

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 649**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2012 PCT/EP2012/073743**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13079487**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2012 E 12791484 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2785365**

54 Título: **Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de disfunciones asociadas al envejecimiento**

30 Prioridad:

28.11.2011 EP 11306573

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

23.10.2017

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)
101 Rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VALET, PHILIPPE;
DRAY, CÉDRIC;
KNAUF, CLAUDE;
KUNDUZOVA, OKSANA y
CASTAN-LAURELL, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 638 649 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

Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de disfunciones asociadas al envejecimiento

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un agonista del receptor APJ para su uso en el tratamiento o la prevención de la sarcopenia.

10 **Estado de la técnica**

Las disfunciones relacionadas con la edad pueden definirse como la pérdida de la función de órganos relacionada con la edad de las personas. Una gran cantidad de disfunciones puede aparecer en el cerebro y ser responsable en parte de las enfermedades degenerativas, pero también de los músculos. En este caso, las personas con disfunciones de sus músculos padecen sarcopenia.

La sarcopenia se puede definir como la pérdida de la masa, fuerza y función muscular relacionada con la edad, (Waters, Baumgartner & Garry 2000; Vandervoort & Symons, 2001). Aunque no existe un nivel específico de masa corporal magra o masa muscular en la que se puede decir que la sarcopenia está presente (Roubenoff 2001), cualquier pérdida de masa muscular es de importancia porque hay una fuerte relación entre la masa y la fuerza muscular (Roth, Ferrell & Hurley 2000). La sarcopenia parece comenzar en la cuarta década de la vida y se acelera después de la edad de aproximadamente 75 años (Waters, Baumgartner & Garry 2000). Con el envejecimiento y la inactividad, la mayor parte de la atrofia se aprecia en las fibras de contracción rápida (CR), que se reclutan durante los movimientos anaeróbicos de alta intensidad. Aunque la sarcopenia se aprecia sobre todo en los individuos físicamente inactivos, también es evidente en individuos que permanecen físicamente activos durante toda su vida. Este hallazgo sugiere que la inactividad física no es el único factor que contribuye a la sarcopenia. La investigación actual está encontrando que el desarrollo de la sarcopenia es un proceso multifactorial. Muchos factores, incluyendo la inactividad física, el remodelado motor-unidad, la disminución de los niveles de hormonas, y la disminución de la síntesis de proteínas, pueden contribuir a la sarcopenia.

Aunque la sarcopenia puede ser parcialmente reversible con intervenciones de ejercicios apropiados, existe una necesidad de encontrar un tratamiento original de la sarcopenia.

La apelina es un péptido, identificado como el ligando endógeno de APJ, un receptor acoplado a proteína G expresado de forma ubicua (Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. *Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. Biochem Biophys Res Commun.* Octubre 251(2):471-6 1998). La apelina se sintetiza como un prepropéptido de 77 aminoácidos que se escinde en diferentes fragmentos que incluyen apelina-36, apelina-17, apelina-13 y [Pyr1] apelina-13 post-traducciona con una conversión de glutamato N-terminal a piroglutamato que previene la descomposición enzimática y preserva de este modo la actividad biológica (Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. *Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. Biochem Biophys Res Commun.* Octubre 251(2):471-6 1998). Antes de revelarse como un factor secretado por adipocitos (Boucher *et al*, *Endocrinology*, 2005), la apelina se conoce por ejercer varios efectos centrales y periféricos en diferentes tejidos, tales como la regulación de las funciones cardiovascular, inmunitaria y gastrointestinal, pero también en la homeostasis de fluidos, la angiogénesis, la proliferación de diferentes tipos de células y el desarrollo embrionario (véase, por ejemplo, los documentos US2008/0182779, US2010/0221255 Simpkin JC *et al Basic Research in Cardiology* o US2005/0075275). No obstante, su papel en las disfunciones asociadas con el envejecimiento aún no se ha identificado.

El documento WO 2007/026356 desvela el uso de apelina para tratar "trastornos cutáneos por el envejecimiento".

El documento EP 1967210 desvela el uso de agonistas del receptor APJ para tratar trastornos del estado de ánimo, tales como demencia senil (y muchas otras enfermedades aparentemente asociadas con el envejecimiento).

El documento WO 2009/043504 A2 y el documento WO 2009/033819 desvelan péptidos apelina para tratar numerosos trastornos adicionales.

El documento US2005/1112701 y Goetze JP *et al Regulatory Peptide* 2006 desvelan la detección de apelina/expresión de apelina para diagnosticar enfermedades cardiovasculares.

Objeto de la invención

Los inventores muestran que la apelina desempeña un papel en el metabolismo energético y particularmente en los mecanismos energéticos en las mitocondrias. Demuestran que el tratamiento con apelina aumenta la oxidación completa de ácidos grasos (OAG), el transporte de glucosa, la capacidad oxidativa mitocondrial y la biogénesis en el

músculo de ratones resistentes a la insulina. Es más, demuestran que el músculo esquelético aparece como la diana tisular principal para la acción de apelina, en la que se media un mayor consumo de combustible. De este modo, la apelina podría utilizarse en enfermedades relacionadas con problemas en el mecanismo enérgico en las mitocondrias.

5 Utilizando apelina en ratones nuligénicos (KO) y ratones de tipo silvestre tratados crónicamente con apelina, los inventores identificaron que los marcadores de sarcopenia similares a miostatina y miogenina se regularon negativamente o positivamente, respectivamente en ratones viejos. De este modo, la apelina debe utilizarse para tratar la sarcopenia.

10 En este contexto, la apelina podría contribuir a mejorar el mecanismo energético en las mitocondrias de los músculos u otros tejidos alterados por mitocondrias (corazón, cerebro, ...) y contribuir así a mejorar el rendimiento de los músculos deficientes y frágiles u otros tejidos deficientes asociados a la edad. De este modo, la apelina puede utilizarse en el tratamiento o la prevención de la sarcopenia o en el tratamiento o la prevención del síndrome de fragilidad. La apelina también puede utilizarse en el tratamiento o la prevención de la progeria también conocida como síndrome de progeria Hutchinson-Gilford.

15 De este modo, un primer objetivo de la invención se refiere a un agonista del receptor APJ para su uso en el tratamiento o la prevención de la sarcopenia.

20 Otro objetivo de la invención se refiere a un método *ex vivo* de predicción de la capacidad de un paciente afectado por sarcopenia, que comprende la etapa que consiste en detectar la expresión de apelina en una muestra obtenida de dicho paciente.

25 Descripción detallada de la invención

Agonista del receptor APJ o apelinomiméticos y usos de los mismos

30 Un primer objetivo de la invención se refiere a un agonista del receptor APJ para su uso en el tratamiento o la prevención de la sarcopenia.

35 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "disfunción asociada con el envejecimiento" denota alteraciones mitocondriales (número y/o función) que conducen a disfunciones metabólicas observadas en personas de edad avanzada y al aumento con el envejecimiento que conduce a enfermedades relacionadas con la edad, tales como la pérdida de masa muscular (sarcopenia), eficacia cardíaca, neurodegeneración.

Los compuestos de acuerdo con la invención se utilizan para el tratamiento de la sarcopenia.

40 La expresión "receptor APJ" tiene por objeto el receptor de apelina identificado originalmente por O'Dowd *et al.* (O'Dowd *et al.*, 1993, *Gene* 136: 355360).

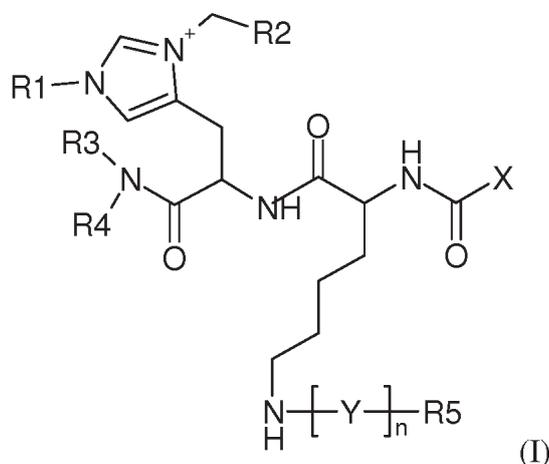
45 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "agonista del receptor APJ" se refiere a cualquier compuesto, natural o no, capaz de promover la función del receptor APJ. Los ejemplos de los agonistas del receptor APJ de la presente invención incluyen, entre otros, polipéptidos, anticuerpos, aptámeros y moléculas orgánicas pequeñas.

50 Las actividades agonísticas de un compuesto de ensayo hacia el receptor APJ pueden determinarse por cualquier método bien conocido en la materia. Por ejemplo, ya que el agonista de la presente invención puede promover la función del receptor APJ, el agonista puede identificarse sistemáticamente utilizando el agonista natural del receptor APJ (es decir, apelina) y su receptor. Normalmente, el agonista de la presente invención puede obtenerse utilizando el método de identificación sistemática de la sustancia que promueve la función del receptor APJ, que comprende comparar (i) el caso en que apelina se pone en contacto con el receptor APJ y (ii) el caso en que un compuesto de ensayo se pone en contacto con el receptor APJ. En el método de identificación sistemática de la presente invención, por ejemplo, (a) se miden las cantidades de unión de apelina al receptor APJ (i) cuando apelina se pone en contacto con el receptor APJ y (ii) la apelina y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con el receptor APJ; y comparación de los resultados; o, (b) se miden las actividades de estimulación celular (p. ej., las actividades que promueven la liberación de ácido araquidónico, la liberación de acetilcolina, liberación de Ca²⁺ intracelular, la producción de AMPc intracelular, la producción de GMPc intracelular, la producción de inositol fosfato, los cambios en el potencial de la membrana celular, la fosforilación de las proteínas intracelulares, la activación de c-fos, los cambios del pH, etc.) mediadas por el receptor APJ (i) cuando la apelina se pone en contacto con el receptor APJ y (ii) un compuesto de ensayo se pone en contacto con el receptor APJ; y comparación de los resultados. Normalmente, los compuestos de ensayo que proporcionan una promoción más alta o al menos la misma promoción de receptor APJ que apelina se seleccionan entonces como agonistas del receptor APJ. Los ejemplos específicos del método de identificación sistemática de la presente invención incluyen: (1) un método de identificación sistemática de la sustancia que promueve la función del receptor APJ, que comprende medir las cantidades de unión de apelina etiquetada al receptor APJ cuando la apelina etiquetada se pone en contacto con el receptor APJ y cuando la apelina etiquetada y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con el receptor APJ; y comparar las

cantidades; (2) un método de identificación sistemática de la sustancia que promueve la función del receptor APJ, que comprende medir las cantidades de unión de apelina etiquetada a una célula que contiene el receptor APJ o una fracción de membrana de la célula, cuando la apelina etiquetada se pone en contacto con la fracción celular o membranal y cuando la apelina etiquetada y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con la fracción celular o membranal, y comparar las cantidades de unión; y, (3) un método de identificación sistemática de la sustancia que promueve la función del receptor APJ, que comprende medir las cantidades de unión de apelina etiquetada al receptor APJ expresado en una membrana celular mediante el cultivo de un transformante que tiene un ADN que codifica el receptor APJ, cuando la apelina etiquetada se pone en contacto con el receptor APJ y cuando la apelina etiquetada y un compuesto de ensayo se ponen en contacto con el receptor APJ, y comparar las cantidades de unión. En esos ejemplos, los compuestos de ensayo que proporcionan una mayor unión o al menos la misma unión que apelina se seleccionan entonces como agonistas del receptor APJ. Específicamente, un método para determinar si un compuesto es un agonista del receptor APJ se describe en Iturrioz X. *et al.* (Iturrioz X, Alvear-Perez R, De Mota N, Franchet C, Guillier F, Leroux V, Dabire H, Le Jouan M, Chabane H, Gerbier R, Bonnet D, Berdeaux A, Maigret B, Galzi JL, Hibert M, Llorens-Cortes C. *Identification and pharmacological properties of E339-3D6, the first nonpeptidic apelin receptor agonist.* *FASEB J.* Mayo de 2010; 24(5):1506-1517. Epub 29 de diciembre de 2009). La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 2005/0112701 también describe un sistema de ensayo para la identificación de un ligando para el receptor de angiotensina similar a 1 (receptor APJ) que comprende un receptor APJ. Otro método también se describe en la publicación de patente de Estados Unidos n.º US 6.492.324.

En una realización, el agonista del receptor APJ es una molécula orgánica pequeña. La expresión "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas utilizadas generalmente en los productos farmacéuticos. La expresión excluye macromoléculas biológicas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferentes varían en tamaño hasta aproximadamente 5.000 Da, más preferentemente hasta 2.000 Da, y más preferentemente hasta aproximadamente 1.000 Da.

Los ejemplos de moléculas orgánicas pequeñas que son agonistas del receptor APJ incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 19030052 y en Iturrioz X. *et al.* (Iturrioz X, Alvear-Perez R, De Mota N, Franchet C, Guillier F, Leroux V, Dabire H, Le Jouan M, Chabane H, Gerbier R, Bonnet D, Berdeaux A, Maigret B, Galzi JL, Hibert M, Llorens-Cortes C. *Identification and pharmacological properties of E339-3D6, the first nonpeptidic apelin receptor agonist.* *FASEB J.* Mayo de 2010; 24(5):1506-1517. Epub 29 de diciembre de 2009). Normalmente, una molécula orgánica pequeña que es un agonista del receptor APJ tiene la fórmula general (I):



en la que:

R1 es un grupo arilo, alquilarilo, heteroarilo o alquilheteroarilo

R2 es un átomo de hidrógeno o un grupo arilo

R3 y R4 representan un átomo de hidrógeno o un grupo heterocicloalquilo siempre que R3 y R4 no puedan representar simultáneamente un hidrógeno y que R3 y R4 puedan ser ambos parte de un grupo heterocicloalquilo

R5 representa un grupo seleccionado entre el grupo que consiste en Boc, Fmoc, rojo texas, azul patente V, lisamina, y rodamina 101

n es un número entero de 0 a 1

Y representa un grupo $-\text{CO}-(\text{NH})_n-\text{A}-\text{NH}-$ con:

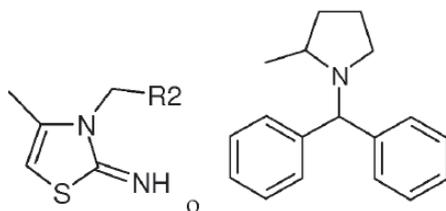
n' es un número entero de 0 a 1

A es un grupo seleccionado entre el grupo que consiste en:

$-(\text{CH}_2)_{n'}-$

$-\text{[(CH}_2\text{)}_2\text{-O]}_n\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$
 $-(\text{CH}_2\text{)}_m\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_{m'}\text{-}$
 $-(\text{CH}_2\text{)}_m\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_{m'}\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_{m''}\text{-}$
 $-(\text{CH}_2\text{)}_m\text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_{m'}\text{-}$
 $-(\text{CH}_2\text{)}_m\text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_{m'}\text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_{m''}\text{-}$
 con n representando un número entero de 1 a 20
 con n'''' representado un número entero de 1 a 10
 con m , m' y m'' representando independientemente de los otros un número entero de 1 a 15

10 X representa un grupo elegido entre el siguiente listado:



15 Alternativamente, el agonista del receptor APJ puede consistir en un anticuerpo (incluyendo la expresión "porción de anticuerpo").

En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende una cadena ligera del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende una cadena pesada del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende una porción Fab del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende una porción F(ab')₂ del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende una porción Fc del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende una porción Fv del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende un dominio variable del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende uno o más dominios RDC del anticuerpo.

35 Como se utiliza en la presente memoria, "anticuerpo" incluye tanto anticuerpos de origen natural como de origen no natural. Específicamente, "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, y fragmentos monovalentes y divalentes de los mismos. Además, "anticuerpo" incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos sintéticos enteros, anticuerpos de cadena sencilla, y fragmentos de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o no humano. Un anticuerpo no humano puede humanizarse por métodos recombinantes para reducir su
 40 inmunogenicidad en el hombre.

Los anticuerpos se preparan de acuerdo con la metodología convencional. Los anticuerpos monoclonales pueden generarse utilizando el método de Kohler y Milstein (*Nature*, 256:495, 1975). Para preparar anticuerpos monoclonales útiles en la invención, un ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza a intervalos adecuados
 45 (p. ej., dos veces por semana, semanalmente, dos veces al mes o mensualmente) con formas antigénicas de APJ. Al animal se le puede administrar un "refuerzo" final de antígeno en un plazo de una semana al sacrificio. A menudo es deseable utilizar un adyuvante inmunológico durante la inmunización. Los adyuvantes inmunológicos adecuados incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, alumbre, adyuvante de Ribí, Titermax de Hunter, adyuvantes de saponina, tales como QS21 o Quil A, u oligonucleótidos inmunoestimulantes que contienen
 50 CpG. Otros adyuvantes adecuados son bien conocidos en el campo. Los animales pueden inmunizarse por vías subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intranasal o por otras vías. Un animal dado puede inmunizarse con múltiples formas del antígeno por múltiples vías.

Brevemente, el antígeno puede proporcionarse como péptidos sintéticos correspondientes a regiones antigénicas de interés en APJ. Tras el régimen de inmunización, los linfocitos se aíslan del bazo, ganglios linfáticos u otro órgano del animal y se fusionan con una estirpe celular de mieloma adecuada utilizando un agente tal como polietilenglicol para formar un hibridoma. Tras la fusión, las células se colocan en medios permisivos para el crecimiento de
 55 hibridomas pero no en miembros de fusión utilizando métodos convencionales, como se describe en (*Coding*,

Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3ª edición, Academic Press, Nueva York, 1996). Tras el cultivo de los hibridomas, los sobrenadantes celulares se analizan para la presencia de anticuerpos de la especificidad deseada, es decir, se unen selectivamente al antígeno. Las técnicas analíticas adecuadas incluyen ELISA, citometría de flujo, inmunoprecipitación, y transferencia Western. Otras técnicas de identificación sistemática son bien conocidas en el campo. Las técnicas preferentes son aquellas que confirman la unión de anticuerpos a un antígeno plegado de forma nativa conformacionalmente intacto, tal como ELISA no desnaturalizante, citometría de flujo e inmunoprecipitación.

De manera significativa, como es bien conocido en la materia, solo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véase, en general, Clark, W.R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7ª ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones Fc' y Fc, por ejemplo, son efectoras de la cascada del complemento, pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo del cual se ha escindido enzimáticamente la región pFc', o que se ha producido sin la región pFc', designado como fragmento F(ab')₂, mantiene los dos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. De manera similar, un anticuerpo del cual se ha escindido enzimáticamente la región Fc, o que se ha producido sin la región Fc, designado como fragmento Fab, mantiene uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Procediendo adicionalmente, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera de anticuerpo unida covalentemente y una porción de la cadena pesada del anticuerpo denominada Fd. Los fragmentos Fd son el principal determinante de la especificidad del anticuerpo (un único fragmento Fd puede asociarse con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd mantienen la capacidad de unión al epítipo cuando están aislados.

En la porción de unión al antígeno de un anticuerpo, como es bien conocido en la materia, existen regiones determinantes de la complementariedad (RDC), que interactúan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones de estructura (FR), que mantienen la estructura terciaria del paratopo (véase, en general, Clark, 1986; Roitt, 1991). Tanto en el fragmento de cadena pesada Fd como en la cadena ligera de inmunoglobulinas IgG, existen cuatro regiones de estructura (FR1 a FR4) separadas respectivamente por las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3). Las RDC, y en particular las regiones CDR3, y más particularmente la CDR3 de cadena pesada son en gran medida responsables de la especificidad del anticuerpo.

Actualmente está bien establecido en la materia que las regiones que no son RDC de un anticuerpo de mamífero se puedan reemplazar con regiones similares de anticuerpos conoespecíficos o heteroespecíficos mientras se mantiene la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se manifiesta más claramente en el desarrollo y uso de anticuerpos "humanizados" en los que RCD no humanas se unen covalentemente a regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional.

La presente invención proporciona en ciertas realizaciones composiciones y métodos que incluyen formas humanizadas de anticuerpos. Como se utiliza en la presente memoria, "humanizado" describe anticuerpos en los que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones RDC se reemplazan con aminoácidos correspondientes derivados de moléculas de inmunoglobulina humana. Los métodos de humanización incluyen, entre otros, los descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 4.816.567, 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 5.859.205, a los que se hace referencia. Las patentes de Estados Unidos anteriores n.º 5.585.089 y 5.693.761, y el documento WO 90/07861 también proponen cuatro posibles criterios que pueden utilizarse en el diseño de los anticuerpos humanizados. La primera propuesta fue que, para un aceptor, utilizar una estructura de una inmunoglobulina humana particular que sea inusualmente homóloga con la inmunoglobulina donante a humanizar, o utilizar una estructura de consenso de muchos anticuerpos humanos. La segunda propuesta era que si un aminoácido en la estructura de la inmunoglobulina humana es inusual y el aminoácido del donante en esa posición es típico para secuencias humanas, entonces puede seleccionarse el aminoácido donante en lugar del aceptor. La tercera propuesta fue que en las posiciones inmediatamente adyacentes a las 3 RDCs en la cadena de inmunoglobulina humanizada, puede seleccionarse el aminoácido donante en lugar del aminoácido aceptor. La cuarta propuesta era utilizar el aminoácido donante que reside en las posiciones de estructura en el que se predijo que tiene un átomo de cadena lateral dentro de 3A de las RDCs en un modelo tridimensional del anticuerpo y se prevé que sea capaz de interactuar con las RDC. Los métodos anteriores son meramente ilustrativos de algunos de los métodos que un experto en la materia podría emplear para fabricar anticuerpos humanizados. Un experto en la materia estará familiarizado con otros métodos para la humanización de anticuerpos.

En una realización de las formas humanizadas de los anticuerpos, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones RDC se han reemplazado con aminoácidos de moléculas de inmunoglobulina humana, pero en los que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones RDC están sin alterar. Pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos son permisibles siempre que no se suprima la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno dado. Las moléculas de inmunoglobulina humana adecuadas incluirían moléculas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA y IgM. Un anticuerpo "humanizado" mantiene una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original. No obstante, el uso de ciertos métodos de humanización, la afinidad y/o especificidad de unión del anticuerpo puede aumentar utilizando métodos de "evolución dirigida",

como se describe por Wu *et al.*, I. *Mol. Biol.* 294:151, 1999, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia.

5 Los anticuerpos monoclonales completamente humanos también se pueden preparar mediante la inmunización de ratones transgénicos para grandes porciones de loci de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Véase, p. ej., las patentes de Estados Unidos n.º 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584, y las referencias citadas en la misma. Estos animales se han modificado genéticamente de tal forma que hay una delección funcional en la producción de anticuerpos endógenos (p. ej., murinos). Los animales se modifican adicionalmente para
10 contener la totalidad o una porción del locus del gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana tal que la inmunización de estos animales dará como resultado la producción de anticuerpos completamente humanos con respecto al antígeno de interés. Tras la inmunización de estos ratones (p. ej., ratones transgénicos (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), los anticuerpos monoclonales pueden prepararse de acuerdo con la tecnología de hibridomas convencional. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y por lo tanto no provocarán respuestas de anticuerpo anti-ratón humano (KAMA) cuando
15 se administran a seres humanos.

Los métodos *in vitro* también existen para producir anticuerpos humanos. Estos incluyen la tecnología de expresión en fagos (patentes de Estados Unidos n.º 5.565.332 y 5.573.905) y la estimulación *in vitro* de células B humanas (patentes de Estados Unidos n.º 5.229.275 y 5.567.610).

20 Así, como resultará evidente para un experto en la materia, la presente invención también proporciona fragmentos F(ab')₂ Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han reemplazado con secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos de fragmentos F(ab')₂ quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han reemplazado
25 con secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos de fragmentos Fab quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han reemplazado con secuencias humanas o no humanas homólogas; y anticuerpos de fragmentos Fd quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se han reemplazado con secuencias humanas o no humanas homólogas. La presente invención también incluye los denominados anticuerpos de cadena sencilla.

30 Las diversas moléculas y fragmentos de anticuerpos pueden derivarse de cualquiera de las clases de inmunoglobulina conocidas comúnmente, incluyendo, entre otros, IgA, IgA, IgE, IgG e IgM secretoras. Las subclases de IgG también son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, entre otros, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

35 En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo de dominio único. La expresión "anticuerpo de dominio único" (sdAb) o "VHH" se refiere a dominio variable de la cadena pesada sencilla de anticuerpos del tipo que puede encontrarse en los mamíferos camélidos que están naturalmente desprovistos de cadenas ligeras. Tal VHH también se llama "nanocuerpos®". De acuerdo con la invención, sdAb puede ser
40 particularmente sdAb de llama.

En otra realización, el agonista del receptor APJ es un aptámero.

45 Los aptámeros son una clase de moléculas que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con afinidad y especificidad altas. Tales ligandos pueden aislarse a través de la evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias al azar, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias aleatorias puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal,
50 modificado químicamente con el tiempo, de una secuencia única. Posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han analizado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo conformacionalmente restringido mostrada por una proteína de plataforma, tal como tiorredoxina A de *E. coli* que se selecciona de bibliotecas combinatorias por dos métodos híbridos (Colas *et al.*, 1996). Posteriormente, después de cultivar aptámeros dirigidos contra APJs como se ha descrito anteriormente, el
55 experto en la materia puede seleccionar con facilidad aquellos que promueven la función del receptor APJ.

En otra realización, el agonista del receptor APJ puede consistir en un polipéptido. Preferentemente, dicho polipéptido es la propia apelina. Más preferentemente, el polipéptido es un polipéptido apelina.

60 El término "apelina" tiene su significado general en la materia e incluye apelina de origen natural y variantes de función conservadora y formas modificadas de las mismas. La apelina puede proceder de cualquier fuente, pero normalmente es apelina de un mamífero (p. ej., primate humano y no humano), y más particularmente una apelina humana. La secuencia de la proteína de apelina y los ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas son bien conocidos por expertos en la materia. La apelina se sintetiza como precursor de 77 aminoácidos y se encuentra
65 como un dímero, estabilizado por puentes disulfuro (Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, Cheng R, George SR, O'Dowd BF. La modificación de los residuos terminales de apelina-13 antagoniza su acción hipotensora. *Endocrinology*.

Enero, 146(1):231-6. 2005). La pre-apelina se convierte por escisión proteolítica para producir diferentes fragmentos C-terminales, incluyendo apelina-36, apelina-17, apelina-13, y [Pyr¹]apelina-13 modificada post-traduccionalmente, todos son agonistas del receptor de apelina: APJ. La falta de residuos de cisteína en estos fragmentos C-terminales sugiere que los péptidos maduros son monoméricos. Se debe entender que, puesto que los expertos en la materia son conscientes de la secuencia de estas moléculas, cualquier proteína de apelina o variante de la secuencia génica se puede utilizar siempre que tenga las propiedades de una apelina.

"Variantes de función conservadora" son aquellas en las que un residuo de aminoácidos dado en una proteína o enzima se ha cambiado sin alterar la conformación global y la función del polipéptido, incluyendo, entre otros, el reemplazo de un aminoácido con uno que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácidos, básicas, hidrófobas, aromáticas y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína de modo que el porcentaje de proteínas o similitud de secuencia de aminoácidos entre dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, de 70 % a 99 % como se determina de acuerdo con un esquema de alineamiento, tal como mediante el método de agrupación, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante de función conservadora" también incluye un polipéptido que tiene una identidad de aminoácidos de al menos 60 % como se determina por los algoritmos BLAST o FASTA, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 85 %, e incluso más preferentemente al menos 90 %, y que tiene propiedades o funciones idénticas o sustancialmente similares que la proteína nativa o parental con la que se compara.

De acuerdo con la invención, el término polipéptido "apelina" se refiere a cualquier polipéptido que comprende el fragmento C-terminal de apelina-13. En consecuencia, el término abarca apelina por sí mismo o fragmentos de la misma que comprende fragmentos de apelina-17 o apelina-36.

En realizaciones específicas, se contempla que los polipéptidos apelina utilizados en los métodos terapéuticos de la presente invención pueden modificarse con el fin de mejorar su eficacia terapéutica. Tal modificación de compuestos terapéuticos se puede utilizar para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo de circulación, o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de los compuestos terapéuticos potencialmente importantes puede disminuirse significativamente por la combinación con una variedad de vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución.

Una estrategia para mejorar la viabilidad de fármacos es la utilización de polímeros solubles en agua. Se ha demostrado que varios polímeros solubles en agua modifican la biodistribución, mejoran el modo de captación celular, cambian la permeabilidad a través de barreras fisiológicas; y modifican el índice de depuración del cuerpo. Para lograr un direccionamiento o efecto de liberación sostenida, se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen restos de fármaco como grupos terminales, como parte de la estructura, o como grupos pendientes sobre la cadena polimérica.

El polietilenglicol (PEG) ha sido ampliamente utilizado como un portador de fármacos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. Se ha demostrado que la adhesión a diversos fármacos, proteínas, y liposomas mejora el tiempo de residencia y disminuye la toxicidad. PEG puede acoplarse a los agentes activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y a través de otros métodos químicos; no obstante, PEG en sí mismo está limitado a un máximo de dos agentes activos por molécula. En un enfoque diferente, los copolímeros de PEG y aminoácidos se exploraron como nuevos biomateriales que podrían mantener las propiedades de biocompatibilidad de PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de numerosos puntos de unión por molécula (proporcionando una mayor carga de fármaco), y que podrían ser sintéticamente diseñados para adaptarse a una variedad de aplicaciones.

Los expertos en la materia son conscientes de las técnicas de pegilación para la modificación efectiva de fármacos. Por ejemplo, los polímeros de administración de fármacos que consisten en polímeros de PEG y monómeros trifuncionales alternos, tales como lisina, se han utilizado por VectraMed (Plainsboro, N.J.). Las cadenas de PEG (normalmente 2.000 daltons o menos) se vinculan a los grupos amino α- y ε- de lisina a través de enlaces de uretano estables. Tales copolímeros mantienen las propiedades deseables de PEG, mientras proporciona grupos pendientes reactivos (los grupos ácido carboxílico de lisina) a intervalos estrictamente controlados y predeterminados a lo largo de la cadena polimérica. Los grupos pendientes reactivos pueden utilizarse para derivatización, reticulación, o conjugación con otras moléculas. Estos polímeros son útiles en la producción de profármacos estables de larga circulación variando el peso molecular del polímero, el peso molecular de los segmentos de PEG, y el enlace escindible entre el fármaco y el polímero. El peso molecular de los segmentos de PEG afecta al espacio del complejo del fármaco/grupo de vinculación y la cantidad de fármaco por peso molecular del conjugado (segmentos más pequeños de PEG proporcionan una mayor carga de fármaco). En general, el aumento del peso molecular global del conjugado del co-polímero en bloque aumentará la semivida circulatoria del conjugado. Sin embargo, el conjugado o ha de degradarse con facilidad o tener un peso molecular por debajo del umbral que limita la filtración glomerular (p. ej., menos de 45 kDa).

Además, la estructura polimérica es importante en el mantenimiento de la semivida circulatoria, y la biodistribución, pueden utilizarse enlazadores para mantener el agente terapéutico en una forma pro-fármaco hasta que sea liberado

desde la estructura polimérica por un desencadenante específico, normalmente la actividad enzimática en el tejido diana. Por ejemplo, este tipo de administración activada de fármacos en tejido resulta particularmente útil cuando se requiere la administración a un sitio específico de biodistribución y el agente terapéutico se libera en el sitio de patología o cerca del sitio de patología. Las bibliotecas del grupo de vinculación para su uso en la administración activada de fármacos son conocidos por los expertos en la materia y pueden basarse en la cinética enzimática, la prevalencia de enzima activa, y la especificidad de escisión de las enzimas específicas de la enfermedad seleccionada (véase, p. ej., las tecnologías establecidas por VectraMed, Plainsboro, N.J.). Tales enlazadores pueden utilizarse en la modificación de los polipéptidos apelina descritos en la presente memoria para la administración terapéutica.

De acuerdo con la invención, los polipéptidos apelina pueden producirse por métodos convencionales de síntesis peptídica automatizada o por expresión recombinante. Los principios generales para el diseño y la producción de proteínas son bien conocidos por los expertos en la materia.

Los polipéptidos de apelina de la invención pueden sintetizarse en solución o sobre un soporte sólido de acuerdo con las técnicas convencionales. Varios sintetizadores automáticos están disponibles comercialmente y pueden utilizarse de acuerdo con los protocolos conocidos, los polipéptidos apelina de la invención también pueden sintetizarse por tecnología de fase sólida que emplea un sintetizador de péptidos a modo de ejemplo, tal como un Model 433A de Applied Biosystems Inc. La pureza de cualquier proteína dada; generada a través de la síntesis peptídica automatizada o por medio de métodos recombinantes puede determinarse utilizando un análisis por HPLC en fase inversa. La autenticidad química de cada péptido se puede establecer por cualquier método bien conocido por los expertos en la materia.

Como alternativa a la síntesis peptídica automatizada, la tecnología de ADN recombinante puede emplearse en el cual una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de elección se inserta en un vector de expresión, se transforma o transfecta en una célula huésped apropiada y cultivada en condiciones adecuadas para la expresión como se describe en la presente memoria a continuación. Los métodos recombinantes resultan especialmente preferentes para producir polipéptidos más largos.

Una variedad de vectores de expresión/sistemas huésped puede utilizarse para contener y expresar la secuencia codificante de péptidos o proteínas. Estos incluyen, entre otros, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófago, vectores de expresión de ADN cósmido o plásmido recombinantes; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insectos infectados por vectores de expresión de virus (p. ej., baculovirus); sistemas de células vegetales transfectados por vectores de expresión de virus (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, VMC; virus del mosaico del tabaco, MT) o transformados con vectores de expresión bacteriana (p. ej., plásmido Ti o pBR322); o sistemas de células animales. Los expertos en la técnica son conscientes de las diversas técnicas para la optimización de la expresión de las proteínas de mamífero. Las células de mamífero que son útiles en producciones de proteínas recombinantes incluyen, entre otros, células VERO, células HeLa, estirpes celulares de ovario de hámster chino (CHO), células COS (tales como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293. Los protocolos ejemplares para la expresión recombinante de los sustratos peptídicos o polipéptidos de fusión en bacterias, levaduras y otros invertebrados son conocidos por los expertos en la materia y se describen brevemente en la presente memoria a continuación. Los sistemas huésped de mamífero para la expresión de proteínas recombinantes también son bien conocidos por los expertos en la materia. Las cepas de células huésped pueden elegirse por una capacidad particular para procesar la proteína expresada o producir ciertas modificaciones post-traduccionales que serán útiles para proporcionar la actividad de la proteína. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, entre otros, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento post-traduccionales que escinde una forma "prepro" de la proteína también puede ser importante para la inserción, plegado y/o función. Diferentes células huésped tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, y similares tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades post-traduccionales y pueden elegirse para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña introducida.

En la producción recombinante de los polipéptidos apelina de la invención, sería necesario emplear vectores que comprenden moléculas de polinucleótidos para codificar las proteínas derivadas de apelina. Los métodos de preparación de tales vectores, así como la producción de células huésped transformadas con tales vectores son bien conocidos por los expertos en la materia. Las moléculas de polinucleótidos utilizadas en tal esfuerzo se pueden unir a un vector, que incluye generalmente un marcador seleccionable y un origen de replicación, para la propagación en un huésped. Estos elementos de las construcciones de expresión son bien conocidos por los expertos en la materia. En general, los vectores de expresión incluyen ADN que codifica la proteína dada que se vincula operativamente a las secuencias reguladoras transcripcionales o traduccionales adecuadas, tales como las derivadas de un gen mamífero, microbiano, viral, o de insectos. Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, operadores, o potenciadores transcripcionales, sitios de unión a ARNm ribosomal, y secuencias apropiadas que controlan la transcripción y la traducción.

Las expresiones "vector de expresión", "construcción de expresión" o "casete de expresión" se utilizan indistintamente a lo largo de la presente memoria y tienen por objeto incluir cualquier tipo de construcción genética

que contiene un ácido nucleico que codifica un producto génico en el que parte o la totalidad de la secuencia codificante del ácido nucleico es capaz de ser transcrita.

5 La elección de un vector de expresión adecuado para la expresión de los péptidos o polipéptidos de la invención, dependerá, por supuesto, de la célula huésped específica que se utilice, y está dentro de la habilidad del experto en la materia. Los métodos para la construcción de vectores de expresión de mamíferos se describen, por ejemplo, en los documentos EP-A-0367566 y WO 91/18982.

10 En general, los vectores útiles en la invención incluyen, entre otros, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación del oligonucleótido antisentido, ARNip, ARNhp o secuencias de ácidos nucleicos de ribozima. Los vectores virales son un tipo preferente de vector e incluyen, entre otros, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus, tales como virus de la leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del tumor mamario murino, virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adeno-asociados; virus de tipo SV40; virus del poliomia; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus de la vacuna; virus de la poliomieltis; y virus de ARN, tal como un retrovirus. Uno puede emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la materia.

20 Los vectores virales preferentes se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que genes no esenciales se han reemplazados con el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (p. ej., lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa de ARN viral genómico en ADN con integración proviral subsiguiente en ADN celular del huésped. Los retrovirus han sido aprobados para pruebas experimentales de terapia génica humana. Los más útiles son aquellos retrovirus que son deficientes en replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retroviral genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes *in vivo*. Los protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes en replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una célula de empaquetamiento alineada con el plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la estirpe celular de empaquetamiento, recogida de las partículas virales de medios de cultivo de tejidos, e infección de las células diana con partículas virales) son bien conocidos en la materia.

30 Los virus preferentes para ciertas aplicaciones son los adenovirus y virus adeno-asociados (VAA), que son virus de ADN bicatenario que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica. Actualmente, se conocen 12 serotipos diferentes de VAA (AAV1 a 12), cada uno con diferentes tropismos tisulares. El AAV recombinante se deriva del AAV2 parvovirus dependiente. El virus adeno-asociado de tipo 1 a 12 puede modificarse por ingeniería genética para ser deficiente en replicación y es capaz de infectar una amplia gama de tipos de células y especies. Tiene además ventajas tales como, el calor y la estabilidad del disolvente lipídico; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hemopoyéticas; y falta de inhibición de la superinfección permitiendo así múltiples series de transducciones. Aparentemente, el virus adeno-asociado puede integrarse en ADN celular humano de una manera específica del sitio, minimizando de este modo la posibilidad de mutagénesis por inserción y la variabilidad de la expresión del gen insertado característica de la infección retroviral. Además, las infecciones por virus adeno-asociados de tipo silvestre se han seguido en el cultivo de tejidos durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adeno-asociado es un evento relativamente estable. El virus adeno-asociado también puede funcionar de manera extracromosómica.

45 Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito ampliamente en la materia y son bien conocidos por los expertos en la materia. En los últimos años, los vectores plasmídicos se han utilizado como vacunas de ADN para la administración de genes que codifican antígenos a las células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para esto porque no tienen los mismos problemas de seguridad como ocurre con muchos de los vectores virales. Estos plásmidos, no obstante, que tienen un promotor compatible con la célula huésped, pueden expresar un péptido a partir de un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos plásmidos utilizados comúnmente incluyen pBR322, pUC 18, pUC19, pRC/CMV, SV40, y pBlueScript. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos en la materia. Adicionalmente, los plásmidos pueden diseñarse a medida utilizando enzimas de restricción y reacciones de ligamiento para retirar y añadir fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos se pueden administrar mediante una variedad de vías parenteral, mucosal y tópica. Por ejemplo, el ADN plásmido puede inyectarse por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea, o por otras vías. También se puede administrar mediante pulverizadores o gotas intranasales, por supositorio rectal y por vía oral. También se puede administrar en la epidermis o en una superficie mucosa utilizando una pistola génica. Los plásmidos pueden administrarse en una solución acuosa, secarse sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de ADN incluyendo, entre otros, liposomas, dendrímeros, cocleato y microencapsulación.

60 La expresión requiere que se proporcionen señales apropiadas en los vectores, tales como potenciadores/promotores de fuentes tanto virales como de mamíferos que pueden utilizarse para estimular la expresión de los ácidos nucleicos de interés en células huésped. Por lo general, el ácido nucleico que se expresa está bajo control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen. Las secuencias de nucleótidos se vinculan operativamente cuando la secuencia reguladora se relaciona

funcionalmente con el ADN que codifica la proteína de interés (es decir, apelina, una variante y similares). De este modo, una secuencia de nucleótidos promotora se vincula operativamente a una secuencia de ADN dada si la secuencia de nucleótidos promotora dirige la transcripción de la secuencia.

5 De manera similar, la expresión "bajo el control transcripcional" significa que el promotor se encuentra en la ubicación y orientación correctas en relación al ácido nucleico para controlar el inicio de la ARN polimerasa y la expresión del gen. Cualquier promotor que estimulará la expresión del ácido nucleico puede utilizarse. No se cree que el promotor particular empleado para controlar la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés sea importante, mientras sea capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico en la célula diana. Así, cuando se orienta selectivamente una célula humana, es preferible posicionar la región codificante de ácido nucleico adyacente al control y bajo el control de un promotor que es capaz de expresarse en una célula humana. En términos generales, un promotor de este tipo podría incluir un promotor humano o viral. Los promotores comunes incluyen, p. ej., el promotor del gen temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) humano, el promotor temprano de SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, [beta]-actina, el promotor de insulina de rata, el promotor de fosfoglicerol quinasa y el promotor gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, todos los cuales son promotores bien conocidos y fácilmente disponibles para los expertos en la materia, pueden utilizarse para obtener la expresión de alto nivel de la secuencia codificante de interés. El uso de otros promotores del fago celular o bacteriano virales o de mamíferos que son bien conocidos en la materia para conseguir la expresión de una secuencia codificante de interés se contempla también, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para producir un rendimiento recuperable de la proteína de interés. Mediante el empleo de un promotor con propiedades bien conocidas, el nivel y patrón de expresión de la proteína de interés después de la transfección o la transformación pueden optimizarse. Los promotores inducibles también pueden utilizarse.

Otro elemento regulador que se utiliza en la expresión de proteínas es un potenciador. Estos son elementos genéticos que aumentan la transcripción desde un promotor ubicado en una posición distante en la misma molécula de ADN. Cuando una construcción de expresión emplea un inserto de ADNc, se deseará normalmente incluir una secuencia señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación apropiada del transcrito del gen. Cualquier secuencia señal de poliadenilación reconocida por las células de las especies de animales transgénicos seleccionados es adecuada para la práctica de la invención, tal como la hormona del crecimiento humana o bovina y las señales de poliadenilación de SV40.

Otros polipéptidos que pueden utilizarse como agonistas del receptor APJ incluyen los descritos en el documento US 6.492.324, en el documento US 7.635.751, en el documento US 2010221255 o en el documento US 2008182779.

35 En otra realización, la invención se refiere a apelinomiméticos para su uso en el tratamiento o la prevención de la sarcopenia.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "apelinomiméticos" denota moléculas que son funcionalmente equivalentes a apelina, es decir, moléculas que tienen al menos una de las actividades biológicas de la apelina, tales como, por ejemplo, el efecto hipotensor de apelina o glucosa en plasma que reduce la apelina. En otras palabras, "apelinomiméticos" denotan moléculas capaces de imitar/reproducir los efectos de la apelina.

Las actividades de los apelinomiméticos pueden determinarse por cualquier método bien conocido en la materia. Por ejemplo, la capacidad de una molécula para ser un apelinomimético se puede medir por la capacidad para disminuir la presión arterial, así como la glucosa en sangre similar a apelina. La capacidad para disminuir la presión arterial/glucosa de los apelinomiméticos de la invención resultará aparente para el experto mediante la implementación de un simple ensayo para evaluar la disminución de la presión arterial/glucosa debido a los apelinomiméticos.

50 En otro ejemplo, los apelinomiméticos evaluarán la capacidad de los inhibidores de apelina para bloquear sus efectos reductores en la presión arterial y/o glucosa en sangre.

Un objetivo adicional de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un agonista del receptor APJ o un apelinomimético para su uso en el tratamiento o la prevención de la sarcopenia.

55 Normalmente, el agonista del receptor APJ o el apelinomimético puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente con matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

60 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un material de relleno sólido, semi-sólido o líquido no tóxico, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

65 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea,

- intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y a seres humanos. Las formas de administración unitaria apropiadas comprenden formas por vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones orales o soluciones,
- 5 formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.
- Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser, en particular, soluciones salinas estériles, isotónicas, (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de tales sales), composiciones secas o especialmente liofilizadas que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o de solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.
- 10
- 15 Las formas farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma ha de ser estéril y ha de ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Ha de ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y ha de preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.
- 20
- Las soluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.
- 25
- El agonista del receptor APJ o el apelinomimético puede formularse en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.
- 30
- 35 El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por varios agentes antibacterianos y anti-fúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- 40
- 45 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada por esterilización del mismo.
- 50
- 55 Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, aunque también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares.
- 60
- 65 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido hacerse primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la materia a tenor de la presente divulgación. Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

Además de los compuestos de la invención formulados para la administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p. ej., comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma actualmente en uso.

5 En otro objetivo particular, el agonista del receptor APJ es la apelina.

10 Como se utiliza en la presente memoria, el término "tratar" o "tratamiento", significa revertir, aliviar, inhibir el progreso, o prevenir el trastorno o afección al que se aplica tal término, o invertir, aliviar, inhibir el progreso, o prevenir uno o más síntomas del trastorno o afección al que se aplica tal término.

Método de predicción de la sarcopenia

15 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método *ex vivo* de predicción de la capacidad de un paciente afectado por sarcopenia, que comprende la etapa que consiste en detectar la expresión de apelina en una muestra obtenida de dicho paciente.

20 Normalmente, la muestra de acuerdo con la invención puede ser una muestra de sangre, plasma, suero, linfa, biopsia u orina.

El término "detectar", como se utiliza anteriormente, incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia a un control. Normalmente, la expresión de apelina se puede medir, por ejemplo, por RT-PCR o inmunohistoquímica realizada sobre la muestra.

25 El "control" puede ser un sujeto sano, es decir, un sujeto que no padece sarcopenia. El control también puede ser un sujeto que padece sarcopenia. Preferentemente, dicho control es un sujeto sano.

30 La detección de la expresión de apelina en la muestra también se puede realizar mediante la medición del nivel de proteína apelina. En la presente solicitud, el "nivel de proteína apelina" significa la cantidad o concentración de dicha proteína apelina.

35 Tales métodos comprenden poner en contacto una muestra con un miembro de unión capaz de interactuar selectivamente con la proteína apelina presente en la muestra. El miembro de unión es generalmente un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal.

40 La presencia de la proteína se puede detectar utilizando técnicas convencionales de diagnóstico electroforéticas e inmunodiagnóstico, incluyendo inmunoensayos tales como competición, reacción directa, o ensayos de tipo sándwich. Tales ensayos incluyen, entre otros, transferencia Western; ensayos de aglutinación; inmunoensayos mediados y etiquetados con enzima, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunolectroforesis; inmunoprecipitación, etc. Las reacciones incluyen generalmente etiquetas reveladoras, tales como etiquetas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas, enzimáticas o moléculas colorantes u otros métodos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos reaccionados con los mismos.

45 Las pruebas mencionadas anteriormente implican generalmente la separación de la proteína no unida en una fase líquida de un soporte en fase sólida a la que se unen los complejos antígeno-anticuerpo. Los soportes sólidos que pueden utilizarse en la práctica de la invención incluyen sustratos, tales como nitrocelulosa (p. ej., en la membrana o forma de pocillo de microtitulación); cloruro de polivinilo (p. ej., láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (p. ej., perlas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilideno; papel diazotado; membranas de nylon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles, y similares.

50 Más particularmente, se puede utilizar un método de ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación se revisten con un conjunto de anticuerpos contra las proteínas que se van a someter a ensayo. Entonces se añade una muestra que contiene o se sospecha que contiene la proteína marcadora a los pocillos recubiertos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, la placa o placas pueden lavarse para eliminar restos no unidos y se añade una molécula de unión secundaria etiquetada de forma detectable. Se deja que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora de muestra capturada, la placa se lava y la presencia de la molécula de unión secundaria se detecta utilizando métodos bien conocidos en la materia.

60 Un método preferente utiliza la inmunohistoquímica, un método de tinción basado en reacciones inmunoenzimáticas utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales para detectar células o proteínas específicas, tales como antígenos tisulares. Normalmente, los protocolos de inmunohistoquímica implican al menos algunas de las siguientes etapas:

65 1) recuperación de antígeno (p. ej., por cocción a presión, tratamiento con proteasas, microondas, calefacción en

tampones apropiados, etc.);

2) aplicación de anticuerpo primario (es decir, anticuerpo de proteína anti-apelina) y lavado;

3) aplicación de un anticuerpo secundario etiquetado que se une al anticuerpo primario (a menudo un segundo conjugado de anticuerpo que permite la detección en la etapa 5) y lavado;

5 4) se puede incluir una etapa de amplificación;

5) aplicación de un reactivo de detección (p. ej., cromógeno, molécula etiquetada con fluorescencia o cualquier molécula que tiene un intervalo dinámico adecuado para alcanzar el nivel o la sensibilidad requerida para la prueba);

6) se puede utilizar contratinción y

10 7) detección utilizando un sistema de detección que hace que la presencia de las proteínas sea visible (al ojo humano o a un sistema de análisis automatizado), para análisis cualitativos o cuantitativos.

Varios métodos de tinción inmunoenzimática son conocidos en la materia para detectar una proteína de interés. Por ejemplo, las interacciones inmunoenzimáticas se pueden visualizar utilizando diferentes enzimas, tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina, o diferentes cromógenos, tales como DAB, AEC, o Fast Red; o etiquetas fluorescentes, tales como FITC, Cy3, Cy5, Cy7, Alexafluors, etc. Las contratinciones pueden incluir H&E, DAPI, Hoechst, siempre que tales tinciones sean compatibles con otros reactivos de detección y la estrategia de visualización utilizada. Como se conoce en la materia, los reactivos de amplificación se pueden utilizar para intensificar la señal de la tinción. Por ejemplo, se pueden utilizar reactivos tiramida. Los métodos de tinción de la presente invención pueden llevarse a cabo utilizando cualquier método o sistema adecuado, tal como sería aparente para un experto en la materia, incluyendo sistemas automatizados, semi-automatizados o manuales.

El método de la invención puede comprender una etapa adicional que consiste en comparar el nivel de expresión de apelina con un valor umbral.

Normalmente, un "valor umbral" o "valor de corte" puede determinarse experimentalmente, empíricamente, o teóricamente. Un valor umbral también se puede seleccionar arbitrariamente en base a las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocería un experto en la materia. Preferentemente, el experto en la materia puede comparar el nivel de expresión de apelina obtenido de acuerdo con el método de la invención con un valor umbral definido.

Preferentemente, dicho valor umbral es el nivel de expresión de apelina medio de una población de individuos sanos, preferentemente de individuos conocidos por sanos, es decir, que no están en una situación crítica, y preferentemente que no padecen sarcopenia.

Normalmente, el experto en la materia puede determinar el nivel de expresión de apelina en una muestra biológica de una muestra estadística de la población de individuos conocidos por sanos, preferentemente de 100 individuos sanos. Se determina el valor medio de los niveles obtenidos a continuación, de acuerdo con el análisis estadístico bien conocido, a fin de obtener el nivel medio de expresión de apelina. Dicho valor se considera entonces como normal y por lo tanto constituye un valor umbral.

Al comparar el nivel de expresión de apelina con este valor umbral, el médico es capaz de predecir la sarcopenia. En consecuencia, el médico será capaz de adaptar y optimizar la atención médica apropiada de un sujeto en una condición crítica y potencialmente mortal que padece sarcopenia. La determinación de dicha predicción es muy apropiada para la atención de seguimiento y la toma de decisiones clínicas.

Por lo tanto, la invención se refiere a un método para predecir la capacidad de un paciente que va a ser afectado por sarcopenia, dicho método comprende las siguientes etapas:

a) determinar el nivel de expresión de apelina en una muestra biológica de dicho sujeto;

b) determinar el nivel medio de expresión de apelina en una muestra biológica de una población de individuos sanos, preferentemente de 100 individuos sanos; y

c) una etapa de comparación de la relación obtenida en a) con la relación obtenida en b).

La presente divulgación también se refiere a kits para la predicción de sarcopenia, que comprende medios para detectar la expresión de apelina.

De acuerdo con la divulgación, los kits pueden comprender un anticuerpo de proteína anti-apelina; y otra molécula acoplada con un sistema de señalización que se une a dicho anticuerpo de proteína apelina.

Normalmente, los anticuerpos o la combinación de anticuerpos están en forma de soluciones listas para su uso. En una realización, el kit comprende recipientes con las soluciones listas para su uso. Cualquier otra forma se abarca por la presente divulgación y el experto en la materia puede adaptar de forma rutinaria la forma para el uso en inmunohistoquímica.

La presente divulgación también se refiere a apelina como un biomarcador para la sarcopenia.

La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. No obstante, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

Descripción de las figuras

5 **Figura 1 A y B: Consecuencias de un tratamiento crónico con apelina sobre la expresión de genes musculares.**

Los ratones se trataron o no con apelina (0,1 $\mu\text{mol/kg/día}$) o con TFS (control) durante 28 días. Después de la eutanasia, cada músculo se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. La expresión de ARNm se cuantificó como se describe en Material y métodos.

10 **Figura 2: Expresión de ARNm muscular de factores implicados en la miogénesis en ratones tratados con apelina TS o CMV-KO de 80 semanas.**

Después de 80 semanas, los ratones se eutanasiaron y el músculo cuádriceps se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. La expresión de ARNm se cuantificó como se describe en Material y métodos.

15 **Figura 3: Variación de apelina en plasma en individuos sarcopénicos.**

20 **Figura 4: Efecto del tratamiento crónico con apelina en la partición de palmitato en el músculo de ratones resistentes a la insulina.**

A: niveles de TG y DAG en los homogeneizados del músculo de ratones tratados con TFS (n = 7) y tratados con apelina (n = 8). Los resultados son medias \pm EEM. B: Medida de la incorporación de [^{14}C]palmitato en TG en el músculo de ratones tratados con TFS (n = 11) y tratados con apelina (n = 12). Los resultados son medias \pm EEM. C: OAG completa (izquierda) e incompleta (derecha) medida como se describe en el diseño y métodos de investigación. Los resultados son medias \pm EEM de ratones tratados con TFS (n = 11) y tratados con apelina (n = 9). ** P <0,01.

25 **Figura 5: El tratamiento crónico de apelina en ratones DRG aumentó las capacidades oxidativas mitocondriales y la biogénesis en el músculo.**

30 A: la respiración del estado 2 y estado 3 se midió en fibras permeabilizadas recientes preparadas a partir de músculo esquelético sóleo de ratones tratados con TFS (n = 7) y tratados con apelina (n = 7) como se describe en el diseño y métodos de investigación. B: transferencia Western representativa de los diferentes complejos mitocondriales (izquierda) y cuantificación (derecha) en ratones tratados con TFS (n = 6) y tratados con apelina (n = 7). Los resultados son medias \pm EEM. * P <0,05. C: Expresión de genes en el músculo sóleo de ratones tratados con TFS (n = 5) y tratados con apelina (n = 5). Los resultados son medias \pm EEM. * P <0,05. D: cantidad de ADNmt calculada como la relación de los niveles de ADN de COX1 a ciclofilina A determinados por PCR en tiempo real en el sóleo de ratones tratados con TFS (n = 4) y tratados con apelina (n = 4). ** P <0,01. Imágenes por microscopía electrónica de transmisión en aumentos de x6.000 y x25.000 en las mitocondrias SS e IMF (izquierda): E. Cuantificación del número de mitocondrias en relación con el área de la sección (análisis de tres imágenes para cada ratón) del sóleo de ratones tratados con TFS (n = 4) y tratados con apelina (n = 5) (derecha).

35 **Figura 6: Los efectos de apelina en OAG y la biogénesis mitocondrial en el músculo son dependientes de la activación de AMPK.**

40 A: expresión de la proteína fosfo-AMPK y fosfo-ACC después del tratamiento con TFS (n = 3) o apelina (n = 4) en el músculo de los ratones resistentes a la insulina. El gráfico muestra los datos cuantificados (n = 4). B: concentración de malonil-CoA en el músculo sóleo de ratones tratados con TFS (n = 6) o tratados con apelina (n = 6). C: OAG total se midió como se describe en el diseño y métodos de investigación en ratones TS y AMPK-DN tratados con TFS y con apelina DRG. Los resultados son medias \pm EEM; n = 4 en cada grupo. D: cantidad de ADNmt calculado como la relación de los niveles de ADN de COX1 a ciclofilina A determinados por PCR en tiempo real en el sóleo de los diferentes ratones; n = 4 en cada grupo. E: expresión de genes en el músculo sóleo de ratones TS y AMPK-DN tratados con TFS y con apelina. Los resultados son medias \pm EEM; n = 4 en cada grupo. * P <0,05. ** P <0,01.

45 **Figura 7: Efecto del tratamiento crónico con apelina en el músculo de los ratones resistentes a la insulina en niveles de acilcarnitina y la captación de glucosa estimulada por insulina.**

50 A: los niveles de acilcarnitina de especies de cadena larga se midieron en ratones alimentados con DN (n = 5) y en ratones alimentados con DRG tratados con apelina (n = 8) o con TFS (n = 7). Los resultados son medias \pm EEM. * P <0,05. B: captación de glucosa inducida por insulina en el músculo sóleo de ratones tratados con TFS (n = 7) y tratados con apelina (n = 6). Los resultados son medias \pm EEM. * P <0,05, ** P <0,01. 2-DG, 2- desoxiglucosa; Prot, proteína.

Ejemplos

Ejemplo 1:

5 **Material y métodos**

Animales.

10 Los ratones se trataron de acuerdo con los principios y las directrices establecidos por el Instituto Nacional de Investigación Médica (INSERM). Los ratones de tipo silvestre C57B16/J se obtuvieron de Harlan (Gannat, Francia). Los ratones CMV-KO con apelina se obtuvieron de Genoway (Lyon, Francia). Los ratones se alojaron convencionalmente en un cuarto para animales a una temperatura (20-22 °C) y humedad (50-60 %) constantes con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas (luces encendidas a las 8:00 de la mañana) y acceso libre a comida y agua. Los ratones se alimentaron con un alimento balanceado comercial para roedores desde el destete hasta 10 semanas de edad y luego se mantuvieron con un alimento balanceado comercial para roedores (Research Diet, NJ).

Tratamiento con apelina.

20 El tratamiento con apelina estaba procesándose a ratones de 31 semanas de edad a 35 semanas de edad. A los ratones se les inyectó diariamente una inyección intraperitoneal de apelina (0,1 µmol/kg/día) como se ha descrito previamente (Higuchi *et al* 2005; Yue *et al* 2010) durante 28 días. A los ratones de control de la misma edad se les inyectó TFS durante el mismo periodo. Todos los ratones fueron sacrificados 24 horas después de la última inyección ip de apelina en un estado alimentado. Las concentraciones de apelina en plasma, medidas después de un bolo de apelina ip (0,1 µmol/kg), aumentaron algo más de 2,5 veces 10 min después de la inyección.

25 PCR en tiempo real.

30 ARN totales (1 mg) se aislaron de los músculos utilizando el kit de purificación de ARN GeneJET (Fermentas, EE.UU.). Los ARN totales se transcribieron de forma inversa utilizando hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, R.U.). PCR en tiempo real se realizó como se ha descrito previamente (Boucher *et al.* 2005).

Resultados

35 I. Tratamiento con apelina

1°) *Miostatina*

Tabla 1: cuantificación del marcador de miostatina en ratones tratados con apelina

	Tratados con TFS					Tratados con apelina				
Cuád	1510,00	412,20	130,80	732,50	584,90	218,300	381,700	90,100	263,400	268,00
Media	674,080					244,300				
EEM	231,7178					47,04195				
Gas	1115,40	1465,30	2108,70	1190,50	2291,40	1058,400	606,000	1287,900	1009,300	1208,40
Media	1634,260					1034,000				
EEM	239,9596					118,1673				
ELD	222,40	139,00	314,00	660,90	188,00	137,800	114,600	94,600	92,900	133,40
Media	304,860					114,660				
EEM	93,49157					9,38763				

40 2°) *Miogenina*

Tabla 2: cuantificación del marcador de miogenina en ratones tratados con apelina

	Tratados con TFS					Tratados con apelina				
Cuád	7,0	18,8	6,0	19,8		40,7	30,2	29,2	29,5	45,7
Media	12,900					35,060				
EEM	3,7063					3,419737				
Gas	16,6	21,3	23,1	25,3		30,6	19,6	20,2	19,6	26,8
Media	21,575					23,360				
SEM	1,849042					2,263979				
ELD	15,0	8,2	16,1	11,9		24,1	11,3	16,1	9,4	10,5

Media	12,800	14,280
EEM	1,772475	2,708579

3°) MyoD

Tabla 3: cuantificación del marcador MyoD en ratones tratados con apelina

	Tratados con TFS				Tratados con apelina				
Cuád	53,4	127,6	52,6	36,5	565,9	202,2	293,8	293,0	285,9
Media	67,525				328,160				
EEM	20,39981				61,88255				
Gas	142,4	137,8	163,1	198,9	228,1	222,0	202,9	219,9	238,6
Media	160,550				222,300				
EEM	13,91704				5,837553				
ELD	128,4	90,6	136,8	88,8	220,9	230,7	79,3	92,1	89,6
Media	111,150				142,520				
EEM	12,5077				34,10176				

5 4°) Myf5

Tabla 4: cuantificación del marcador Myf5 en ratones tratados con apelina.

	Tratados con TFS				Tratados con apelina				
Cuád	3,7	5,1	2,6	1,1	7,5	8,7	3,7	5,2	4,0
Media	3,125				5,820				
EEM	0,8469307				0,9825477				
Gas	6,5	4,6	2,8	3,7	6,1	5,6	5,0	5,9	4,1
Media	4,400				5,340				
EEM	0,7905694				0,3613862				
ELD	0,2	0,1	0,1	0,1	1,3	0,2	3,3	0,1	1,1
Media	0,125				1,200				
EEM	0,025				0,5761944				

II. CMV-KO con apelina

10

Tabla 5: cuantificación de marcadores en ratones KO con apelina

	CMV-KO de 80 semanas con ape				TS de 80 semanas			
Miostatina	35,9000	58,7300	91,57		72,1400	43,6300	25,20	
Media	62,07				46,99			
EEM	27,98				23,65			
Miogenina	15,5500	15,6000	7,83		12,5600	22,3500	25,22	
Media	12,99				20,04			
EEM	4,472				6,638			
MyoD	429,3500	330,4800	493,22		208,7100	584,6100	468,17	
Media	417,7				420,5			
EEM	81,99				192,4			
Myf5	1,6200	1,7500	1,44		1,4600	3,8500	3,46	
Media	1,603				2,923			
EEM	0,1557				1,282			

Conclusión

- 15 Las figuras 1A y B demuestran claramente que el tratamiento con apelina aumentó la expresión de marcadores miogénicos como miogenina, MyoD y Myf5 en los músculos del cuádriceps de ratones de edad moderada. Al mismo tiempo, este tratamiento de 28 días también fue capaz de disminuir la expresión de miostatina en estos músculos confirmando un papel benéfico de apelina en la miogénesis.
- 20 La figura 2 muestra que la delección de apelina en un ratón (APL-CMVKO) promueve una disminución de los marcadores miogénicos (miogenina y Myf5) en el cuádriceps de ratones acompañado por un ligero aumento de la miostatina, un marcador de la sarcopenia en el músculo (véase Kate T. Murphy, René Koopman, Timur Naim,

Bertrand Léger, Jennifer Trieu, Chikwendu Ibebunjo, y Gordon S. Lynch. *Antibody-directed myostatin inhibition in 21-month-old mice reveals novel roles for myostatin signaling in skeletal muscle structure and function. The FASEB Journal* 0892-6638/10/0024-4433).

- 5 Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que la apelina está involucrada en los procesos miogénicos y podría ser una diana potencial para combatir las disfunciones asociadas al envejecimiento.

Ejemplo 2:

10 Material y métodos

La apelina se ha medido en el ensayo simple ciego con el kit de ELISA comercial (Pheonix Pharmaceutical Inc., EE.UU.) en el plasma de los individuos de edad avanzada con diagnóstico de sarcopenia de acuerdo con el índice de Newman (n = 30) o de individuos de edad avanzada sanos (n = 30). Este índice tiene en cuenta la masa muscular apendicular y la masa grasa. Cuatro cuartiles de los individuos se han hecho de acuerdo con su índice de Newman y cuartiles extremos se han seleccionado para determinar el estado sarcopénico o no sarcopénico.

Resultados y discusión

20 La Figura 3 muestra que los niveles de apelina en plasma se redujeron significativamente en los individuos sarcopénicos (humanos). Esta disminución no se correlaciona con el índice de masa corporal o la insulina lo que sugiere que el nivel de apelina en plasma podría considerarse como un fuerte biomarcador de enfermedades musculares asociadas a la edad.

25 Ejemplo 3: Efecto de apelina sobre el metabolismo muscular

Material y métodos

Los ratones se trataron de acuerdo con los principios y las directrices establecidos por el INSERM. Los ratones de tipo silvestre (TS) C57B16/J se obtuvieron de Harlan (Gannat, Francia). Los ratones con AMPK inactiva específica del músculo (ratones AMPK-DN) fueron proporcionados por el Prof. Moris J. Birnbaum (Howard Hughes Medical Institute, Universidad de Pensilvania, Filadelfia, PA). Los ratones deficientes de apelina (apelina-/-) fueron generados como se ha descrito previamente (10) y retrocruzados a ratones C57B16/J > 10 veces. Los ratones se alojaron convencionalmente en un cuarto para animales a una temperatura (20-22 °C) y humedad (50-60 %) constantes con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h (luces encendidas a las 7:00 de la mañana) y acceso libre a comida y agua. Los ratones C57B16/J y AMPK-DN se alimentaron con una DN desde el destete hasta 10 semanas de edad y luego se mantuvieron con DN (grupo de control) o se alimentaron con una DRG que contiene 20 % de proteínas, 35 % de carbohidratos, y 45 % de grasas (Research Diets, New Brunswick, NJ). El tratamiento con apelina comenzó después de la aparición de la resistencia a la insulina en los machos de 23 semanas. A los ratones se les inyectó diariamente apelina-13 (Phoenix Biotech) a 0,1 µmol/kg/día ip como se ha descrito previamente (7) durante 28 días. A ratones de control de la misma edad se les inyectó TFS durante el mismo período. Los ratones convencionales también se trataron con un antagonista específico del receptor APJ (F13A) (Phoenix Biotech) (11) a 0,2 µmol/kg/día durante 28 días o con la combinación de apelina y F13A. Todos los ratones se sacrificaron 24 h después de la última inyección de apelina en un estado alimentado. Las concentraciones de apelina en plasma, medidas después de un bolo de apelina (0,1 µmol/kg ip) en ratones con DRG, se incrementaron > 2,4 veces 10 min después de la inyección (4,12 ± 0,96 vs. 1,73 ± 0,24 ng/ml antes de la inyección, n = 5), pero las concentraciones de apelina en plasma no fueron diferentes entre ratones tratados con TFS y con apelina al final del tratamiento.

Medidas en plasma.

50 Los ácidos grasos (AGs) en plasma y TGs medidos mediante la técnica colorimétrica con el kit Wako NEFA (Wako Chemicals) y el kit de PAP 150 (bioMerieux), respectivamente, así como la leptina en plasma, la adiponectina (Quantikine; R&D Systems), y la apelina (Phoenix Pharmaceuticals, Inc.), se determinaron en el estado alimentado al final del tratamiento. La insulinemia (Mercodia, Uppsala, Suecia) y la glucemia medida con un glucómetro (Accu-check; Roche Diagnostics) se determinaron en el estado de ayuno en sangre de la vena de la cola.

Oxidación y esterificación de palmitato.

60 Se determinó la oxidación de palmitato como se ha descrito previamente en el músculo sóleo entero o en los tejidos adiposos (12). Los tejidos se incubaron en tampón de Krebs-Henseleit modificado que contiene ASB al 1,5 % libre de AG, 5 mmol/l de glucosa, 1 mmol/l de palmitato, y 0,5 µCi/ml de [14C]palmitato (PerkinElmer) durante 60 min. Al final de la incubación, los tejidos se extirparon y se homogeneizaron en 800 µl de tampón de lisis. La oxidación completa se determinó mediante la acidificación del tampón de incubación con 1 ml de 1 mol/l de H2SO4, y el 14CO2 fue atrapado por hidróxido de bencetonio (Sigma-Aldrich) colocado en un microtubo de 0,5 ml en un vial de vidrio sellado. Después de 120 min, el microtubo se retiró y se colocó en un vial de centelleo, y la radiactividad se contó (Cytoscint; MP Biomedicals). Un total de 500 µl de homogeneizado se colocaron en tubos de vidrio para

extraer lípidos con cloroformo-metanol (2:1) y 2 mol/l de KCl-HCl. Después de la centrifugación, la fase acuosa (500 µl) se cuantificó por centelleo líquido para determinar la producción de metabolitos solubles en ácido (oxidación incompleta) y la fase orgánica (200 µl) se utilizó para medir la esterificación de palmitato como ha descrito previamente (12).

5

Medición del consumo de O₂ en las mitocondrias.

El consumo de O₂ se midió en fibras permeabilizadas recientes preparadas a partir de músculo sóleo utilizando un respirómetro (Oxygraph-2k; OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Austria) como se ha descrito previamente (13,14). En primer lugar, se inyectó una mezcla de 20 mmol/l de glutamato por 4 mmol/l de malato para evaluar la actividad del complejo I (gmState2). El complejo I se bloqueó después mediante la adición de 5 µmol/l de rotenona. Después de esto, se añadieron 10 mmol/l de succinato para acceder a la actividad del complejo II (sState 2). Se obtuvo el estado 3 de respiración después de una adición adicional de 10 mmol/l de ADP. El consumo de O₂ para cada estado se calculó utilizando el software DataGraph.

15

Microscopio de transmisión por electrones.

El músculo sóleo se cortó en pedazos pequeños y se fijó como se ha notificado previamente (15). A continuación, se cortó el tejido y se montó sobre rejillas de cobre y se observó con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi HU 12A equipado con una cámara de alta resolución. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software Lucia G.

20

Análisis de ADN mitocondrial.

El ADN total se extrajo a partir del músculo sóleo utilizando un kit comercial (DNeasy; QIAGEN). El contenido de ADN mitocondrial (mt) se calculó utilizando PCR cuantitativa en tiempo real mediante la medición de la relación de ciclo de umbral de un gen codificado mitocondrial (COX1) y un gen codificado nuclear (ciclofilina A) como se ha descrito previamente (15).

25

Determinación de acilcarnitinas, diacilglicerol en el músculo esquelético y los niveles de acilcarnitinas TG.

Parte del homogeneizado de músculo (20 µl) se descubrió en membranas de filtro (tarjetas almacenadoras de proteínas 903; Whatman). Las manchas secas se trataron a continuación como se notificó (17). En resumen, las acilcarnitinas se derivatizaron mediante la adición de HCl butanólico y se trataron con los reactivos del kit NeoGram MSMS-AAAC (PerkinElmer). La carnitina y las acilcarnitinas libres se cuantificaron mediante espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida. Los datos se adquirieron utilizando un espectrómetro API Micromass Quattro Micro equipado con un módulo de cromatografía líquida de alto rendimiento 2795 y un sistema de datos controlado por el sistema operativo MassLynx 4.1 (Waters, Milford, MA).

35

Lípidos neutros (diacilglicerol y TG).

Los músculos (5-10 mg) se homogeneizaron en 2 ml de metanol por 5 mmol/l de EGTA (2:1 v/v) con FAST-PREP (MP Biomedicals). Se evaporó un total de 100 µl, los gránulos secos se disolvieron en 0,1 ml de NaOH (0,1 mol/l) durante la noche, y las proteínas se midieron con la prueba de Bio-Rad. Los lípidos neutros correspondientes a 0,9 ml del homogeneizado se extrajeron de acuerdo con Bligh y Dyer (18) en cloroformo/metanol/agua (2,5:2,5:2,1 v/v/v) en presencia de las normas internas y medidos como se ha descrito previamente (19).

45

Prueba de malonil-CoA.

Los niveles de malonil-CoA se midieron en el músculo sóleo congelado como se ha descrito previamente (20). En resumen, el músculo se homogeneizó (10 mg de tejido en 250 µl de tampón fosfato que contiene de 1 mol/l de KPO₄ y 10 mmol/l de EDTA, pH 7,0) sobre hielo con un molde y luego se centrifugó. El sobrenadante (100 µl) se incubó después durante 1 h a 37 °C con tampón de prueba (tampón fosfato con 2,5 mmol/l de ditiotreitol, 0,2 mmol/l de NADPH, ASB libre de AG al 0,01 %, 13 µmol/l de acetil-CoA, y 0,63 µCi de 3H-acetil-CoA) (PerkinElmer), y 25 mU de AG sintetasa (proporcionado por el Prof. Marc Prentki, Centre Hospitalier de l'Université de Montreal Research Centre, Montreal, Ontario, Canadá). La reacción se detuvo con 25 µl de ácido perclórico, y después se añadió etanol y ácido de petróleo. Un total de 4 ml de la fase superior se transfirieron en un nuevo tubo que contiene 2 ml de agua, y después de la centrifugación, 3 ml de la fase superior se secaron y se midió la radiactividad después de la adición de 10 ml de líquido de centelleo.

60

Análisis por transferencia Western.

Se realizaron análisis por transferencia Western como se ha descrito previamente (4) por las muestras de carga (músculo lisado) en 4-12 % de Criterion/gel XT (Bio-Rad) y la transferencia a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell Bioscience) que se habían sondado con anticuerpos antifosfo-AMPK-α (Thr172), antifosfo-acetil-CoA carboxilasa (ACC) (Ser79) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), o anti-oxfos (MitoSciences,

65

Mundolsheim, Francia) que se utilizan en una dilución 1/1.000. Las membranas se sondaron con β -actina o AMPK o anticuerpos ACC para las proteínas totales.

Prueba de proteínas.

5 La concentración de las muestras se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas DC (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

PCR en tiempo real.

10 ARN totales (1 μ g) se aislaron a partir del músculo utilizando RNA STAT (AMS Technology, Lutterworth, R.U.) y se transcribieron de forma inversa utilizando hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, Paisley, R.U.). PCR en tiempo real se realizó como se ha descrito previamente (1). El análisis de ARN ribosómico 18S se realizó utilizando el control de ARN ribosomal del kit de ensayo TaqMan (Applied Biosystems) para normalizar la expresión génica.

Captación de glucosa.

20 Los músculos se aislaron y se preincubaron durante 10 min en tampón Krebs-Henseleit (pH 7,4) que contiene 2 mg/ml de ASB, 2 mmol/l de piruvato de sodio, y 20 mmol/l de HEPES. Los músculos se incubaron durante 45 min en ausencia o presencia de 100 nmol/l de insulina como se ha notificado previamente (4).

Análisis estadístico.

25 Los datos se presentan como medias \pm EEM. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo para diferentes parámetros utilizando software 5.0 (GraphPad Software) Prism. Una ANOVA bidireccional se aplicó para detectar la interacción entre el tratamiento y el tiempo. Cuando proceda, se aplicó el ensayo t de Student para datos apareados o no apareados. Diferencias a $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

30 **Resultados y discusión**

Efecto del tratamiento crónico con apelina en ratones con DRG (dieta rica en grasas) en el metabolismo lipídico del músculo esquelético *ex vivo*.

35 El tratamiento con apelina en ratones con DRG no reduce la cantidad de IMTG y DAG en comparación con el tratamiento con TFS (Fig. 4A). El tratamiento con apelina tampoco tuvo efecto alguno sobre la tasa de incorporación de palmitato en TG (Fig. 4B). Para investigar más el destino de los lípidos, se evaluaron tanto la oxidación completa como incompleta de [14C]palmitato. El tratamiento crónico con apelina aumentó significativamente la oxidación completa de [14C]palmitato a CO₂ en el músculo sóleo en comparación con el tratamiento con TFS (Fig. 4C). De interés, la oxidación incompleta no se aumentó significativamente por el tratamiento crónico con apelina (Fig. 4C). Además, en el sóleo de ratones con apelina con DRG^{-/-}, no se aumentó la oxidación completa ($243,5 \pm 9,6$ vs. $198,4 \pm 59,9$ nmol de CO₂ liberado por gramo de proteína en ratones con apelina^{-/-}, $n = 3-4$). En conjunto, estos resultados muestran que el tratamiento con apelina promueve la OAG (oxidación de ácidos grasos) completa en el músculo esquelético de ratones obesos y resistentes a la insulina.

Efecto del tratamiento crónico con apelina en ratones con DRG sobre la actividad mitocondrial muscular y la densidad.

50 Para conseguir la mayor comprensión hacia el efecto de apelina, la respiración mitocondrial se evaluó primero en las fibras musculares recién permeabilizadas. No se encontró diferencia alguna en la respiración mitocondrial estimulada por glutamato/malato entre ratones tratados con TFS y con apelina, lo que sugiere que la actividad del complejo I no se vio afectada por el tratamiento con apelina (datos no mostrados). No obstante, la respiración mitocondrial estimulada por succinato fue significativamente mayor en las fibras de los ratones tratados con apelina en comparación con el control, lo que sugiere un aumento de la capacidad oxidativa del complejo II que utiliza coenzimas derivadas de la OAG (Fig. 5A). La respiración estimulada por succinato y adenilato también fue significativamente mayor en los ratones tratados con apelina, lo que indica que la capacidad de fosforilación oxidativa aumentó en el sóleo después del tratamiento con apelina. La expresión de proteínas del complejo II, III y V también aumentó significativamente en los ratones tratados con apelina (Fig. 5B). Además, un aumento de la actividad de la citrato sintasa, un marcador cuantitativo del contenido de mitocondrias, también se descubrió en los homogeneizados del músculo de ratones tratados con apelina en comparación con el control ($2,62 \pm 0,02$ vs. $2,91 \pm 0,07$ μ mol/min/mg de proteínas, $n = 7-9$; $P < 0,001$). La expresión del receptor y coactivador 1- α activado por el proliferador de peroxisoma (PGC1- α), un coactivador transcripcional que media la biogénesis mitocondrial, también fue significativamente mayor en el músculo de ratones tratados con apelina, mientras que la expresión de PGC1- β no se modificó (Fig. 5C). Además, la expresión del factor nuclear respiratorio 1 (NRF1) y el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), que actúan concertadamente para aumentar la fosforilación oxidativa mitocondrial y la biogénesis mitocondrial, también se regularon positivamente. En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente

que en respuesta al tratamiento con apelina, la biogénesis mitocondrial aumentó en el músculo esquelético de ratones resistentes a la insulina. Para poner a prueba esta hipótesis, se midió el ADNmt muscular y la densidad. La relación de ADNmt a ADN nuclear fue significativamente mayor en el músculo sóleo de ratones tratados con apelina que en los ratones tratados con TFS (Fig. 5D). Además, la microscopía electrónica demostró que el tratamiento con apelina aumentó significativamente la densidad de mitocondria intramiofibrilar (IMF) (Fig. 5E), la mayor fracción del contenido total de mitocondrias. Menos alteraciones adversas de la ultraestructura mitocondrial (densidad de electrones reducida de la matriz y la pérdida de crestas) también se observaron en ambas mitocondrias IMF y subsarcolemas (SS) del músculo sóleo de ratones tratados con apelina (Fig. 5E), fortaleciendo el efecto de apelina en la función mitocondrial y la biogénesis.

Para estudiar más a fondo el mecanismo de acción de apelina, se determinó primero la implicación del receptor APJ en los efectos de apelina. Para este fin, los ratones se trataron durante el mismo periodo con apelina solo o apelina y un antagonista del receptor APJ específico (F13A), el antagonista F13A se comportó como un antagonista funcional. En el músculo de ratones tratados con F13A/apelina, la OAG y la biogénesis mitocondrial se abrogaron en comparación con los ratones tratados con apelina (datos no mostrados), indicando que la apelina ejerce sus efectos beneficiosos a través de la activación de APJ.

A continuación, se investigó el papel de la AMPK en la mediación de los efectos de apelina ya que la apelina es conocida por activar AMPK en el músculo esquelético y la AMPK está implicada tanto en la OAG como en la biogénesis mitocondrial. El tratamiento con apelina aumentó significativamente tanto la fosforilación de AMPK como de ACC en el músculo de los ratones resistentes a la insulina (Fig. 6A). La inhibición de la actividad de la ACC (como resultado del aumento de la fosforilación) tuvo por consecuencia una reducción significativa de las concentraciones de malonil-CoA en el músculo de ratones tratados con apelina (Fig. 6B). Además, el aumento de la OAG y la biogénesis mitocondrial observada en ratones tratados con apelina TS con DRG fue completamente mitigado en el músculo de ratones tratados con apelina AMPK-DN con DRG, y la sobreexpresión de PGC1- α , TFAM, y NRF1 se redujo (Fig. 6C-E). De este modo, la AMPK es una diana directa de apelina y se requiere para el efecto de apelina en OAG y la biogénesis mitocondrial.

El tratamiento crónico con apelina en ratones con DRG mejora la sensibilidad a la insulina del músculo.

Las acilcarnitinas representan subproductos de catabolismo de sustratos procedentes de OAG incompleta. El aumento de los niveles de acilcarnitina ha demostrado estar asociado con la obesidad y resistencia a la insulina. Las acilcarnitinas de cadena larga se incrementaron en los homogeneizados de músculo sóleo de ratones resistentes a la insulina con DRG en comparación con los ratones de control con DN (Fig. 7A). Es interesante que en los ratones tratados con apelina con DRG, los niveles de acilcarnitina, especialmente las especies C16:1 y C18:1, se redujeron cuando se compara con los ratones tratados con TFS con DRG. Dado que el tratamiento crónico con apelina aumentó la OAG completa pero no incompleta en el sóleo, la hipótesis era que los niveles más bajos resultantes de acilcarnitinas se correlacionan con una mejor sensibilidad a la insulina en el músculo. De hecho, la captación de glucosa estimulada por la insulina, fue significativamente superior en el músculo de ratones tratados con apelina en comparación con los ratones tratados con TFS (Fig. 7B).

Conclusión:

Los inventores muestran que el tratamiento crónico con apelina aumenta la OAG completa, la capacidad respiratoria mitocondrial, y la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético de los ratones resistentes a la insulina. La afluencia de lípidos en las mitocondrias se asoció con una disminución de los niveles de acilcarnitina, lo que sugiere un acoplamiento más duro entre la OAG y el ciclo del ácido tricarbóxico. Tal acoplamiento más duro parece importante para mejorar la sensibilidad a la insulina ya que se observa un aumento del transporte de glucosa estimulado por insulina en el músculo de ratones tratados con apelina. Un aumento de OAG y la biogénesis mitocondrial en el músculo y la disminución de la adiposidad total podrían contribuir a la mejora general de la sensibilidad a la insulina observada con el tratamiento crónico con apelina.

El tratamiento crónico con apelina activa una mejora tanto del metabolismo de lípidos como de la glucosa. El tratamiento crónico con apelina optimiza el rendimiento mitocondrial del músculo mediante el aumento de la biogénesis mitocondrial y una coincidencia estrecha entre la OAG y el ciclo del ácido tricarbóxico. De este modo, el agonista del receptor APJ similar a apelina o un apelinomimético se debe utilizar en el tratamiento o la prevención de problemas asociados con la enfermedad en el mecanismo energético en las mitocondrias similar a una disfunción asociada con el envejecimiento y más particularmente en el tratamiento o la prevención de la disfunción del músculo esquelético (similar a sarcopenia) o músculo cardíaco.

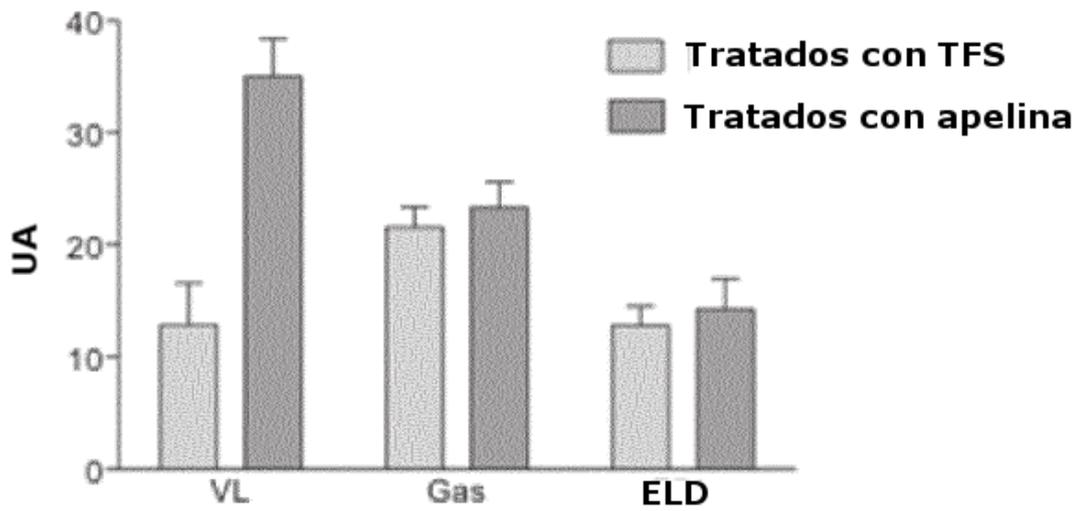
Referencias

A lo largo de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un agonista del receptor APJ para su uso en el tratamiento o la prevención de la sarcopenia.
- 5 2. Un agonista del receptor APJ para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agonista es la apelina.
3. Un método *ex vivo* de predicción de la capacidad de un paciente afectado por la sarcopenia, que comprende la etapa que consiste en detectar la expresión de la apelina en una muestra obtenida de dicho paciente.
- 10 4. Un método *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha expresión de la apelina se compara con un valor umbral.
5. Un método *ex vivo* de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en el que la muestra es plasma.

Miogenina



Miostatina

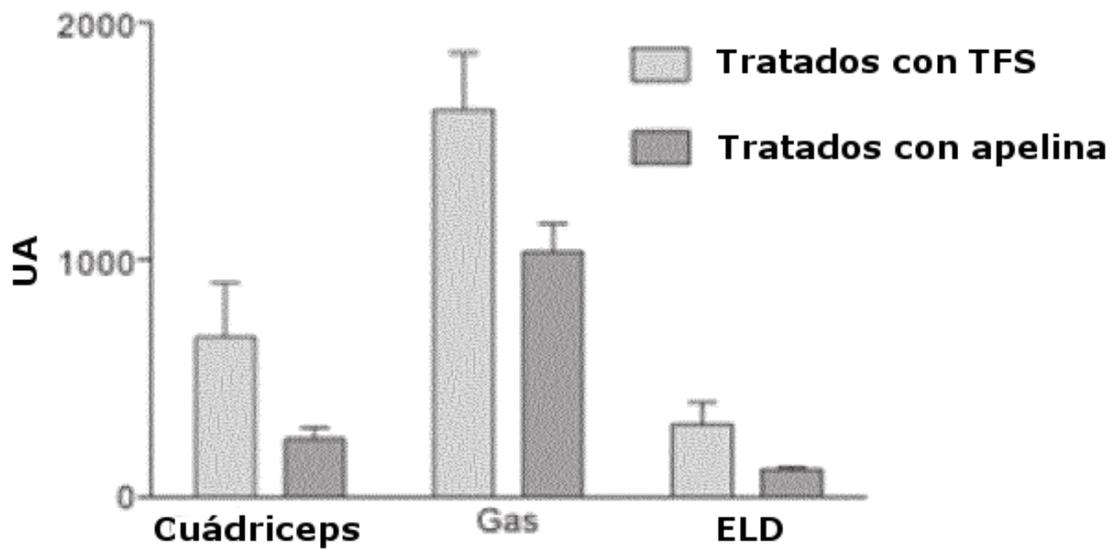


Figura 1 A

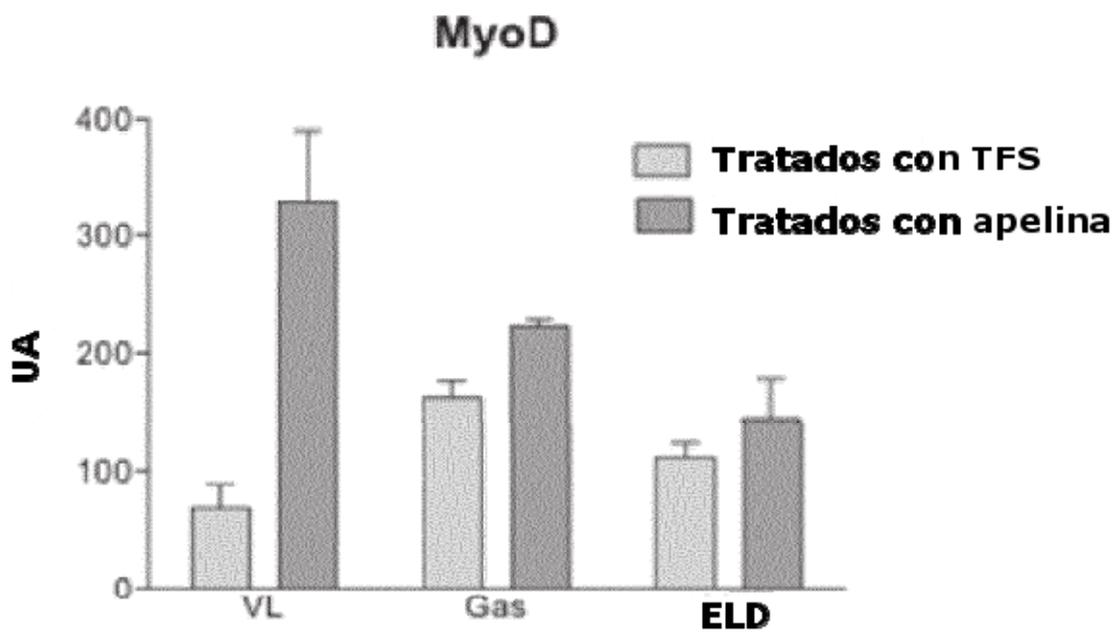
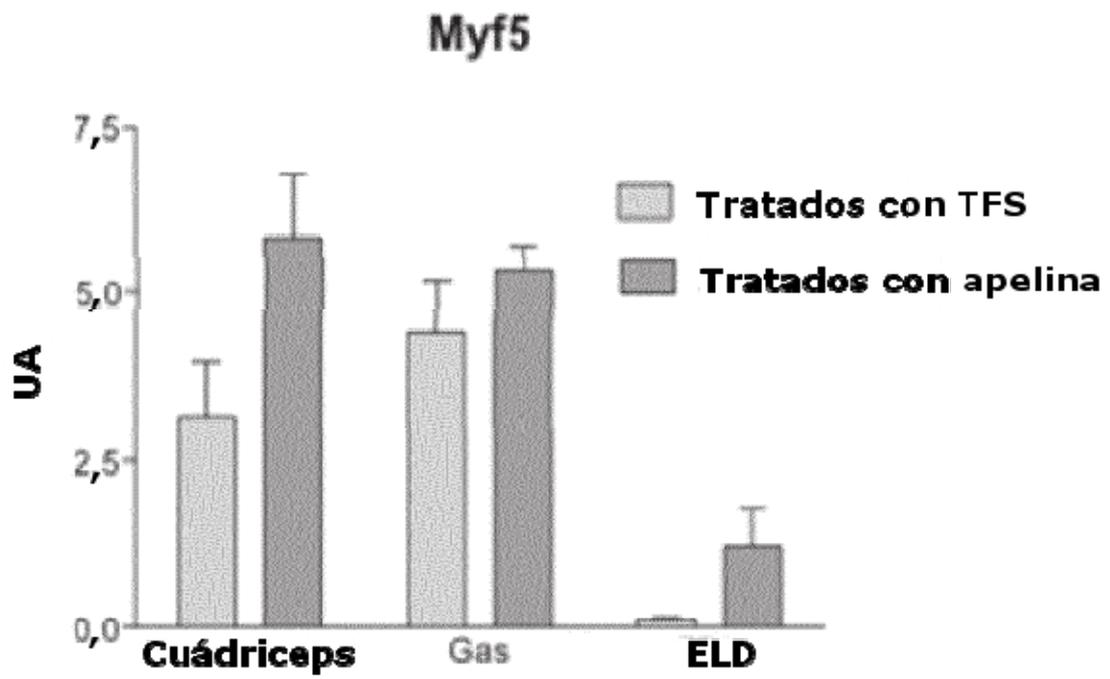


Figura 1 B

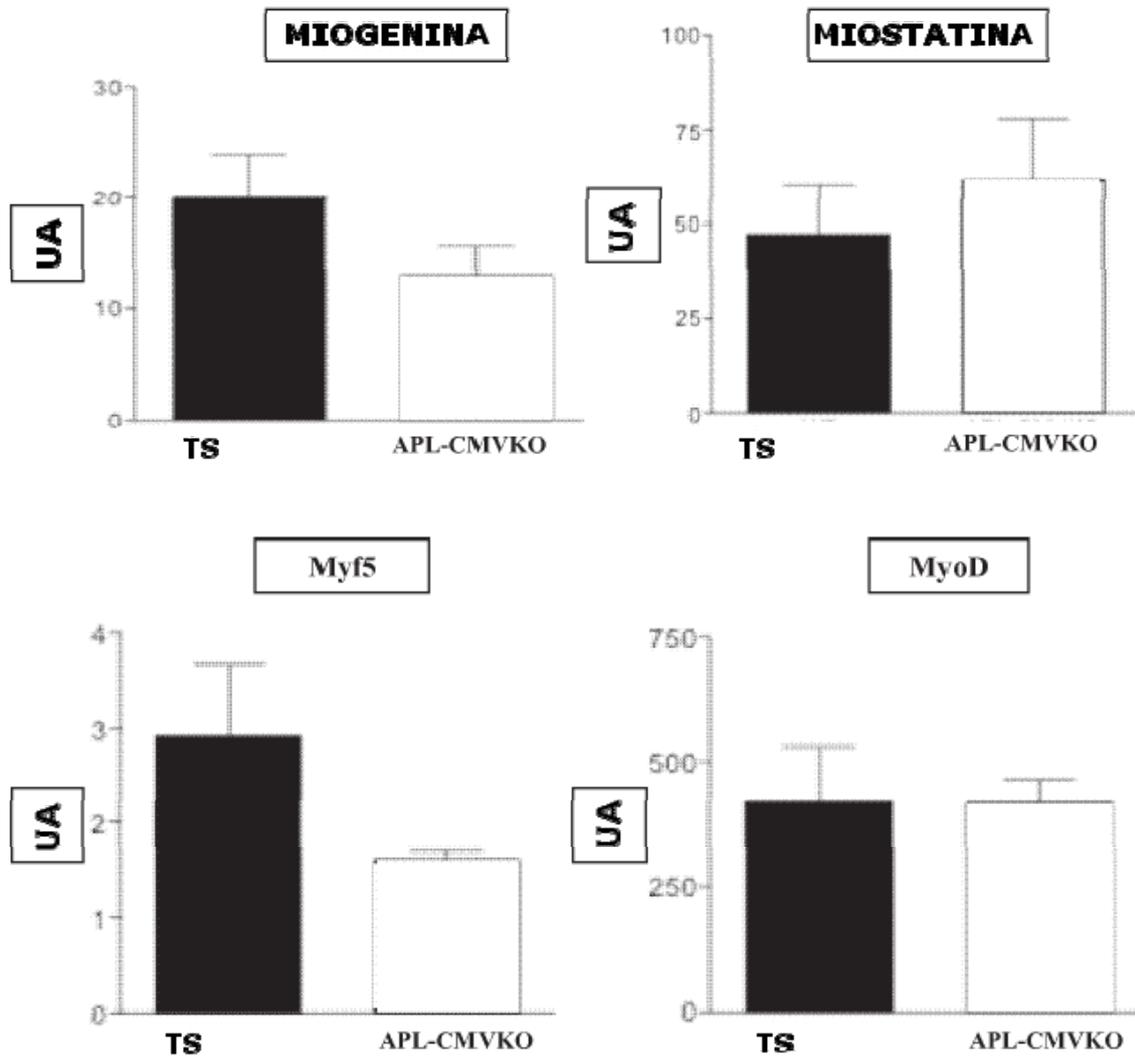


Figura 2

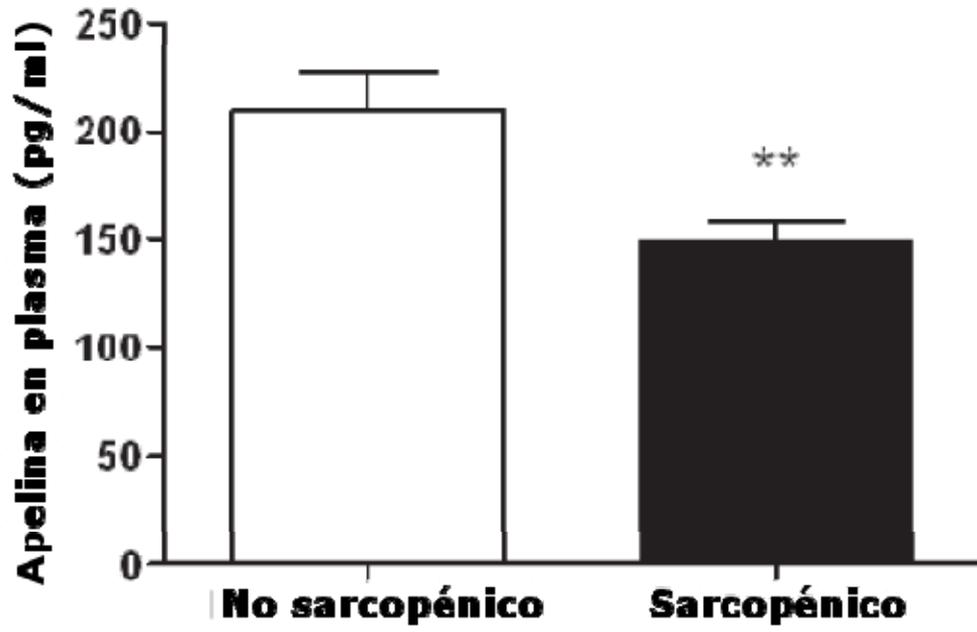


Figura 3

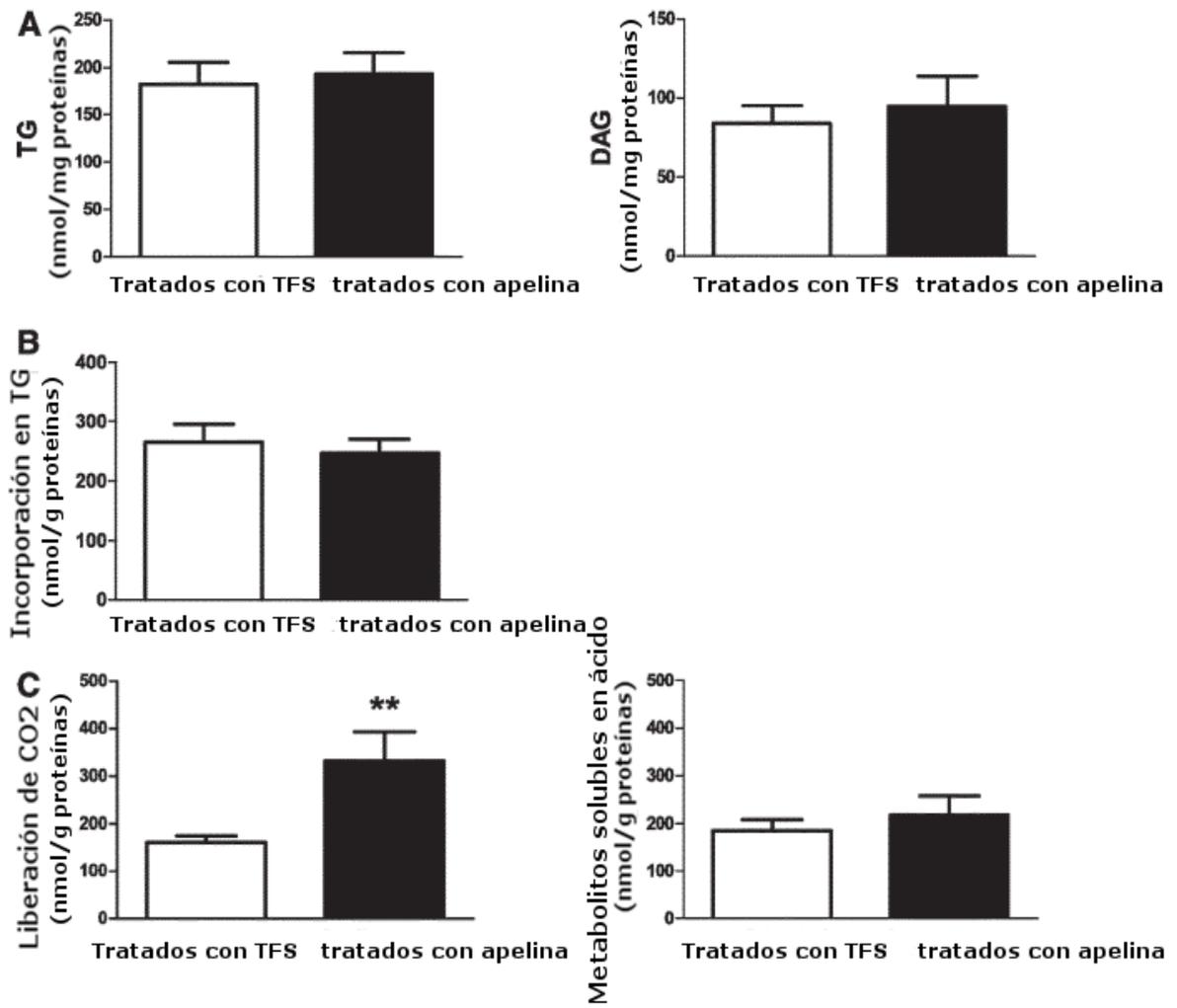


Figura 4

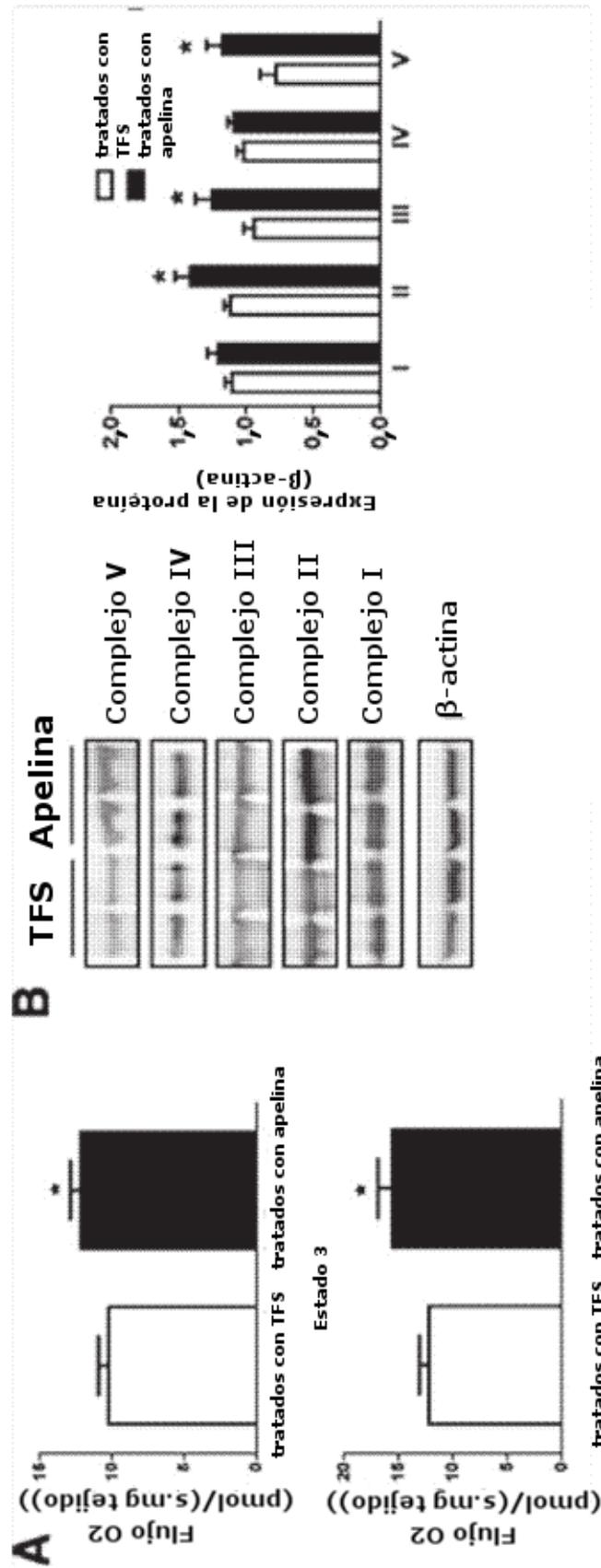


Figura 5 A y B

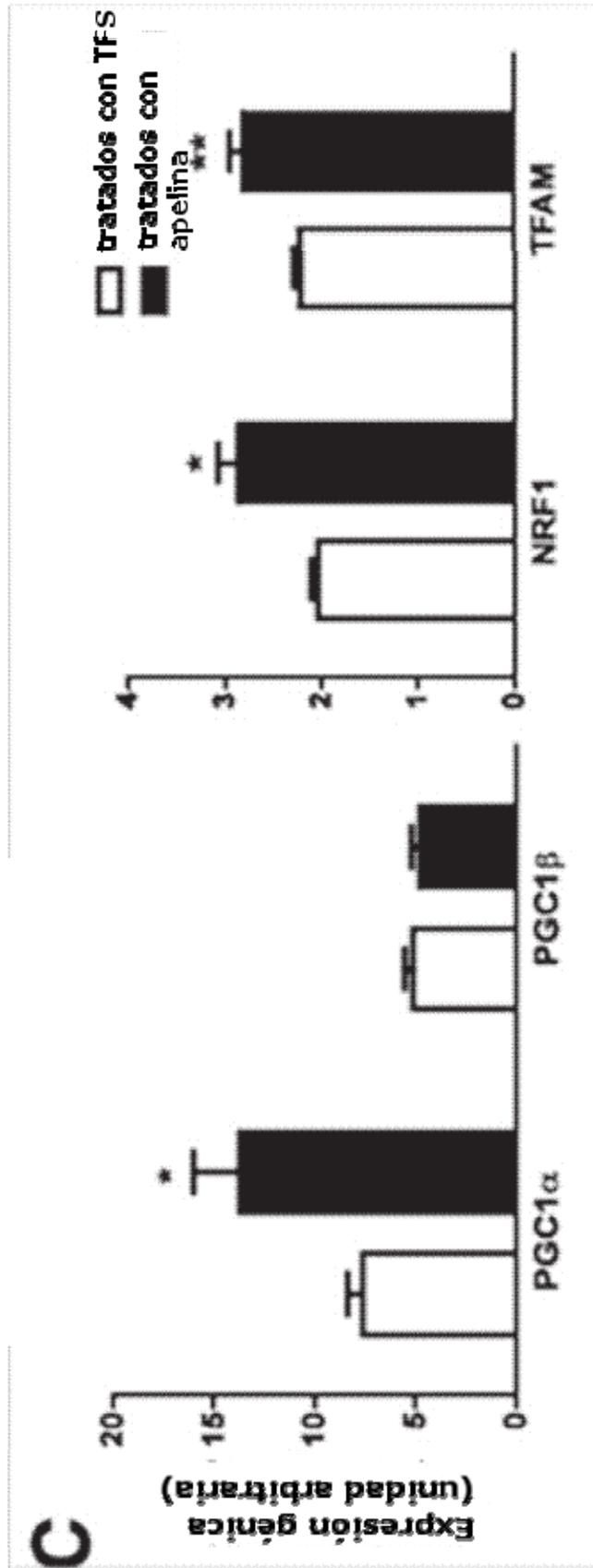


Figura 5 C

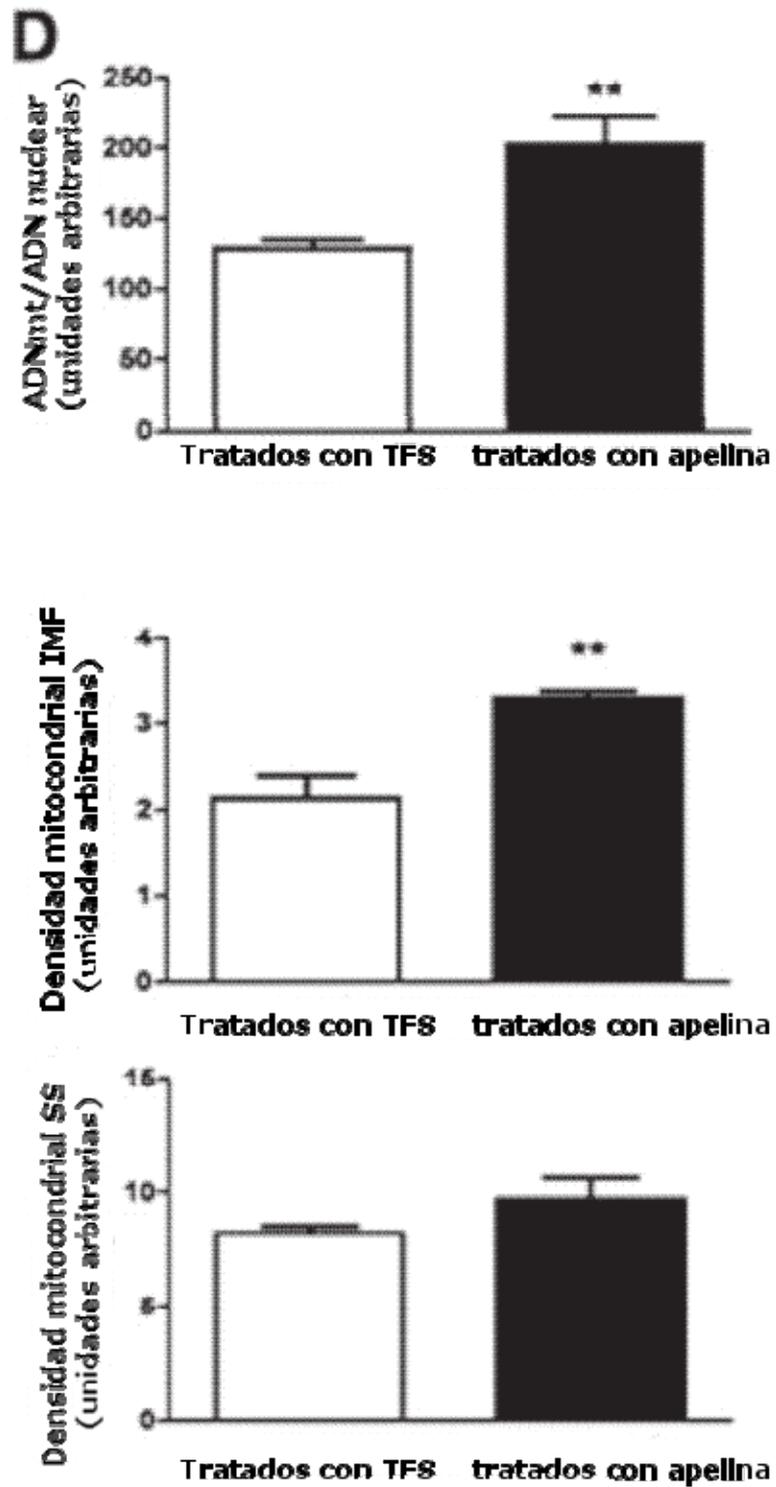


Figura 5 D

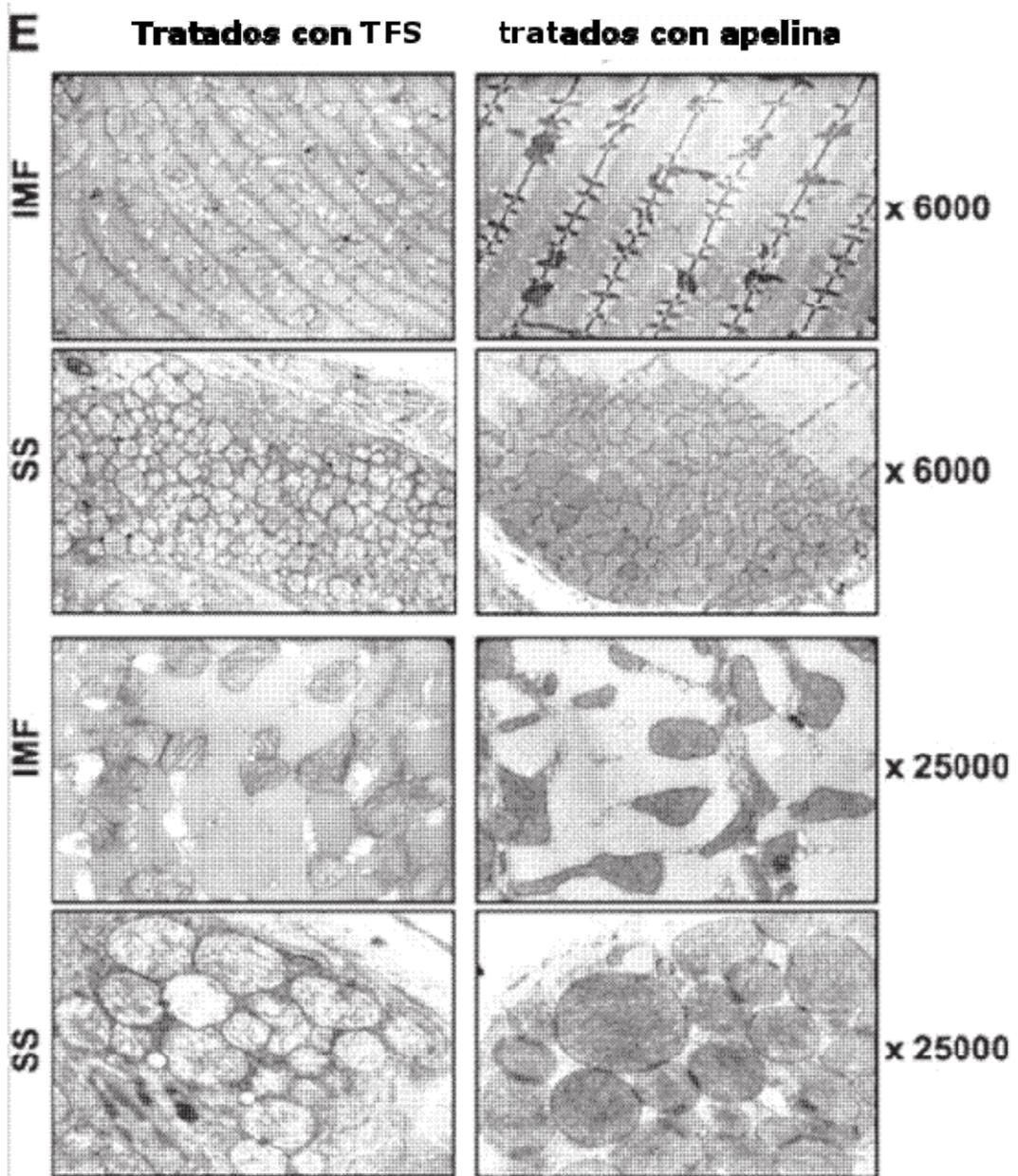


Figura 5 E

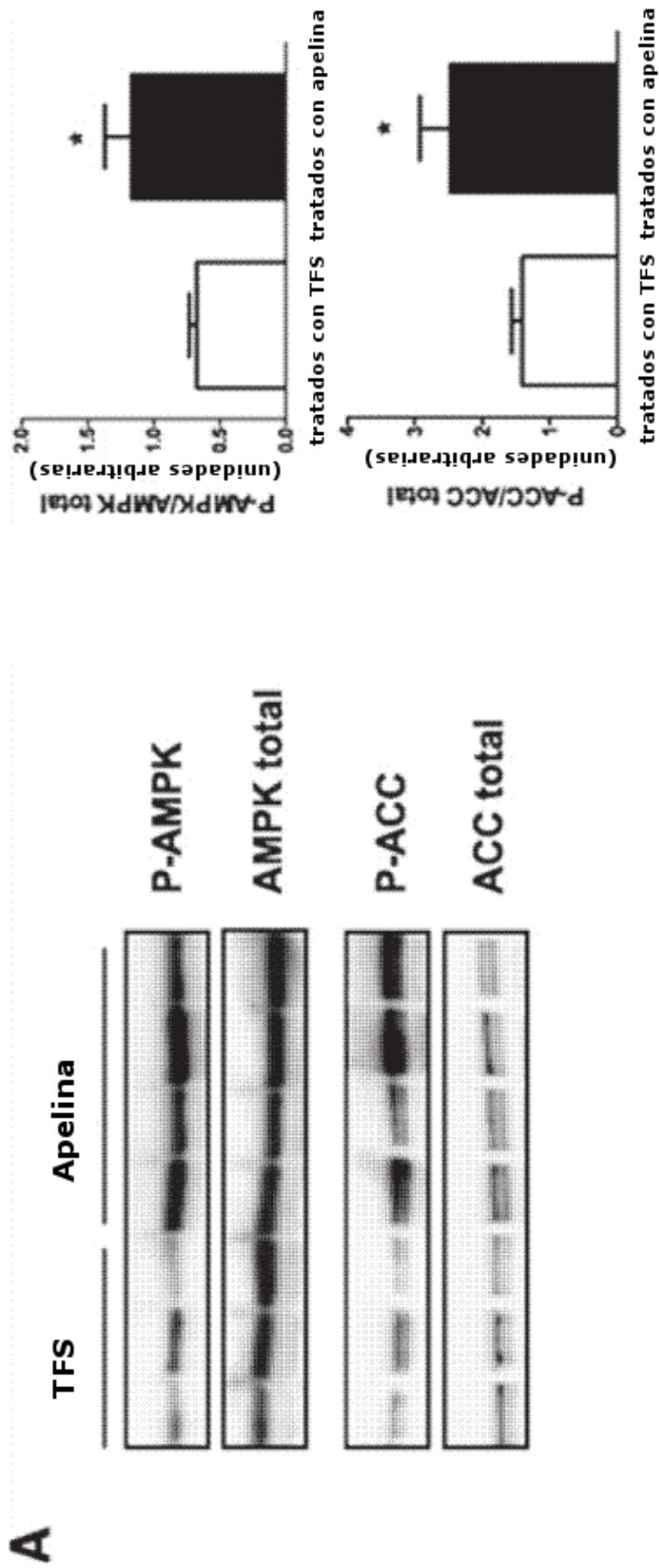


Figura 6 A

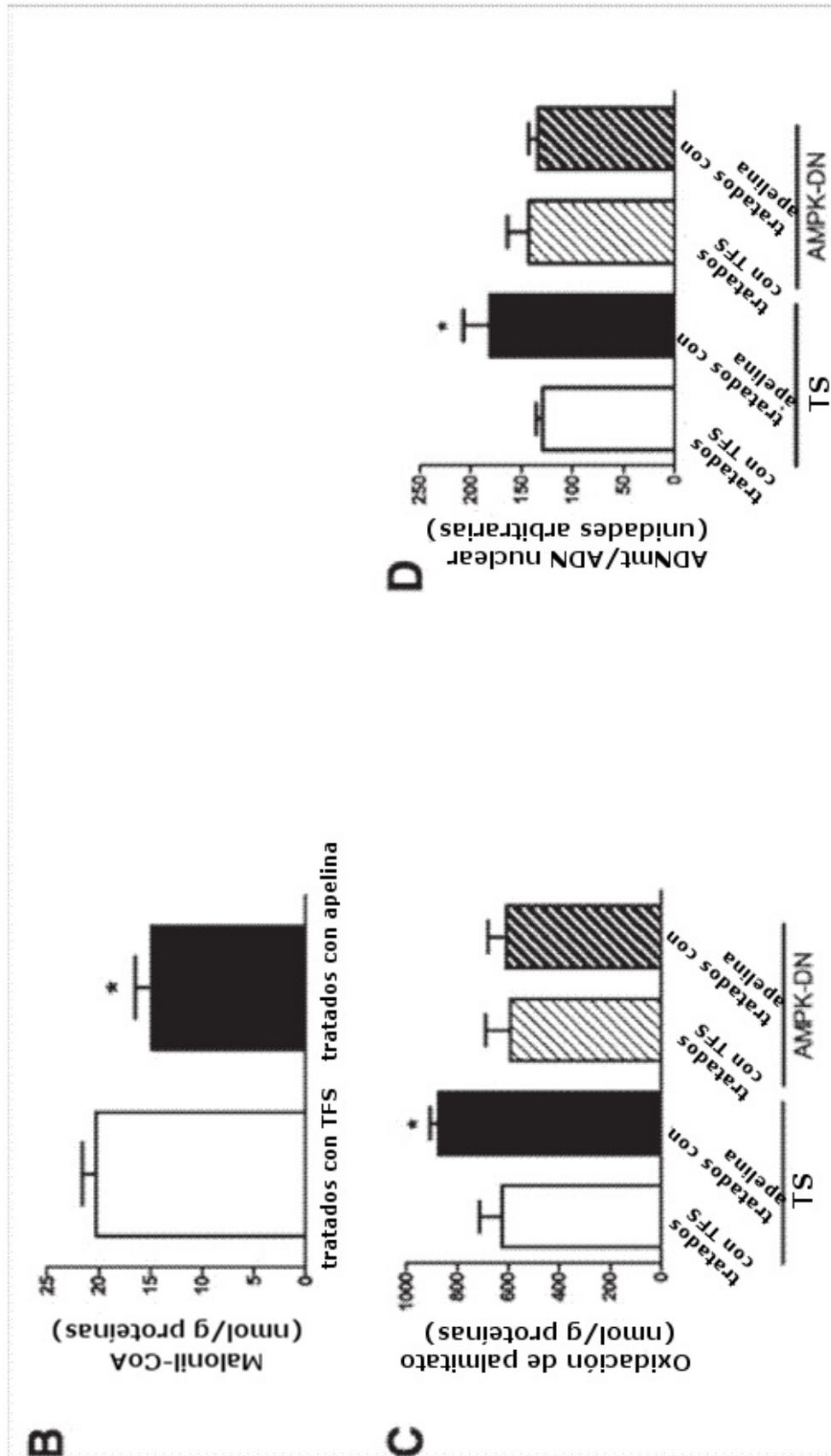
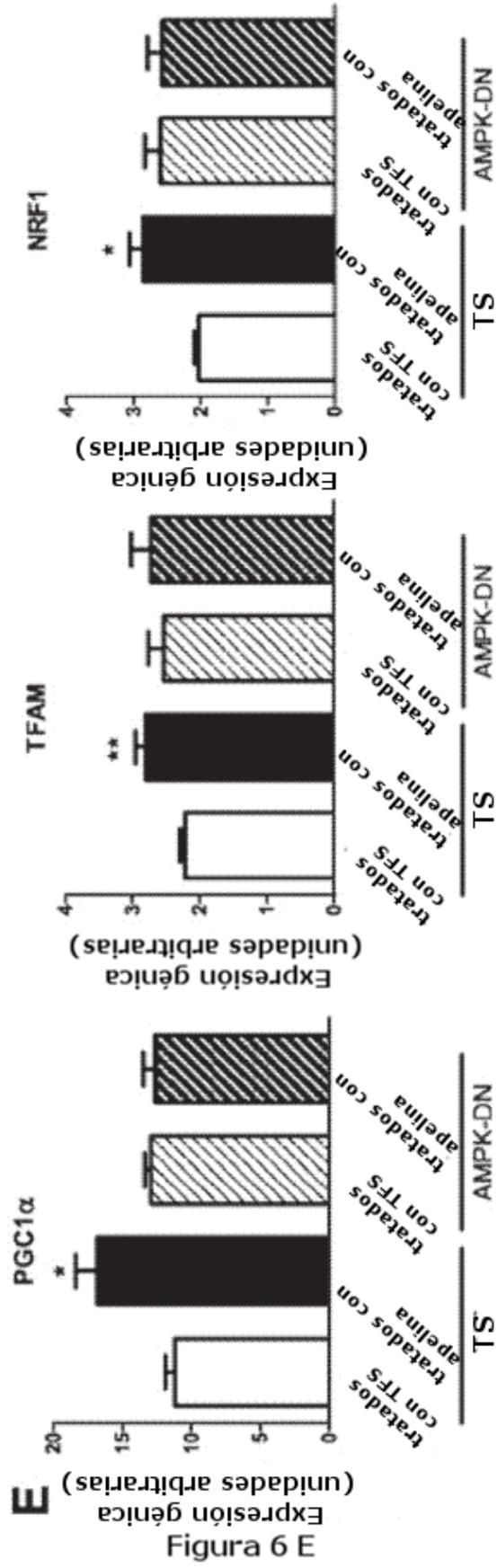


Figura 6 B, C y D



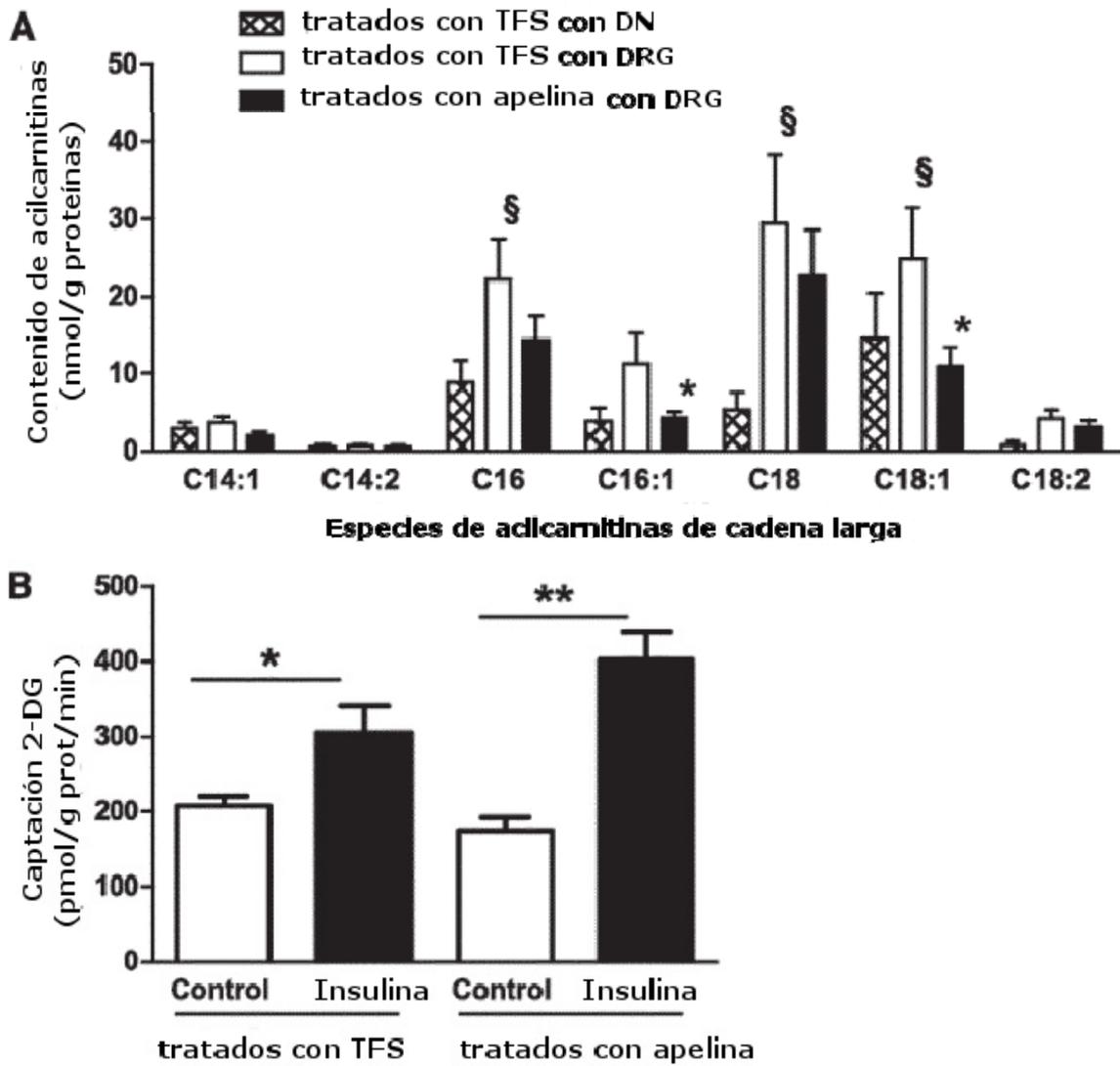


Figura 7