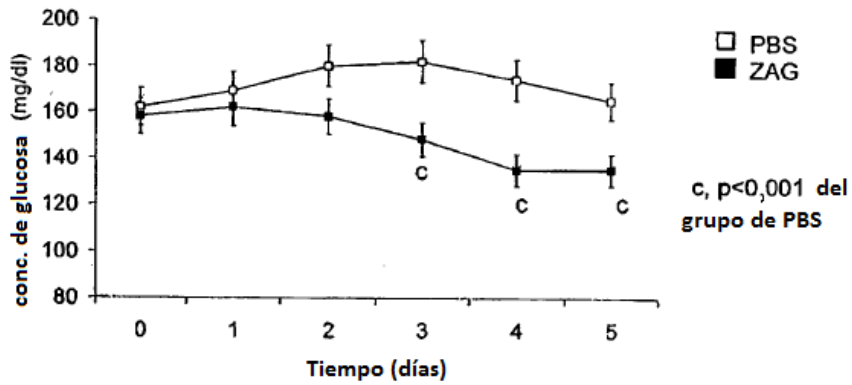


FIG. 8A

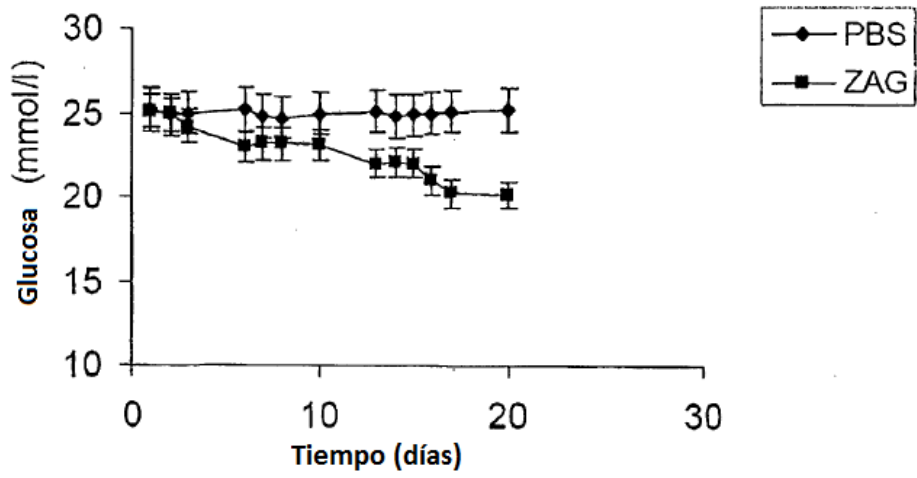


FIG. 8B

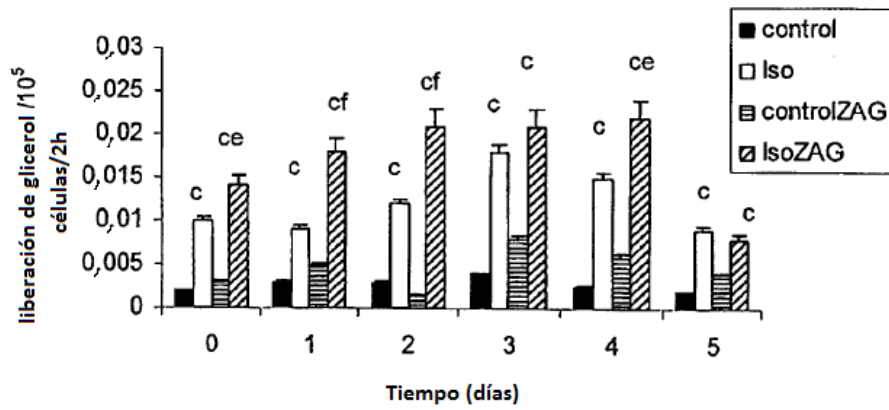
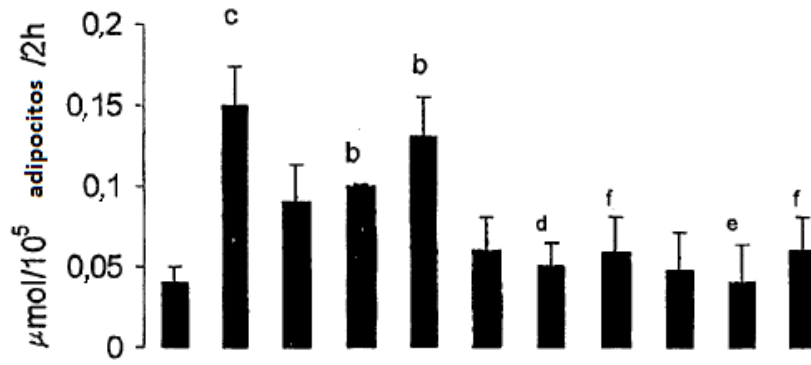


FIG. 9

Gln Glu Asn Gln Asp Gly Arg Tyr Ser Leu Thr
 Tyr Ile Tyr Thr Gly Leu Ser Lys His Val Glu
 Asp Val Pro Ala Phe Gln Ala Leu Gly Ser Leu
 Asn Asp Leu Gln Phe Phe Arg Tyr Asn Ser Lys
 Asp Arg Lys Ser Gln Pro Met Gly Leu Trp Arg
 Gln Val Glu Gly Met Glu Asp Trp Lys Glu Asp
 Ser Gln Leu Gln Lys Ala Arg Glu Asp Met Glu
 Thr Leu Lys Asp Ile Val Glu Tyr Tyr Asn Asp
 Ser Asn Gly Ser His Val Leu Gln Gly Arg Phe
 Gly Cys Glu Ile Glu Asn Asn Arg Ser Ser Gly
 Ala Phe Trp Lys Tyr Tyr Tyr Asp Gly Lys Asp
 Tyr Ile Glu Phe Asn Lys Glu Ile Pro Ala Trp
 Val Pro Phe Asp Pro Ala Ala Gln Ile Thr Lys
 Gln Lys Trp Glu Ala Glu Pro Val Tyr Val Gln
 Arg Ala Lys Ala Tyr Leu Glu Glu Glu Cys Pro
 Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Leu Lys Tyr Ser Lys
 Asn Ile Leu Asp Arg Gln Asp Pro Pro Ser Val
 Val Val Thr Ser His Gln Ala Pro Gly Glu Lys
 Lys Lys Leu Lys Cys Leu Ala Tyr Asp Phe Tyr
 Pro Gly Lys Ile Asp Val His Trp Thr Arg Ala
 Gly Gln Val Gln Glu Pro Glu Leu Arg Gly Asp
 Val Leu His Asn Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Ser
 Trp Val Val Val Ala Val Pro Pro Gln Asp Thr
 Ala Pro Tyr Ser Cys His Val Gln His Ser Ser
 Leu Ala Gln Pro Leu Val Val Pro Trp Glu Ala
 Ser COOH

FIG. 10



Isoprenalina (10µM)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ZAG(233nM)	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
ZAG(465nM)	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
ZAG(700nM)	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
SR59230A	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
IgG	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

FIG. 11

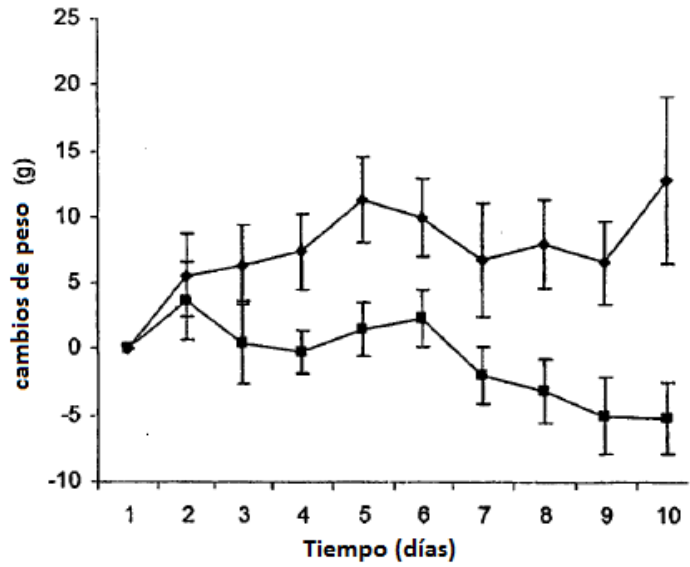


FIG. 12A

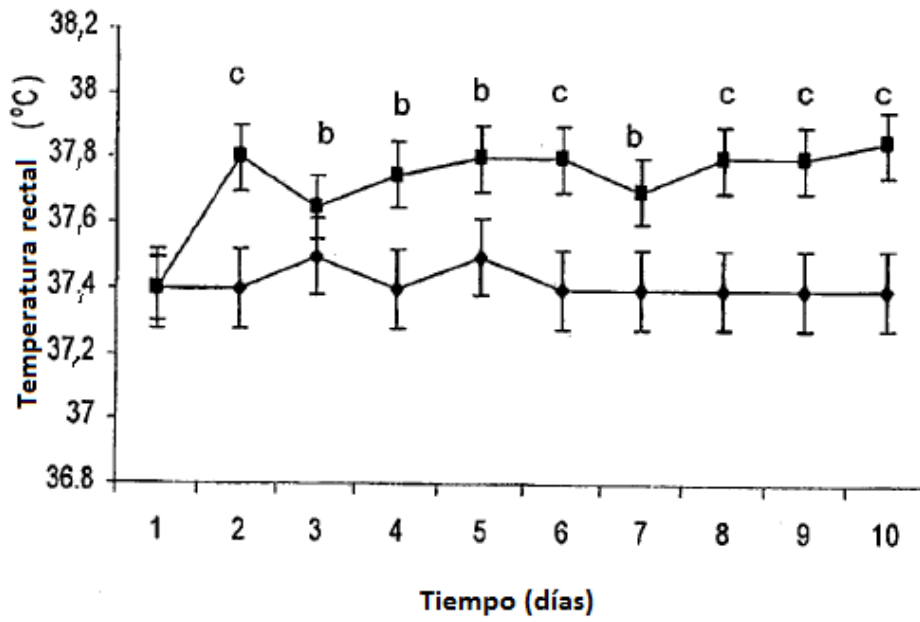


FIG. 12B

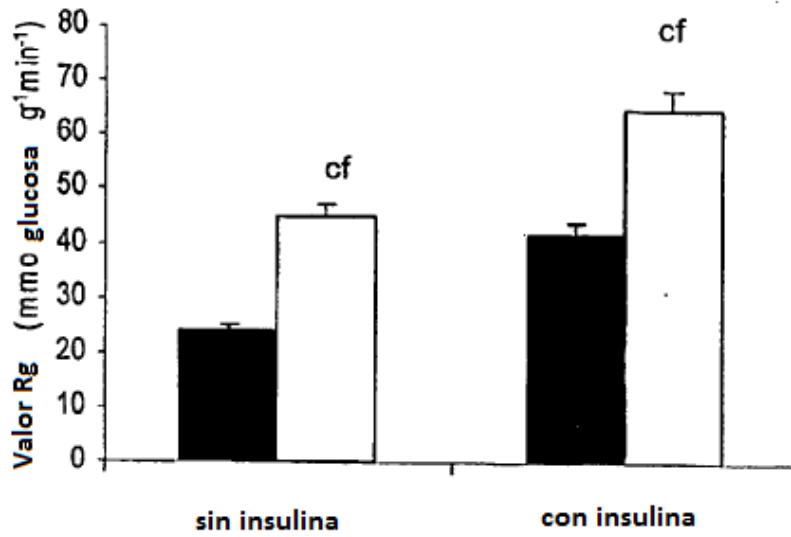


FIG. 12C

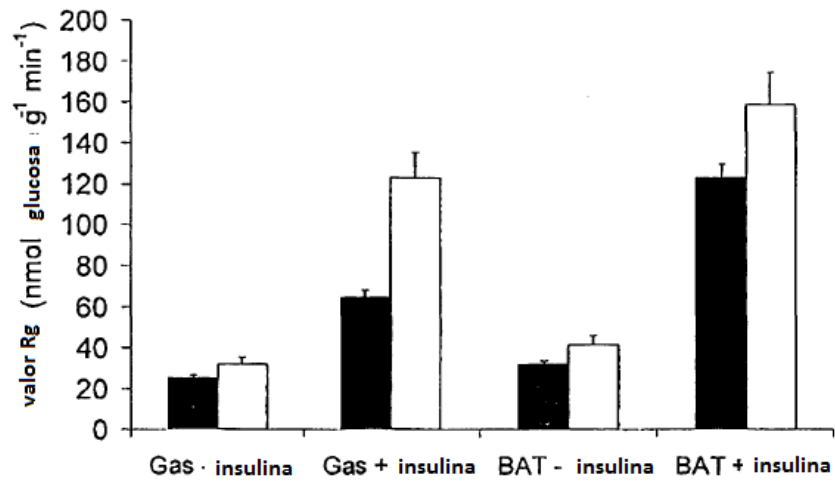


FIG. 12D

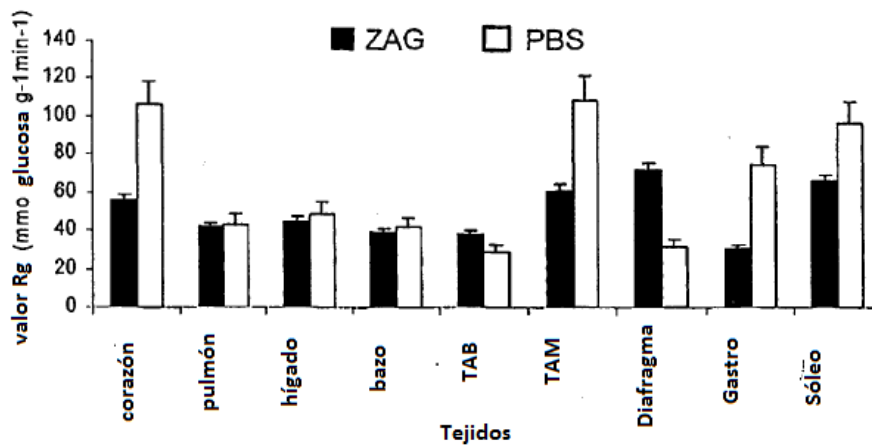


FIG. 12E

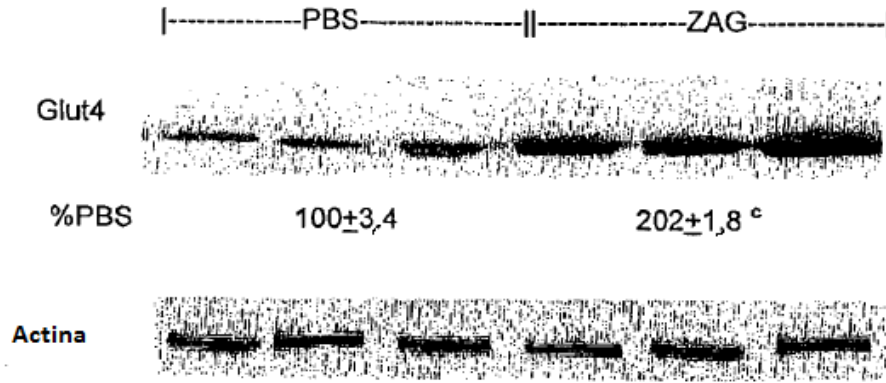


FIG. 13A

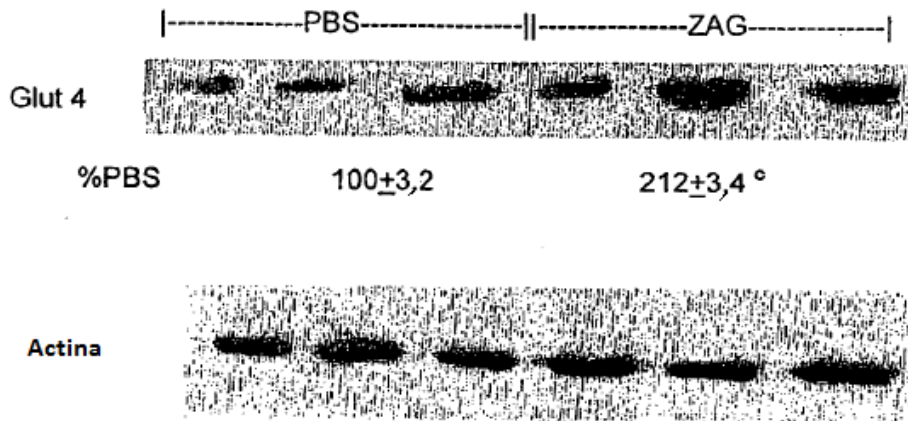


FIG. 13B

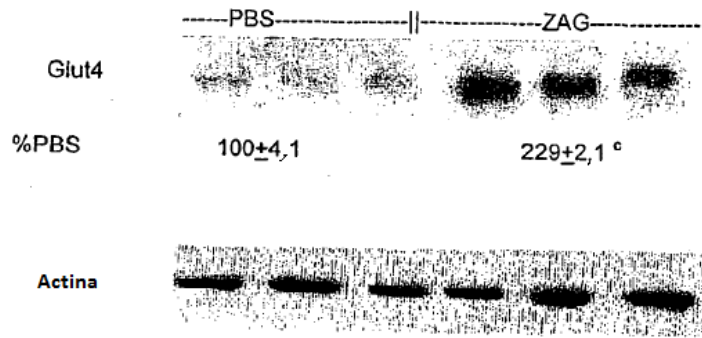


FIG. 13C

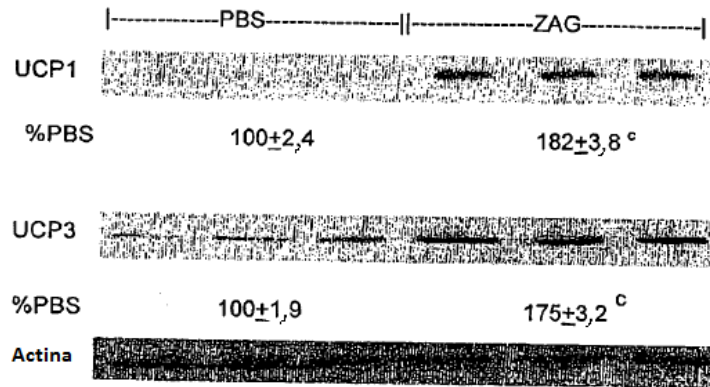


FIG. 14A

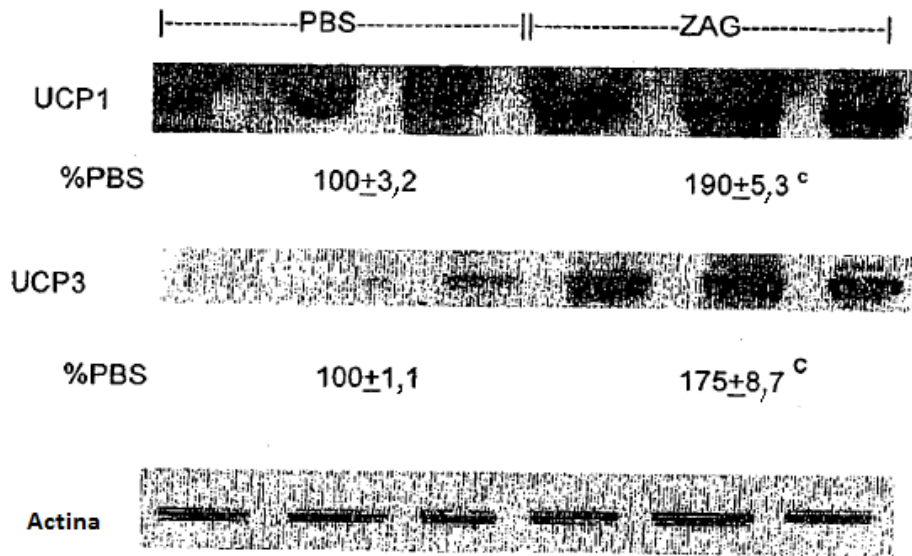


FIG. 14B

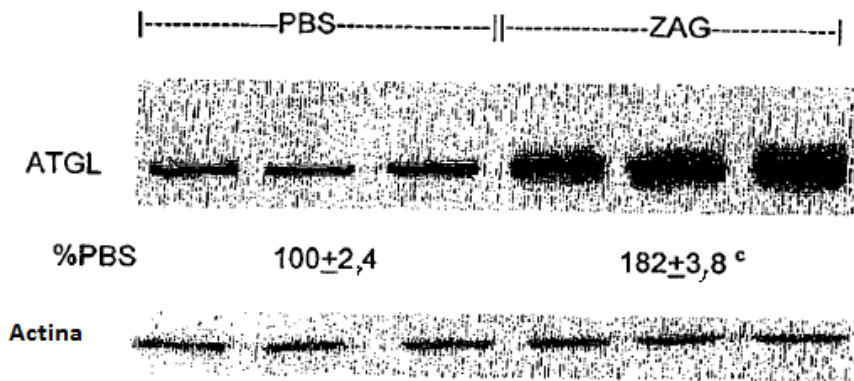


FIG. 15A

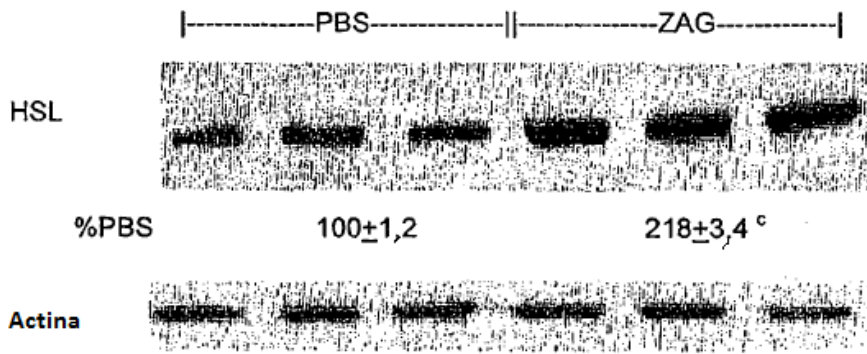


FIG. 15B

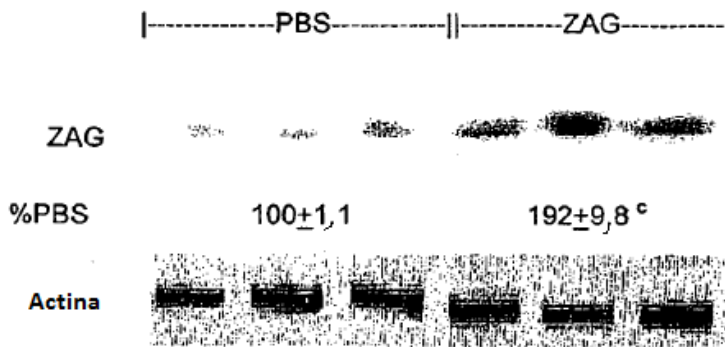


FIG. 16A

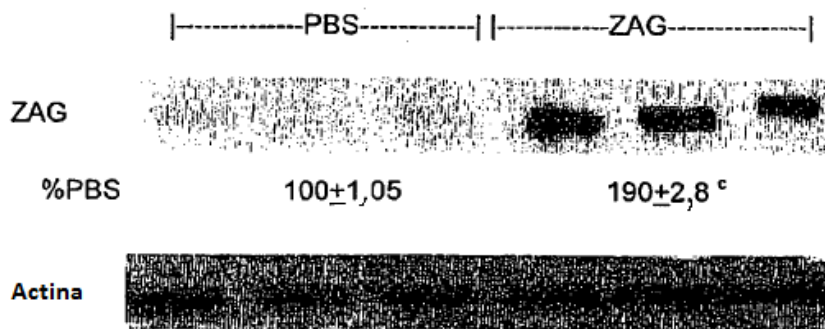


FIG. 16B

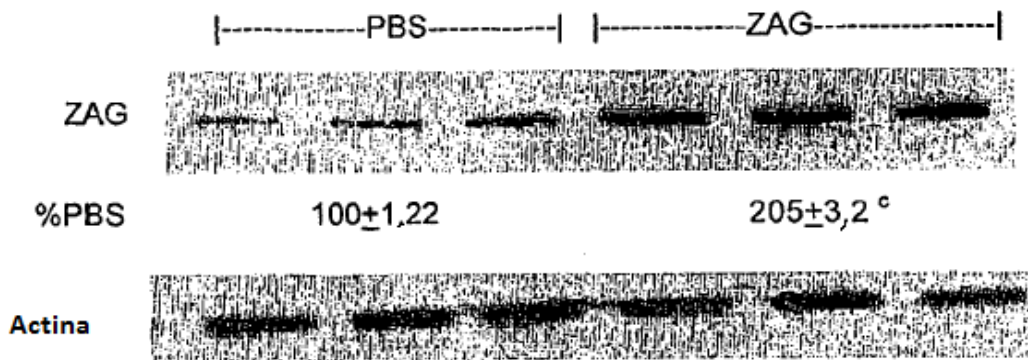


FIG. 16C

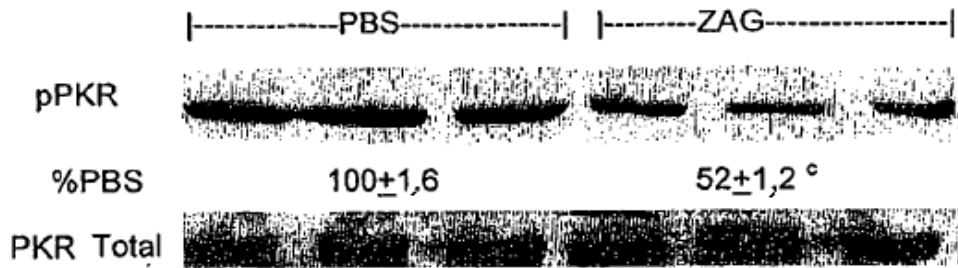


FIG. 17A

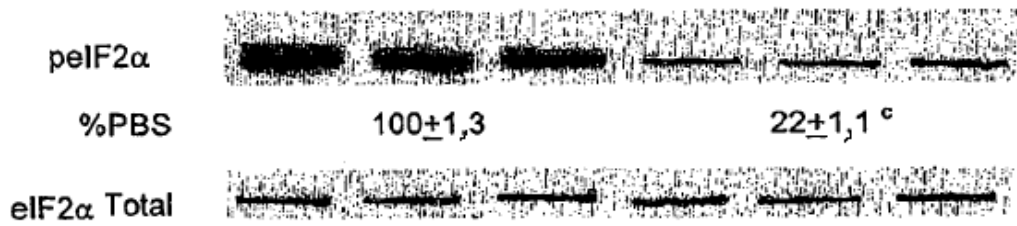


FIG. 17B

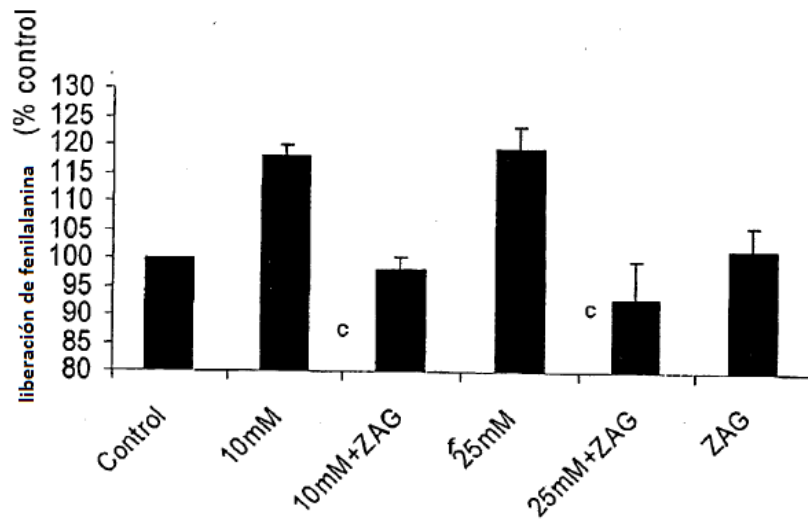


FIG. 18A

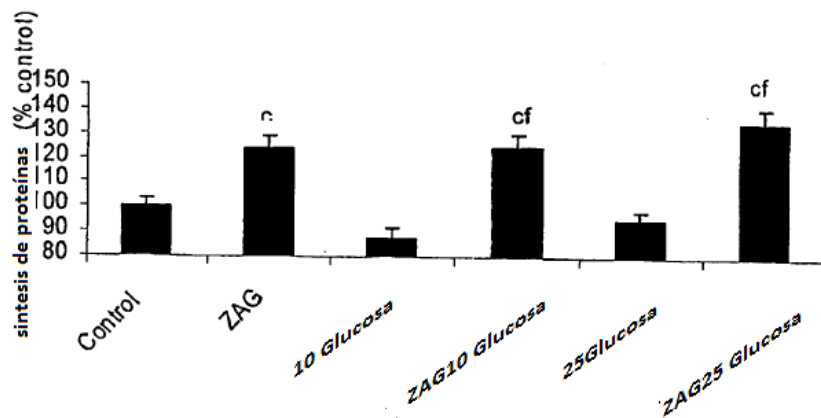


FIG. 18B

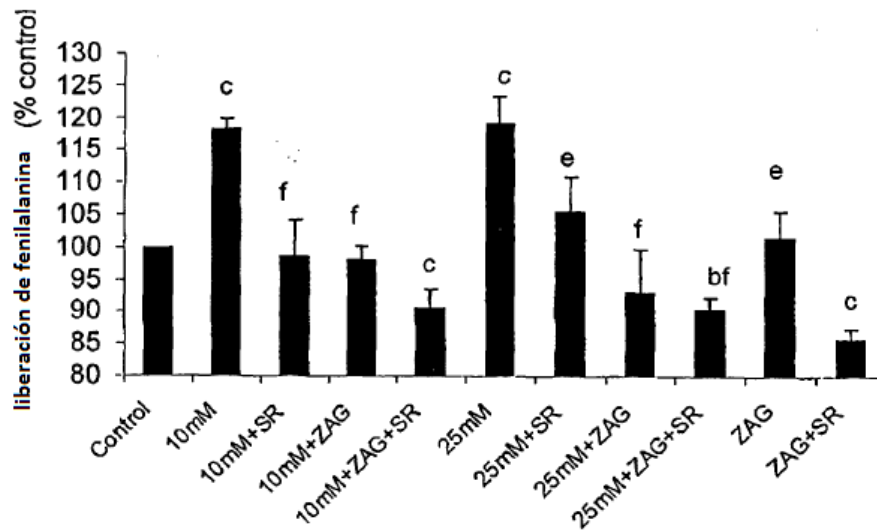


FIG. 19

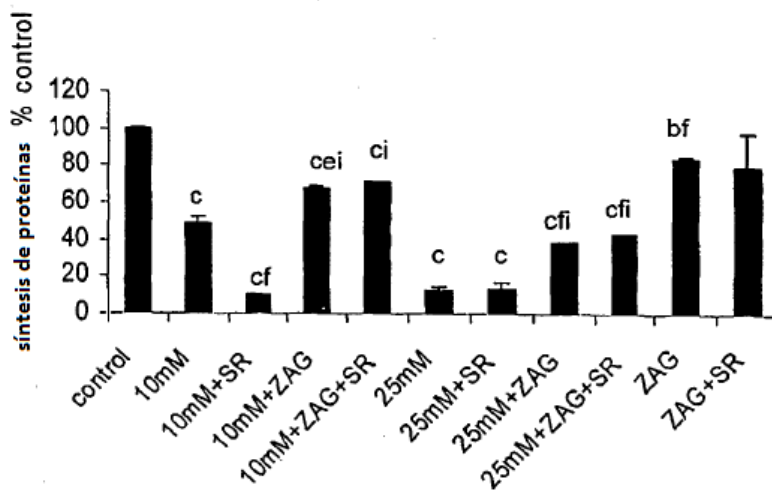


FIG. 20

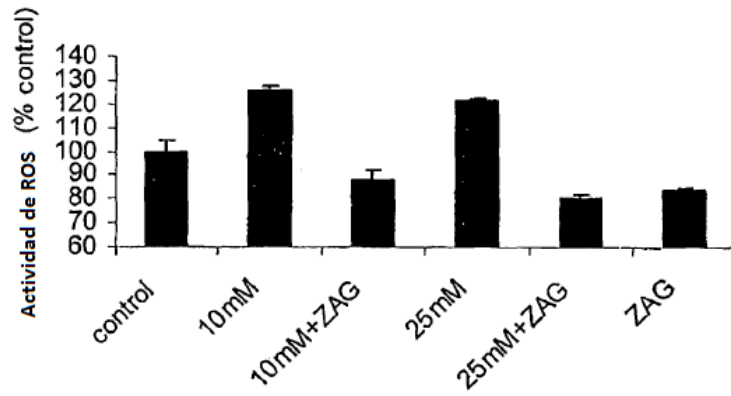


FIG. 21

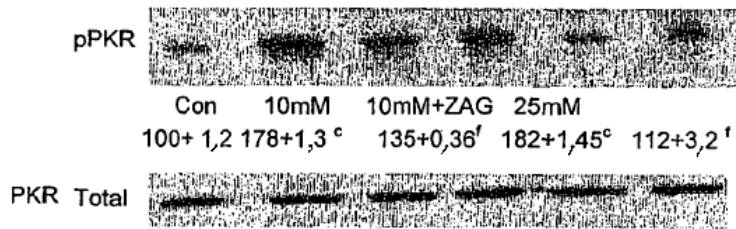


FIG. 22A

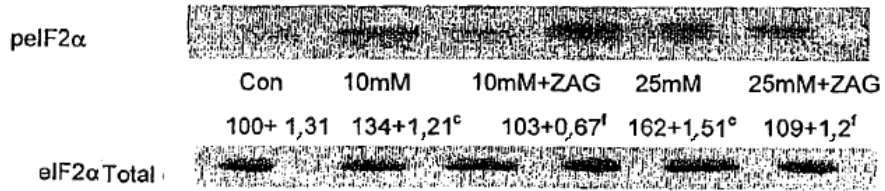


FIG. 22B

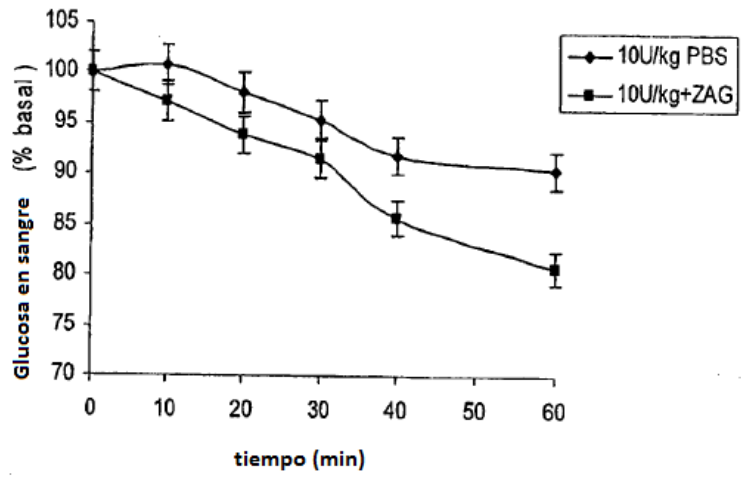


FIG. 23A

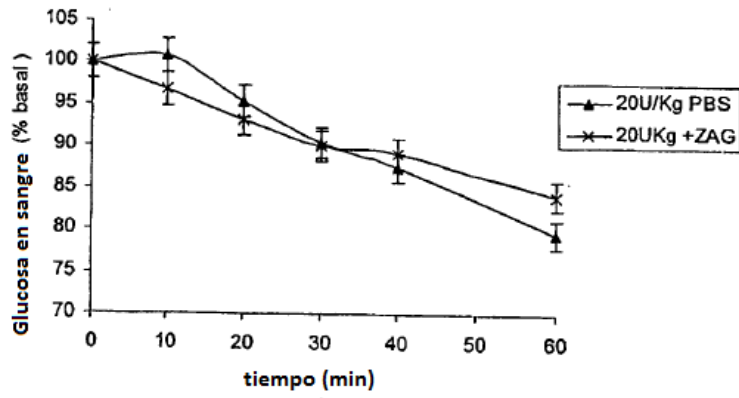


FIG. 23B

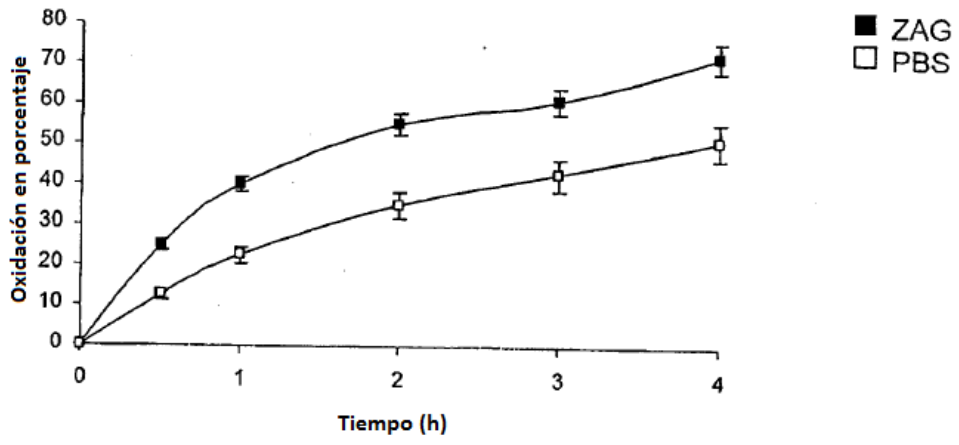


FIG. 24

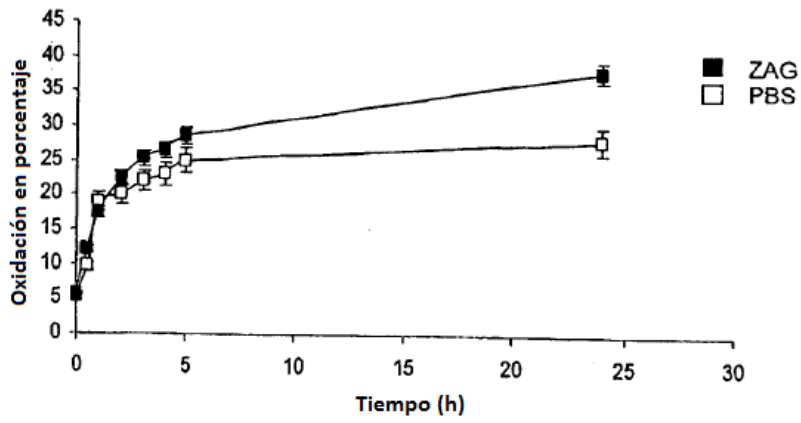


FIG. 25