

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 913**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2011 PCT/GB2011/000966**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2011 WO11161427**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2011 E 11729337 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2585097**

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

30 Prioridad:

25.06.2010 US 358596 P
20.09.2010 US 384652 P
07.12.2010 US 420677 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TISDALE, MICHAEL, J. y
RUSSELL, STEVEN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 706 913 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

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

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere, en general, a formulaciones medicinales, y más particularmente, a formulaciones para su uso en el tratamiento de la obesidad.

Antecedentes

15 La prevalencia de obesidad en adultos, niños y adolescentes ha aumentado rápidamente en los últimos 30 años en los Estados Unidos y en todo el mundo y continúa aumentando. La obesidad se define clásicamente basándose en el porcentaje de grasa corporal o, más recientemente, el índice de masa corporal (IMC), también llamado índice de Quetlet (National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity, Arch. Intern. Med., 160: 898-904 (2000); Khaodhiar, L. et al., Clin. Cornerstone, 2: 17-31 (1999)). El IMC se define como la relación de peso (kg) dividida por la altura (en metros) al cuadrado.

20 El sobrepeso y la obesidad se asocian con un mayor riesgo de desarrollar muchas enfermedades crónicas del envejecimiento que se observan en los EE. UU. Dichas comorbilidades incluyen diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, cardiopatías coronarias y dislipidemia, cálculos biliares y colecistectomía, artrosis, cáncer (de mama, colon, endometrial, próstata y vesícula biliar) y apnea del sueño. Se estima que hay aproximadamente 325.000
25 muertes anuales que son atribuibles a la obesidad. La clave para reducir la gravedad de las enfermedades es perder peso de manera efectiva. Aunque aproximadamente del 30 al 40 % afirma estar intentando perder peso o mantener el peso perdido, las terapias actuales parecen no estar funcionando. Además de la manipulación dietética, el tratamiento farmacológico y, en casos extremos, la cirugía, son terapias complementarias sancionadas para tratar a
30 pacientes con sobrepeso y obesos (Panel de Expertos, National Institute of Health, Heart, Lung, and Blood Institute, 1-42 (Junio de 1998); Bray, G. A., Contemporary Diagnosis and Management of Obesity, 246-273 (1998)). Los fármacos tienen efectos secundarios, y la cirugía, aunque efectiva, es una medida drástica y está reservada para la obesidad mórbida.

35 La caquexia es una pérdida de masa tanto adiposa como muscular esquelética causada por la enfermedad. Ocurre en muchas afecciones y es común con muchos cánceres cuando falla la remisión o el control. Los pacientes con cáncer avanzado, SIDA y algunas otras enfermedades crónicas progresivas importantes pueden aparecer caquéuticos. La caquexia puede ocurrir en personas que están comiendo lo suficiente, pero que no pueden absorber los nutrientes. Si bien la caquexia puede estar mediada por ciertas citocinas, especialmente el factor de necrosis tumoral α , IL-1b e IL-6, que son producidos por células tumorales y células huésped en la masa tisular, actualmente
40 no existe un tratamiento ampliamente aceptado para la caquexia.

45 La diabetes mellitus es una causa importante de morbilidad y mortalidad. La glucemia crónicamente elevada causa complicaciones debilitantes: nefropatía, que a menudo requiere diálisis o trasplante renal; neuropatía periférica; retinopatía que causa ceguera; ulceración de piernas y pies, que lleva a amputación; esteatosis hepática, que a veces progresa a cirrosis; y vulnerabilidad a la arteriopatía coronaria y al infarto de miocardio.

50 Hay dos tipos principales de diabetes. El tipo I, o diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) se debe a la destrucción autoinmunitaria de las células beta productoras de insulina en los islotes pancreáticos. El inicio de esta enfermedad suele ser en la infancia o la adolescencia. El tratamiento consiste principalmente en inyecciones diarias múltiples de insulina, combinadas con análisis frecuentes de los niveles de glucemia para guiar el ajuste de las dosis de insulina, porque el exceso de insulina puede causar hipoglucemia y el consiguiente deterioro del cerebro y otras funciones. Se está prestando una atención creciente al papel de la resistencia a la insulina para la génesis, la
progresión y el tratamiento terapéutico de este tipo de enfermedad diabética.

55 La diabetes mellitus de tipo II o no dependiente de insulina (NIDDM) generalmente se desarrolla en la edad adulta. La NIDDM se asocia con la resistencia de los tejidos que utilizan glucosa, como el tejido adiposo, el músculo y el hígado, a las acciones de la insulina. En el inicio, las células beta de los islotes pancreáticos compensan secretando un exceso de insulina. La eventual insuficiencia de los islotes de como resultado descompensación e hiperglucemia crónica. Por el contrario, la insuficiencia moderada de los islotes puede preceder o coincidir con la resistencia
60 periférica a la insulina. Existen varias clases de fármacos que son útiles para el tratamiento de la NIDDM: 1) liberadores de insulina, que estimulan directamente la liberación de insulina, conllevando el riesgo de hipoglucemia; 2) liberadores de insulina prandiales, que potencian la secreción de insulina inducida por la glucosa, y deben tomarse antes de cada comida; 3) biguanidas, incluyendo metformina, que atenúan la gluconeogénesis hepática (que está paradójicamente elevada en la diabetes); 4) sensibilizadores a la insulina, por ejemplo, los derivados de tiazolidindiona rosiglitazona y pioglitazona, que mejoran la capacidad de respuesta periférica a la insulina, pero que
65 tienen efectos secundarios como aumento de peso, edema y toxicidad hepática ocasional; 5) inyecciones de

insulina, que a menudo son necesarias en las últimas fases de la NIDDM cuando los islotes han fallado bajo una hiperestimulación crónica.

La resistencia a la insulina también puede ocurrir sin una hiperglucemia marcada, y generalmente se asocia con aterosclerosis, obesidad, hiperlipidemia e hipertensión esencial. Este conjunto de anomalías constituye el "síndrome metabólico" o "síndrome de resistencia a la insulina". La resistencia a la insulina también se asocia con la esteatosis hepática, que puede progresar a una inflamación crónica (NASH; "esteatohepatitis no alcohólica"), fibrosis y cirrosis. Acumulativamente, los síndromes de resistencia a la insulina, incluyendo, pero sin limitaciones, diabetes, subyacen a muchas de las principales causas de morbilidad y muerte de personas mayores de 40 años.

A pesar de la existencia de dichos fármacos, la diabetes sigue siendo un problema importante y creciente para la salud pública. Las complicaciones tardías de la diabetes consumen una gran proporción de los recursos sanitarios nacionales. Existe la necesidad de nuevos agentes terapéuticos activos por vía oral que aborden de manera efectiva los defectos primarios de la resistencia a la insulina y la insuficiencia de los islotes con menos efectos secundarios o más leves que los fármacos existentes.

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

Hasta la fecha, se han llevado a cabo estudios sobre el efecto de movilización de lípidos de ZAG en ratones y ratas usando ZAG humana y murina. Los estudios indican que ZAG se conserva evolutivamente y muestra actividad entre especies, por ejemplo, ZAG murina que exhibe sustancialmente la misma actividad en seres humanos y viceversa.

Sigue habiendo una falta de alternativas efectivas y seguras para alterar el metabolismo y el tratamiento de enfermedades metabólicas, tales como obesidad, diabetes y caquexia. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas formulaciones para dichos usos.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que la zinc- α_2 -glucoproteína tiene un efecto sobre el peso corporal y la sensibilidad a la insulina en ratones hiperglucémicos (ob/ob) obesos adultos y ratas Wistar maduras, y que los anticuerpos anti-ZAG previenen la pérdida de peso en situaciones de caquexia. Dicho descubrimiento es útil en métodos para moderar el peso corporal, mejorar la capacidad de respuesta a la insulina o mejorar los síntomas asociados con la caquexia o enfermedades asociadas con la atrofia muscular progresiva.

La presente invención proporciona una formulación que comprende una zinc- α_2 -glucoproteína (ZAG) para su uso en el tratamiento de la obesidad en un sujeto aumentando el nivel endógeno del sujeto de una zinc- α_2 -glucoproteína (ZAG), en la que la formulación se administra al sujeto mediante administración oral. En un aspecto, la ZAG es de mamífero, por ejemplo, ser humano, y puede incluir la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1. El péptido ZAG puede conjugarse con un polímero no proteico. El péptido ZAG puede estar sialilado, PEGilado o modificado para aumentar la solubilidad o estabilidad. El péptido ZAG puede ser recombinante o sintético. En diversos aspectos, el péptido ZAG puede incluir uno o más de una secuencia líder y una secuencia posterior. El péptido ZAG también puede estar glucosilado, por ejemplo, como resultado de una modificación postraduccional. Adicionalmente, en diversas realizaciones, la formulación puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable. La formulación también puede incluir uno o más agentes que incluyen un agonista de β_3 y un antagonista del receptor β -adrenérgico (β -AR), tal como un antagonista del receptor β_2 -adrenérgico (β_2 -AR), un antagonista del receptor β_1 -adrenérgico (β_1 -AR) y un antagonista del receptor β_3 -adrenérgico (β_3 -AR). En algunos aspectos, la formulación de la reivindicación 1 puede incluir además un péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) o un análogo del mismo. En algunos aspectos, el sujeto es un ser humano. En algunos aspectos, la formulación se administra diariamente durante al menos 10 o 21 días. En algunos aspectos, la formulación se administra dos veces al día, una vez cada tres días, semanalmente o mensualmente.

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

15 La figura 1E es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la lipólisis en adipocitos de depósitos epididimarios (ep), subcutáneos (se) y viscerales (vis) de ratones obesos (ob/ob) y no obesos (no ob) sin tratamiento (■), isoprenalina (10 μ M) (□) o ZAG (0,46 μ M) (◻). Las diferencias con los adipocitos epididimarios se muestran como ⁴⁴ $p < 0,01$.

20 La figura 1F es un diagrama gráfico que muestra el efecto de ZAG (■) sobre el peso corporal de ratones ob/ob en comparación con PBS (◆) como se ha descrito en los métodos. Las diferencias en el peso desde el tiempo cero y los controles de PBS se muestran como ⁴⁴⁴ $p < 0,001$.

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

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

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

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

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

50 La figura 2E es un diagrama ilustrado que muestra el efecto de ZAG sobre la expresión del transportador de glucosa GLUT4 en el músculo esquelético de ratones ob/ob. Tras el tratamiento de los ratones ob/ob durante 5 días, se extirpó músculo esquelético y se realizó transferencia de Western para determinar la expresión de GLUT4.

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

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

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

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

La figura 3E es un diagrama ilustrado que muestra el efecto de ZAG sobre las rutas de señalización en el músculo esquelético de ratones ob/ob. Tras el tratamiento de los ratones ob/ob durante 5 días, se extirpó músculo esquelético y se realizó transferencia de Western para determinar la expresión de p42.

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

10 La figura 3G es un diagrama ilustrado que muestra el efecto de ZAG sobre la síntesis y degradación de proteínas en el músculo esquelético de ratones ob/ob. Tras el tratamiento de los ratones ob/ob durante 5 días, se extirpó músculo esquelético y se realizó transferencia de Western para determinar la expresión de actina como control.

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

20 La figura 4B es un diagrama ilustrado que muestra el efecto de ZAG sobre las rutas de señalización catabólica en el músculo esquelético mediante transferencia de Western de fosfo eIF2a en el músculo gastrocnemio de ratones ob/ob tras el tratamiento bien con PBS o bien con ZAG 5 días. Las formas totales de las proteínas sirven como controles de carga. Las diferencias con respecto a los controles de PBS se muestran como *** $p < 0,001$, mientras que las diferencias con respecto a los ratones no obesos se muestran como # $p < 0,001$.

25 La figura 4C es un diagrama ilustrado que muestra el efecto de ZAG sobre las rutas de señalización catabólica en el músculo esquelético mediante transferencia de Western de fosfo PLA_2 en el músculo gastrocnemio de ratones ob/ob tras el tratamiento bien con PBS o bien con ZAG 5 días. Las formas totales de las proteínas sirven como controles de carga. Las diferencias con respecto a los controles de PBS se muestran como *** $p < 0,001$, mientras que las diferencias con respecto a los ratones no obesos se muestran como # $p < 0,001$.

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

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

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

45 La figura 5B es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de HSL mediante inmunotransferencia en adipocitos epididimarios (ep) tras 5 días de tratamiento con ZAG.

50 La figura 5C es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de HSL mediante inmunotransferencia en adipocitos subcutáneos (sc) tras 5 días de tratamiento con ZAG.

La figura 5D es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de HSL mediante inmunotransferencia en adipocitos viscerales (vis) tras 5 días de tratamiento con ZAG.

55 La figura 5E es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de ATGL en adipocitos epididimarios tras 5 días de tratamiento con ZAG.

La figura 5F es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de ATGL en adipocitos subcutáneos tras 5 días de tratamiento con ZAG.

60 La figura 5G es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de ATGL en adipocitos viscerales tras 5 días de tratamiento con ZAG.

65 La figura 5H es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de pERK en adipocitos epididimarios tras 5 días de tratamiento con ZAG.

La figura 5I es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de pERK en adipocitos subcutáneos tras 5 días de tratamiento con ZAG.

5 La figura 5J es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de pERK en adipocitos viscerales tras 5 días de tratamiento con ZAG.

10 La figura 5K es un diagrama gráfico que muestra la respuesta de los adipocitos de depósitos epididimarios (ep), subcutáneos (se) y viscerales (vis) de ratones ob/ob tratados con PBS o ZAG durante 5 días al efecto lipolítico de BRL37344. Las diferencias con respecto a los controles de PBS se indican como *** $p < 0,01$, mientras las diferencias en presencia de PD98059 se muestran como # $p < 0,001$.

15 La figura 6A es un diagrama ilustrado que muestra el efecto del tratamiento de ratones ob/ob durante 5 días con ZAG sobre la expresión de ZAG en TAB. Transferencia de Western que muestra la expresión de ZAG en adipocitos ep, sc y vis. El día 0 representa el día en que se extirparon los adipocitos de los ratones.

20 La figura 6B es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de ZAG en adipocitos epididimarios que se suspendieron en medio RPMI como se describe en los métodos. Las muestras se sacaron a intervalos diarios y se realizó transferencia de Western para la expresión de ZAG. El día 0 representa el día en que se extirparon los adipocitos de los ratones.

25 La figura 6C es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de HSL en adipocitos epididimarios que se suspendieron en medio RPMI como se describe en los métodos. Las muestras se sacaron a intervalos diarios y se realizó transferencia de Western para la expresión de HSL. El día 0 representa el día en que se extirparon los adipocitos de los ratones.

La figura 6D es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de UCP1 en TAP extirpado de ratones. Las diferencias con respecto a los ratones tratados con PBS se muestran como *** $p < 0,001$.

30 La figura 6E es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de UCP3 en TAP extirpado de ratones. Las diferencias con respecto a los ratones tratados con PBS se muestran como *** $p < 0,001$.

La figura 6F es un diagrama ilustrado que muestra la expresión de UCP3 en músculo gastrocnemio extirpado de ratones. Las diferencias con respecto a los ratones tratados con PBS se muestran como *** $p < 0,001$.

35 La figura 7A es un diagrama gráfico que muestra la pérdida de peso de los ratones ob/ob durante el estudio de 21 días. Se inyectó ZAG los días 1, 4, 5, 8, 13, 16, 18 y 19; se inyectó PBS en los mismos puntos temporales.

La figura 7B es un diagrama gráfico que muestra el cambio de peso (g) de los ratones ob/ob (peso 80-90 g) durante el tratamiento con ZAG.

40 La figura 7C es un diagrama gráfico que muestra el incremento de la temperatura corporal de los ratones ob/ob durante el estudio de 21 días. Se inyectó ZAG los días 1, 4, 5, 8, 13, 16, 18 y 19; se inyectó PBS en los mismos puntos temporales.

45 La figura 8A es un diagrama gráfico que muestra la disminución progresiva de la excreción de glucosa en orina durante los primeros 5 días de tratamiento.

La figura 8B es un diagrama gráfico que muestra la disminución progresiva de la excreción de glucosa en orina durante el estudio de 21 días.

50 La figura 9 es un diagrama gráfico que muestra la liberación de glicerol estimulada por adipocitos aislados con isoprenalina (iso) que se han cultivado durante hasta 5 días de ratones ob tratados con y sin ZAG.

55 La figura 10 es un diagrama ilustrado que muestra la secuencia completa de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de la Zn- α 2-glicoproteína plasmática humana, tal como publican T. Araki *et al.* (1988) "Complete amino acid sequence of human plasma Zn- α 2-glycoprotein and its homology to histocompatibility antigens."

60 La figura 11 es un diagrama gráfico que muestra la actividad lipolítica de ZAG humana en adipocitos epididimarios aislados de rata, en comparación con isoprenalina (10 μ M) en ausencia o presencia de SR59230A (10 μ M) o anticuerpos anti-ZAG (1:1000) (IgG). Cada valor es un promedio de 5 estudios distintos. Las diferencias con respecto al control se muestran como b, $p < 0,01$ o c, $p < 0,001$, mientras que las diferencias con respecto a ZAG solo, se indican como e, $p < 0,01$ o f, $p < 0,001$.

65 La figura 12A es un diagrama gráfico que muestra el efecto de la administración i.v. diaria de ZAG (50 μ g/100 g. p.c.) en 100 ml de PBS (■) o PBS solo (◆) sobre el peso corporal de ratas Wistar macho en un periodo de 10 días. El protocolo para el experimento se proporciona en la sección de métodos.

La figura 12B es un diagrama gráfico que muestra la temperatura corporal de ratas macho Wistar a las que se ha administrado ZAG (■) o PBS (◆) como se describe en la figura 12A.

5 La figura 12C es un diagrama gráfico que muestra la captación de 2-desoxi-D-glucosa en adipocitos epididimarios de ratas Wistar macho tras 10 días de tratamiento bien con ZAG (recuadros vacíos) o bien con PBS (recuadros rellenos) durante 10 días, como se muestra en la figura 12A, en ausencia o presencia de insulina (60 μ U/ml).

10 La figura 12D es un diagrama gráfico que muestra la captación de la glucosa en el músculo gastrocnemio en TAP de ratas Wistar macho tras 10 días de tratamiento bien con ZAG o bien con PBS, en ausencia o presencia de insulina (60 μ U/ml). Las diferencias entre animales tratados con ZAG y con PBS se muestran como a, $p < 0,05$, b, $p < 0,01$ o c, $p < 0,001$, mientras que las diferencias en presencia de insulina se muestran como o f, $p < 0,001$.

15 La figura 12E es un diagrama gráfico que muestra el Rg tisular en ratones ob/ob a los que se ha administrado ZAG c, $p < 0,001$ con respecto a PBS.

20 Las figuras 13A-13C son diagramas ilustrados de transferencias de Western que muestran la expresión de GLUT4 en TAP (figura 13A) y TAB (figura 13B) en el músculo gastrocnemio (figura 13C) de ratas Wistar macho tratadas bien con PBS o bien con ZAG durante 10 días como se muestra en la figura 12. Las diferencias entre animales tratados con ZAG y con PBS se muestran como c, $p < 0,001$.

25 Las figuras 14A y 14B son diagramas ilustrados de transferencias de Western que muestran la expresión de UCP1 y UCP3 en TAP (figura 14A) y TAB (figura 14B) en ratas Wistar macho tratadas bien con PBS o bien con ZAG durante 10 días como se muestra en la figura 12. Las diferencias entre animales tratados con ZAG y con PBS se muestran como c, $p < 0,001$.

30 Las figuras 15A y 15B son diagramas ilustrados de transferencias de Western que muestran la expresión de ATGL (figura 15A) y HSL (figura 15B) en tejido adiposo epididimario de ratas Wistar macho tratadas bien con PBS o bien con ZAG durante 10 días como se muestra en la figura 12. Las diferencias entre animales tratados con ZAG y con PBS se muestran como c, $p < 0,001$.

35 Las figuras 16A-16C son diagramas ilustrados de transferencias de Western que muestran la expresión de ZAG en el músculo gastrocnemio (figura 16A), TAB (figura 16B) y TAP (figura 16C). Los tejidos se extirparon de ratas Wistar macho tratadas bien con PBS o bien con ZAG durante 10 días como se muestra en la figura 12. Las diferencias entre animales tratados con ZAG y con PBS se muestran como c, $p < 0,001$.

40 Las figuras 17A y 17B son diagramas ilustrados de transferencias de Western que muestran la expresión de formas fosforiladas y totales de pPKR (figura 17A) y pelf2 α (figura 17B) en el músculo gastrocnemio de ratas Wistar tratadas bien con PBS o bien con ZAG durante 10 días como se muestra en la figura 12. El análisis densitométrico es la relación entre fósforo y las formas totales, expresada como un porcentaje del valor para las ratas tratadas con PBS.

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

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

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

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

La figura 22A es un diagrama ilustrado de una transferencia de Western que muestra pPKR en miotubos C2C12 tratados con glucosa con y sin ZAG. Estadísticamente significativo c, $P < 0,001$ con respecto al control f, $P < 0,001$ con respecto a glucosa sola.

65 La figura 22B es un diagrama ilustrado de una transferencia de Western que muestra pelf2 α en miotubos C2C12 tratados con glucosa con y sin ZAG. Estadísticamente significativo c, $P < 0,001$ con respecto al control f, $P < 0,001$

con respecto a glucosa sola.

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

La figura 24 es un diagrama gráfico que muestra la oxidación de D-[U- ^{14}C glucosa] a $^{14}\text{CO}_2$ en ratones ob/ob.

La figura 25 es un diagrama gráfico que muestra la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de [^{14}C carboxi] trioleína en ratones ob/ob.

La figura 26 es un diagrama gráfico que muestra la reducción de la pérdida de peso en ratones a los que se administró anti-ZAG, en comparación con ratones a los que se administró BRL37344 (modelo de caquexia).

La figura 27 es un diagrama gráfico que muestra tolerancia a la glucosa de ratones ob/ob tratados con el agonista de β_3 , BRL37344 en ausencia y presencia de un anticuerpo anti-ZAG.

La figura 28 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la lipólisis en adipocitos murinos epididimarios en respuesta a isoprenalina (Iso), ZAG y un anticuerpo anti-ZAG.

La figura 29 es un diagrama gráfico que muestra el cambio de peso en ratones ob/ob tratados con BRL en ausencia o presencia de anti-ZAG donde se añadió BRL 24 horas antes de anticuerpo anti-ZAG o al mismo tiempo.

La figura 30 es un diagrama gráfico que muestra una disminución de la proteólisis y un aumento de la síntesis muscular en ratones ob/ob tratados con ZAG.

La figura 31 es un diagrama gráfico que muestra el cambio de peso en ratones ob/ob tratados con y sin ZAG.

La figura 32 es un diagrama gráfico que muestra la temperatura corporal en ratones ob/ob tratados con y sin ZAG.

La figura 33 es un diagrama gráfico que muestra los niveles de glucosa en orina en ratones ob/ob tratados con y sin ZAG.

La figura 34 es un diagrama ilustrado de una transferencia Western que muestra ZAG en ratones ob/ob después de la administración oral. El tratamiento con rhZAG administrada por vía oral causa un aumento de ZAG murina expresada de forma endógena en el plasma.

La Figura 35 es un diagrama ilustrado de una transferencia de Western que muestra la expresión de ZAG en TAB de ratones ob/ob tratados con y sin ZAG humana (p.o.). El tratamiento con rhZAG administrada por vía oral causa un aumento de ZAG murina expresada de forma endógena en TAB.

La figura 36 es un diagrama gráfico que muestra el cambio de peso en ratones ob/ob tratados con y sin ZAG (p.o.) en ausencia o presencia de propranolol, un antagonista de β -AR general. El propranolol aumentó de 20 a 40 mg/kg en el día 3, tras lo cual el cambio en la pérdida de peso se alteró desde la pendiente negativa de los animales tratados con ZAG a la pendiente positiva de los animales no tratados.

La figura 37 es un diagrama gráfico que muestra el cambio de la temperatura corporal en ratones ob/ob tratados con y sin ZAG (p.o.) en ausencia o presencia de propranolol. El propranolol aumentó de 20 a 40 mg/kg en el día 3, tras lo cual, la temperatura corporal de los animales ZAG+Prop siguió los pasos de la de los animales no tratados.

La figura 38 es un diagrama ilustrado de una transferencia de Western que muestra ZAG usando anti-ZAG de ratón en suero de ratón de ratones tratados con y sin ZAG en ausencia o presencia de propranolol. ZAG murina endógena aumenta con el tratamiento con rhZAG administrado por vía oral, y dicho aumento es bloqueado por el propranolol.

La figura 39 es un diagrama ilustrado de una transferencia de Western que muestra ZAG usando ZAG anti-humano contra suero de ratón de ratones tratados con y sin ZAG en ausencia o presencia de propranolol. No se detecta ZAG humana en suero de ratón con o sin propranolol.

La figura 40 es un diagrama gráfico que muestra niveles de glucosa durante un ensayo de tolerancia a la glucosa. en ratones ob/ob tratados con y sin ZAG (p.o.) en ausencia o presencia de propranolol.

La figura 41 es un diagrama ilustrado de una transferencia Western que muestra ZAG en ratones ob/ob después

de la administración oral. El tratamiento con rhZAG administrada por vía oral causa un aumento de ZAG murina expresada de forma endógena en el plasma.

5 La Figura 42 es un diagrama ilustrado de una transferencia de Western que muestra la expresión de ZAG en TAB de ratones ob/ob tratados con y sin ZAG humana (p.o.).

La figura 43 es un diagrama ilustrado que muestra el efecto de ZAG sobre la síntesis y degradación de proteínas en el músculo esquelético de ratones ob/ob.

10 La figura 44 es un diagrama ilustrado que muestra el efecto de ZAG sobre las rutas de señalización en el músculo esquelético de ratones ob/ob.

15 La figura 45 es un diagrama ilustrado que muestra el efecto de ZAG sobre la síntesis y degradación de proteínas en el músculo esquelético de ratones ob/ob.

La figura 46 es un diagrama ilustrado de una autorradiografía de ¹⁴C ZAG que muestra los niveles de ZAG en el estómago y el plasma de ratón ob/ob tratado p.o., siendo tomadas las muestras 24 horas después del tratamiento.

20 La figura 47 es un diagrama gráfico que muestra el cambio de peso en ratones ob/ob tratados con y sin 50 µg de ZAG (p.o./sondaje gástrico).

25 La figura 48 es un diagrama gráfico que muestra los niveles de glucosa en orina en ratones ob/ob tratados con y sin 50 µg de ZAG (p.o./sondaje gástrico).

30 La figura 49 es un diagrama ilustrado de una transferencia de Western. Anti-ZAG disminuye los efectos causados por BRL37344 *in vivo*: transferencia de Western de UCP3 en TAP de ratones ob/ob tratados con y sin BRL en ausencia o presencia de Anti-ZAG. El tratamiento de ratones ob/ob con BRL37344 causa un aumento de UCP3 en TAP, un efecto que se bloquea por la administración de anticuerpos anti-ZAG.

La figura 50 es un diagrama ilustrado de una transferencia de Western. ZAG administrada por vía oral a ratones ob/ob causa una regulación positiva de ZAG murina endógena en plasma y en TAB. La transferencia de Western de ZAG de ratón en muestras dosificadas con rhZAG p.o. de plasma (parte superior) y TAB (parte inferior).

35 La figura 51 es un diagrama ilustrado de una transferencia de Western. El propranolol bloquea el aumento del ZAG sérica murina debido al tratamiento con rhZAG p.o., pero la ZAG humana administrada no se encuentra en el plasma. Transferencia de Western de ZAG usando anti-ZAG de ratón en suero de ratón de ratones tratados con y sin ZAG en ausencia o presencia de propranolol (parte superior). No se detecta ZAG humana en el suero de ratón. Transferencia de Western de ZAG usando anti-ZAG humana en suero de ratón de ratones tratados con y sin ZAG en ausencia o presencia de propranolol (parte inferior).

45 La figura 52A es un diagrama gráfico que muestra el efecto de la concentración de ZAG sobre la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con β1-AR (■), β2-AR (□) y β3-AR (rayado). La figura 52B es un diagrama gráfico que muestra el efecto de la isoprenalina (10 µM) sobre la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con β1- (■), β2- (□) y β3-AR (rayado) en ausencia o presencia de SR59230A (10 µM). Las diferencias en los niveles basales de AMP cíclico se indican como a, p<0,05 o c, p<0,001.

50 La figura 52C es un diagrama gráfico que muestra los niveles de ARNm. Expresión de β1-, β2- y β3-AR en células CHO-K1 transfectadas con los genes humanos respectivos como números absolutos de moléculas de ARNm de β-AR/µg de ARN total, medida por RT-en tiempo real-PCR (recuadros rellenos) en comparación con la expresión de GAPDH en la misma muestra (recuadros vacíos). La figura 52D es un diagrama gráfico que muestra la producción de AMP cíclico en células CHO-K1 transfectadas con β1-, β2- y β3-AR humanos en respuesta a la forskolina (20 µM). (recuadros rellenos) en relación a los niveles basales (recuadros vacíos).

55 Las figuras 52E, 52F y 52G son un diagrama gráfico que muestra la unión específica de ZAG a las células CHO-K1 transfectadas con β1- (figura 52E), β2- (figura 52F) y β3-AR (figura 52G) humanos en ausencia (■) o presencia (▲) de 100 uM de ZAG no etiquetado. La unión de concentraciones similares de ZAG congelado y descongelado (X) también se indica.

60 La figura 52H es un diagrama gráfico que muestra la actividad lipolítica de ZAG (0,58 µM), ya sea fresca (vacío) o congelada y descongelada una vez (líneas de puntos), en comparación con la isoprenalina (Iso; 10 µM) (relleno) en adipocitos epididimarios murinos. Las diferencias con respecto al control se muestran como c, p<0,001, mientras que las diferencias entre ZAG fresco y congelado y en presencia de SR59230A se muestran como f, p<0,001.

65 Las figuras 53A-53C son diagramas gráficos que muestran el efecto del propranolol sobre el peso corporal (53A),

5 la temperatura corporal (53B) y la excreción urinaria de glucosa (53C) en ratones ob/ob tratados con ZAG. Los animales se dividieron en 4 grupos (n=5 por grupo) para recibir la administración diaria de ZAG (50 mg, iv) (■), ZAG + propanolol (40 mgkg⁻¹, po) (▲), mientras que los controles recibieron PBS (◆) o PBS y propanolol (X). Las diferencias con respecto a PBS se muestran como c, p<0,001, mientras que las diferencias con respecto a ZAG solo, se muestran como f, p<0,001.

La figura 53D es un diagrama ilustrado de la histología hepática después de 60 días que compara secciones tratadas con control y de ejemplo tratadas con ZAG.

10 Las figuras 54A son diagramas gráficos que muestran áreas totales bajo las curvas de glucosa (AUC) en unidades arbitrarias y niveles de glucosa en plasma durante un ensayo de tolerancia a la glucosa 3 días después del inicio de ZAG (B) en comparación con PBS (□)

La figura 54B es un diagrama gráfico que muestra los niveles de insulina en plasma durante el ensayo de tolerancia a la glucosa descrito en la (figura 54A).

15 La figura 54C es un diagrama gráfico que muestra la captación de glucosa en el músculo gastrocnemio aislado de ratones ob/ob en ausencia o presencia de insulina (100 nM). Los ratones ob/ob se trataron con ZAG con o sin propanolol durante 7 días antes de la extirpación del músculo.

20 La figura 54D es un diagrama gráfico que muestra la captación de glucosa en adipocitos epididimarios de ratones ob/ob en ausencia o presencia de insulina (10 nM). Los animales recibieron los tratamientos indicados durante 7 días antes de la extirpación de TAB.

25 Las figuras 54E y 54F son diagramas gráficos que muestran los niveles de TG (figura 54E) y NEFA (figura 54F) en ratones ob/ob tratados con PBS o ZAG, con o sin propanolol durante 7 días.

30 Las figuras 54G y 54H son diagramas ilustrados de transferencias de Western que muestran la expresión de Glut 4 en Gastrocnemio (54G) y TAB (54H) de ratones ob/ob en presencia de ZAG o insulina o ambas. Las diferencias con respecto a los controles se muestran como b, p<0,01 o c, p<0,001, mientras que las diferencias con respecto a ZAG solo, se muestran como d, p<0,05 o f, p<0,001. La figura 55A es un diagrama ilustrado de una transferencia Western.

35 Las figuras 55A, 55B y 55C son diagramas ilustrados que muestran la expresión de β3-AR después del tratamiento de ratones ob/ob con ZAG (35 μg; i.v. día⁻¹) durante 5 días. Transferencias de Western que muestran la expresión de β3-AR en el músculo gastrocnemio (54A), TAP (54B) y TAB (54C) de ratones ob/ob tratados con PBS o ZAG. El análisis densitométrico es el promedio de tres transferencias de Western distintas. Las diferencias con respecto al control se muestran como c, p<0,001.

40 Las figuras 56A, 56B y 56C son diagramas ilustrados de la expresión de β1- y β2-AR en el músculo gastrocnemio (56A), TAB (56B) y corazón (56C) después del tratamiento de ratones ob/ob con ZAG (35 μg; iv, diariamente) durante 5 días. Las diferencias con respecto a los animales tratados con PBS se muestran como a, p <0,05. Las figuras 57A, 57B, 57C y 57D son diagramas ilustrados del efecto de ZAG sobre la expresión de proteínas de desacoplamiento. Transferencias de Western que muestran la expresión de UCP1, que muestran la expresión de UCP1 en TAP (57A) y TAB (57B), y la expresión de UCP3 en TAB (57C) y AMPK en el músculo gastrocnemio (57D) en ratones ob/ob tras el tratamiento con PBS o ZAG (35 μg; iv, diariamente) durante 5 días. El análisis densitométrico es el promedio de tres transferencias distintas. Las diferencias con respecto a los animales tratados con PBS se muestran como c, p<0,001.

50 Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se basa en la observación de que los anticuerpos anti-Zinc-α₂-glucoproteína (ZAG) humana reducen la pérdida de peso en modelos de caquexia. Como tal, la divulgación proporciona métodos para prevenir la pérdida de peso en situaciones de caquexia en un sujeto. También se proporcionan tratamientos combinatorios para lograr una reducción en la pérdida de peso en un sujeto con caquexia.

55 En el presente documento se proporcionan formulaciones y métodos para tratar mamíferos y/o complementar una dieta humana o animal. Los métodos pueden incluir ingerir una o más de las formulaciones descritas durante ciertos períodos de tiempo y/o en un cierto orden. También se proporcionan kits que comprenden una o más de las formulaciones. Como tal, la presente invención se basa en la observación de que la zinc-α₂-glucoproteína recombinante (ZAG) produce una disminución en el peso corporal y un aumento en la capacidad de respuesta a la insulina en sujetos sin efecto sobre la ingesta de alimentos.

60 Antes de describir las presentes composiciones y métodos, debe entenderse que esta invención no se limita composiciones, métodos y condiciones experimentales particulares descritos, como tales las composiciones, métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es únicamente con los fines de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea una

limitación, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente en las reivindicaciones adjuntas.

Tal como se usan en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", y "el", "la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo que se describe en el presente documento que serán evidentes para los expertos en la materia después de leer esta divulgación y así sucesivamente.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque pueden utilizarse en la práctica o el ensayo de la invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

La secuencia de aminoácidos completa de ZAG se ha publicado en un artículo titulado "Complete amino acid sequence of human plasma Zinc- α 2-glycoprotein and its homology to histocompatibility antigens" de T. Araki et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85, 679-683, en el que se demostró que la glucoproteína estaba formada por una única cadena polipeptídica de 276 residuos de aminoácidos que tienen tres estructuras de dominio distintas (A, B y C) e incluye dos puentes disulfuro junto con glucanos enlazados por N en tres sitios de glucosilación. Esta secuencia de aminoácidos del componente polipeptídico se establece en la figura 10 de las figuras adjuntas. Aunque algunas publicaciones posteriores han indicado que la composición de la ZAG humana puede variar algo cuando se aísla en diferentes fluidos corporales o tejidos, todas las preparaciones de este material tienen sustancialmente las mismas características inmunológicas. Como han indicado H. Ueyama, et al. (1991) "Cloning and nucleotide sequence of a human Zinc- α 2-glycoprotein cDNA and chromosomal assignment of its gene", Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 696-703, se ha aislado el ADNc de ZAG de bibliotecas de hígado humano y de glándula prostática y también se ha aislado el gen, como indican Ueyama et al., (1993) "Molecular cloning and chromosomal assignment of the gene for human Zinc- α 2-glycoprotein", Biochemistry 32, 12968-12976. H. Ueyama et al., también han descrito, en J. Biochem. (1994) 116, 677-681, estudios sobre ADNc de ZAG de hígado de rata y ratón que, junto con la glucoproteína expresada por los correspondientes ARNm, se han secuenciado y comparado con el material humano. Aunque se descubrieron diferencias detalladas como cabría esperar de diferentes especies, se descubrió un elevado grado de homología de la secuencia de aminoácidos con más de un 50 % de identidad con el homólogo humano (más de un 70 % de identidad dentro del dominio B de la glucoproteína). De nuevo, se han observado propiedades inmunológicas comunes entre la ZAG humana, de rata y de ratón.

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

Como se describen en el presente documento, los polipéptidos o proteínas ZAG incluyen variantes de proteínas de tipo silvestre que conservan su función biológica. Como tal, Como tal, uno o más de los residuos de una proteína ZAG se pueden alterar para producir una proteína variante o truncada, siempre que la variante retenga su actividad biológica nativa. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen, por ejemplo, aspártico-glutámico como aminoácidos ácidos; lisina/arginina/histidina como aminoácidos básicos; leucina/isoleucina, metionina/valina, alanina/valina como aminoácidos hidrófobos; serina/glicina/alanina/treonina como aminoácidos hidrófilos. La sustitución de aminoácidos conservativa también incluye agrupaciones basadas en cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen sulfuro es cisteína y metionina. Por ejemplo, es razonable esperar que el reemplazo de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente no tenga un efecto principal sobre las propiedades del polipéptido variante resultante.

Las sustituciones de aminoácidos que entran dentro del alcance de la divulgación, se realizan, en general,

seleccionando sustituciones que no difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura del esqueleto peptídico en el área de la sustitución, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Sin embargo, la divulgación también contempla variantes con sustituciones no conservativas.

5 Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en este documento a menos que se distinga de otra manera para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Estos términos también incluyen proteínas que se modifican de forma postraducciona l a través de reacciones que incluyen glucosilación, acetilación y fosforilación.

10 Como se analizó anteriormente, la presente divulgación incluye el uso de un fragmento funcional de un polipéptido o proteína ZAG. Un fragmento funcional, se caracteriza, en parte, por tener o afectar a una actividad asociada con la pérdida de peso, disminuir el nivel de glucosa en sangre, aumentar la temperatura corporal, mejorar la captación tisular de glucosa, aumentar la expresión de los receptores Bet3, aumentar la expresión de ZAG, aumentar la expresión de Glut 4, y/o aumentar la expresión de UCP 1 y UCP 3. Por tanto, el término "fragmento funcional", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que retiene una o más funciones biológicas de ZAG. Los métodos para identificar dicho fragmento funcional de un polipéptido ZAG, son generalmente conocidos en la técnica.

20 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye una referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular, e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. El término también incluye formas genéticamente modificadas, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). El término "anticuerpo" también incluye formas de unión a antígeno de anticuerpos, incluyendo fragmentos con capacidad de unión a antígeno (por ejemplo, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rIgG. Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.). Véase también, por ejemplo, Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York (1998). El término también se refiere a fragmentos Fv monocatenarios recombinantes (scFv). El término anticuerpo también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Las moléculas bivalentes y biespecíficas se describen en, por ejemplo, Kostelny et al. (1992) J Immunol 148:1547, Pack y Pluckthun (1992) Biochemistry 31:1579, Hollinger et al., 1993, citado anteriormente, Gruber et al. (1994) J Immunol: 5368, Zhu et al. (1997) Protein Sci 6:781, Hu et al. (1996) Cancer Res. 56:3055, Adams et al. (1993) Cancer Res. 53:4026 y McCartney, et al. (1995) Protein Eng. 8:301.

35 Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular puede generarse mediante métodos recombinantes tales como la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, véase, por ejemplo, Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989); Ward et al., Nature 341:544-546 (1989); y Vaughan et al., Nature Biotech. 14:309-314 (1996), o inmunizando a un animal con el antígeno o con el ADN que codifica el antígeno.

40 Típicamente, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y ligera. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable, (las regiones también se conocen como "dominios"). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada contienen cuatro regiones "marco" interrumpidas por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". La extensión de las regiones marco y las CDR se han definido. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para colocar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

50 Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N, y también se identifican típicamente por la cadena en la que está ubicada la CDR particular. Por tanto, una V_H CDR3 está ubicada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una V_L CDR1 es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra.

55 Las referencias a "V_H" o una "V_H" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena pesada de un Fv, scFv o Fab. Las referencias a "V_L" o una "V_L" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo la cadena ligera de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

60 Un anticuerpo que tiene una región constante sustancialmente idéntica a una región constante de anticuerpo IgG de origen natural se refiere a un anticuerpo en el que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica, es decir, al menos aproximadamente el 85-90 %, y preferentemente al menos el 95 % idéntica, a la secuencia de aminoácidos de la región constante del anticuerpo IgG de origen natural.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" no se limita a los anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo

que se deriva de un solo clon, incluido cualquier clon eucariota, procariota o fago, y no el método por el cual se produce. Los anticuerpos monoclonales útiles con la presente divulgación pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma, incluyendo las conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1988); Hammerling et al., en: "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas," Elsevier, N. Y. (1981), págs. 563-681.

Por tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos quiméricos, primatizados, humanizados o humanos.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de inmunoglobulina en la que (a) la región constante, una parte de la misma, se altera, se sustituye o se intercambia de forma que el sitio de unión al antígeno (región variable) esté unido a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula completamente diferente que transmite nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una parte de la misma, se altera, se sustituye o se intercambia por una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202-1207 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214-221 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989); las patentes de Estados Unidos N.º 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

La expresión "anticuerpo humanizado" o "inmunoglobulina humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende un marco humano, al menos una y preferentemente todas las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano, y en la que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente el 85-90 %, y preferentemente al menos el 95 % idéntica. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativa. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. A menudo, los residuos del marco en las regiones del marco humano se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de la CDR y los residuos de marco para identificar residuos de marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos de marco inusuales en posiciones particulares. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 6.180.370. Los anticuerpos pueden humanizarse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, el injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; las patentes de Estados Unidos N.º 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), remodelación o acondicionamiento de superficie (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Mol. Immunol., 28:489-498 (1991); Studnicka et al., Prot. Eng. 7:805-814 (1994); Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973 (1994), y transposición de cadenas (patente de Estados Unidos N.º 5.565.332).

En determinadas realizaciones, los anticuerpos completamente "humanos" pueden ser deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir mediante diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse las patentes de Estados Unidos n.º 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741. Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995). Para una descripción detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; patente europea n.º 0 598 877; las patentes de Estados Unidos N.º 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, compañías tales como Abgenix, Inc. (Fremont, California) y Medarex (Princeton, N.J.) pueden participar para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconozcan un epítipo seleccionado utilizando una técnica denominada "selección guiada". En esta solución, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers et al., Biotechnology 12:899-903 (1988)).

El término "anticuerpo primatizado" se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de mono y regiones constantes humanas. Los métodos para producir anticuerpos primatizados son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.658.570; 5.681.722; y 5.693.780.

Como se usan en el presente documento, los términos "epítopo" o "determinante antigénico" se refiere a un lugar sobre un antígeno al que se une un anticuerpo. Los epítomos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente están preservados frente a la exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítomos formados por el plegamiento terciario normalmente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítomos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear en 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

Los anticuerpos de "clase IgG" se refieren a los anticuerpos de IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. La numeración de los residuos de aminoácidos en las cadenas pesada y ligera es la del índice UE (Kabat, et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª ed., National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); en el presente documento se usa el esquema de numeración UE).

Los procedimientos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden generar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir una proteína, tal como el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 1, codificada por un ácido nucleico o un fragmento funcional del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sabe que es inmunógena en el mamífero que se está inmunizando. Ejemplos de dichas proteínas inmunógenas incluyen, entre otros, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Los ejemplos de adyuvantes que se pueden emplear incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintética). Un experto en la materia puede seleccionar el protocolo de inmunización sin excesiva experimentación.

Los anticuerpos pueden, como alternativa, ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para producir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. El agente inmunizante incluirá típicamente un polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o un fragmento funcional del mismo.

Los anticuerpos humanos se pueden producir también usando varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 (1991)). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, p. 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol. 147(1):86-95 (1991)). De manera similar, los anticuerpos humanos se pueden producir mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Tras la provocación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995).

En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo es un Fv monocatenario (scFv). Las regiones V_H y V_L de un anticuerpo scFv comprenden una cadena sencilla que se pliega para crear un sitio de unión a antígeno similar al que se encuentra en los anticuerpos bicatenarios. Una vez plegadas, las interacciones no covalentes estabilizan el anticuerpo monocatenario. Si bien las regiones V_H y V_L de algunas realizaciones de anticuerpos pueden unirse directamente entre sí, un experto apreciará que las regiones pueden estar separadas por un enlazador peptídico que consiste en uno o más aminoácidos. Los enlazadores peptídicos y su uso son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Huston et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 8:5879 (1988); Bird et al., Science 242:4236 (1988); Glockshuber et al., Biochemistry 29:1362 (1990); patente de Estados Unidos n.º 4.946.778, patente de Estados Unidos n.º 5.132.405 y Stemmer et al., Biotechniques 14:256-265 (1993). En general, el enlazador peptídico no tendrá ninguna actividad biológica específica más que para unir las regiones o para preservar alguna distancia mínima u otra relación espacial entre la V_H y la V_L. Sin embargo, los aminoácidos constituyentes del enlazador peptídico pueden seleccionarse para influir en algunas propiedades de la molécula, tales como el plegamiento, la carga neta o la hidrofobicidad. Los anticuerpos Fv monocatenarios (scFv) incluyen opcionalmente un enlazador peptídico de no más de 50 aminoácidos, generalmente no más de 40 aminoácidos, preferentemente no más de 30 aminoácidos, y más preferentemente no más de 20 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos de la divulgación, el enlazador peptídico es un concatámero de la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 7), preferentemente 2,

3, 4, 5 o 6 de dichas secuencias. Sin embargo, debe apreciarse que pueden realizarse algunas sustituciones de aminoácidos dentro del enlazador. Por ejemplo, una valina puede sustituir a una glicina.

Se han descrito métodos para producir anticuerpos scFv. Véase, Huse et al., citado anteriormente; Ward et al. citado anteriormente); y Vaughan et al., citado anteriormente. En resumen, se aísla el ARNm de linfocitos B de un animal inmunizado y se prepara el ADNc. El ADNc se amplifica usando cebadores específicos para las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas. Los productos de PCR se purifican y las secuencias de ácido nucleico se unen. Si se desea un enlazador peptídico, las secuencias de ácido nucleico que codifican el péptido se insertan entre las secuencias de ácido nucleico de la cadena pesada y ligera. El ácido nucleico que codifica el scFv se inserta en un vector y se expresa en la célula huésped apropiada. El scFv que se une específicamente al antígeno deseado se encuentra típicamente al realizar un barrido panorámico de una biblioteca de presentación en fagos. El barrido panorámico se puede realizar mediante cualquiera de varios métodos. El barrido panorámico se puede realizar convenientemente usando células que expresan el antígeno deseado en su superficie o usando una superficie sólida revestida con el antígeno deseado. De manera conveniente, la superficie puede ser una perla magnética. Los fagos no unidos se eliminan por lavado de la superficie sólida y los fagos unidos se eluyen.

Se ha demostrado previamente que ZAG y/o sus fragmentos producen una reducción de peso o una reducción de la obesidad en mamíferos, como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 6.890.899 y 7.550.429 y en la publicación estadounidense n.º 2010/0173829. La presente divulgación demuestra que los anticuerpos anti-ZAG y/o sus fragmentos funcionales reducen la pérdida de peso en modelos de caquexia. Por lo tanto, se contempla que los métodos descritos en el presente documento proporcionan un efecto detectable sobre los síntomas asociados con caquexia y/o enfermedades asociadas con la enfermedad de atrofia muscular progresiva.

Por consiguiente, en el presente documento se describe un método de mejora de los síntomas de la caquexia en un sujeto. El método incluye administrar al sujeto que necesita dicho tratamiento una dosis terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la actividad biológica de un polipéptido que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1. En un aspecto de la divulgación, el régimen de tratamiento puede ser por meses (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses), o años. En otro aspecto de la divulgación, el polipéptido se administra durante un período de hasta 21 días o más. En otro aspecto de la divulgación, la mejoría de los síntomas es detectable en días (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días), semanas (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 semanas), o meses (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses) desde el inicio del tratamiento. En otro aspecto de la divulgación, el régimen de tratamiento es de aproximadamente 10 días en el que hay una mejoría de los síntomas asociados con la caquexia después del tratamiento. En otro aspecto de la divulgación, el régimen de tratamiento es de aproximadamente 21 días en el que hay una mejoría de los síntomas asociados con la caquexia después del tratamiento.

Además, se ha observado que un agente movilizador de lípidos que tiene características similares de ZAG y/o sus fragmentos también se ha usado para conseguir una reducción de peso o reducción de la obesidad en mamíferos, como se describe en la solicitud publicada de los Estados Unidos n.º 2006/0160723. Por último, se ha demostrado que ZAG y/o sus fragmentos funcionales aumentan la sensibilidad a la insulina de los adipocitos y el músculo esquelético, y producen un aumento en la masa muscular a través de un aumento en la síntesis de proteínas junto con una disminución en la degradación de proteínas independientemente de si se observa una reducción de peso o reducción de la obesidad durante el tratamiento (véase el número de serie de Estados Unidos 12/614.289).

Adicionalmente, los agonistas de $\beta 3$ son agentes sensibilizadores de insulina efectivos en roedores y su potencial para reducir los niveles de glucosa en sangre en humanos ha sido objeto de investigación. La activación de los adrenorreceptores agonistas de $\beta 3$ estimula la oxidación de las grasas, reduciendo de este modo las concentraciones intracelulares de los metabolitos, incluyendo acil CoA graso y diacilglicerol, que modulan la señalización de la insulina. Además, se contempla en el presente documento que ciertos agonistas del receptor $\beta 3$ pueden no haber tenido éxito en ensayos clínicos dado que una categoría de receptores $\beta 3$ disponible para estos agentes está ubicada en el sistema digestivo y particularmente en la boca, faringe, esófago y estómago, lo que da como resultado exposición mínima, si alguna, del agonista a la mayoría de estos receptores. Esta teoría está respaldada por la observación de que se descubrió que varios de los agentes terapéuticos agonistas de $\beta 3$ eran eficaces, pero tenían una biodisponibilidad limitada en el espacio plasmático.

En el presente documento se proporcionan varias formulaciones para su uso en la invención. Una formulación puede estar en cualquier forma, por ejemplo, líquido, sólido, gel, emulsión, polvo, comprimido, cápsula o cápsula de gel (por ejemplo, cápsula de gel blanda o dura). Una formulación típicamente incluirá una o más composiciones que se han purificado, aislado o extraído (por ejemplo, de plantas) o sintetizadas, que se combinan para proporcionar un beneficio (por ejemplo, un beneficio para la salud además de un beneficio nutricional) cuando se usan para complementar los alimentos en una dieta.

En determinadas realizaciones, las cantidades recomendadas por día o por porción de una formulación o de ingredientes proporcionados en una formulación pueden establecerse en el presente documento. En determinados casos, como reconocerá un experto en la materia, se podría variar la forma de la formulación, por ejemplo, sustituyendo un polvo por una cápsula, un comprimido por una cápsula, una cápsula de gel por un comprimido, una

cápsula de gel por una cápsula, un polvo por una cápsula de gel, o cualquiera de dichas combinaciones, para proporcionar dichas cantidades recomendadas por día o por porción de una formulación.

5 Cualquiera de las formulaciones puede prepararse usando métodos bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mezclando los ingredientes citados en las cantidades adecuadas. Los ingredientes para inclusión en una formulación están generalmente disponibles en el mercado.

10 Por consiguiente, en el presente documento se describe una formulación que incluye ZAG o un fragmento funcional de la misma. Por ejemplo, la ZAG puede ser una ZAG de mamífero, tal como una ZAG humana como se muestra en la SEQ ID NO: 1, o fragmentos de la misma. Sin embargo, debe entenderse que la ZAG puede derivarse de cualquier fuente siempre que la ZAG retenga la actividad de la ZAG de tipo silvestre. En un aspecto de la divulgación, incluye además un vehículo farmacéuticamente aceptable, que constituye uno o más ingredientes accesorios.

15 El término "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier individuo o paciente en el que se realizan los métodos objeto. Generalmente, el sujeto es humano, aunque como apreciarán los expertos en la materia, el sujeto puede ser un animal. Así otros animales, incluyendo mamíferos tales como roedores (incluyendo ratones, ratas, hámsteres y cobayas), gatos, perros, conejos, animales de granja incluyendo vacas, caballos, cabras, oveja, cerdos, etc., y primates (incluyendo monos, chimpancés, orangutanes y gorilas) se incluyen en la definición de
20 sujeto.

25 La caquexia se asocia comúnmente con varias patologías, incluyendo los procesos inflamatorios agudos asociados con enfermedades críticas y enfermedades inflamatorias crónicas, cáncer, SIDA, sepsis, EPOC, insuficiencia renal, artritis, insuficiencia cardíaca congestiva, distrofia muscular, diabetes, sarcopenia del envejecimiento, traumatismo grave (por ejemplo, inmovilización ortopédica de una extremidad), acidosis metabólica, atrofia por denervación e ingravidez.

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

35 En algunas realizaciones, las formulaciones para su uso en la invención están concebidas para ser administradas por vía oral diariamente. Sin embargo, otras formas de administración están igualmente previstas. Como se usan en el presente documento, los términos "administración" o "administrar" se definen como que incluyen un acto de proporcionar un compuesto o composición farmacéutica de la invención a un sujeto que necesita tratamiento. Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se usa en el presente documento significa modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente por vía oral o mediante inyección e incluyen, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, inyección epidural e intraesternal e infusión. Las expresiones "administración sistémica", "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado por vía periférica" tal como se usa en el presente documento significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material distinto de directamente en el sistema nervioso central, de manera que entra en el sistema del sujeto y, por tanto, se somete al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea. Como tal, en un aspecto de la divulgación, los anticuerpos anti-ZAG, fragmentos de los mismos y/o formulaciones descritas en el presente documento se administran a un sujeto por inhalación, por vía intranasal, por vía bucal, por vía sublingual, por vía intravenosa, por vía intramuscular y/o por vía oral de acuerdo con la invención. En otro aspecto de la divulgación, los anticuerpos o composiciones de los mismos se formulan en composiciones de fusión rápida, composiciones de liberación prolongada y similares.

45 50 Como se usa en el presente documento, el término "mejorar" o "tratar" significa que los signos clínicos y/o los síntomas asociados con la caquexia se reducen como resultado de las acciones realizadas. Los signos o síntomas que se monitorizarán serán característicos de la caquexia y serán bien conocidos por el especialista clínico, al igual que los métodos para monitorizar los signos y afecciones. Además de la pérdida de masa muscular/adiposa, los síntomas ejemplares asociados con la caquexia incluyen, pero sin limitación, fiebre, dolor de cabeza, dolor crónico, malestar corporal, desmayos, convulsiones asociadas con fiebre, choque, palpitaciones, soplo cardíaco, gangrena, epistaxis, hemoptisis, tos, dificultad para respirar, respiración sibilante, hiperventilación e hipoventilación, respiración bucal, hipo y dolor torácico, dolor abdominal, náuseas o vómitos, acidez estomacal, halitosis y flatulencia, en comparación con un sujeto normal o un sujeto que no tiene caquexia. Como tal, una mejoría de los síntomas asociados con la caquexia incluye, pero sin limitación, disminuir o reducir la pérdida de peso en el sujeto y revertir uno o más de los síntomas enumerados anteriormente.

65 Como se usan en el presente documento, los términos "reducir" e "inhibir" se usan juntos porque se reconoce que, en algunos casos, una disminución puede reducirse por debajo del nivel de detección de un ensayo particular. Como tal, puede que no siempre quede claro si el nivel de expresión o actividad está "reducido" por debajo del nivel de detección de un ensayo, o si está completamente "inhibido". No obstante, será claramente determinable, tras un

tratamiento de acuerdo con los presentes métodos, que la cantidad de pérdida de peso en un sujeto se ha reducido al menos con respecto al nivel previo al tratamiento.

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

25 Por consiguiente, en el presente documento se describe un método de complementar una dieta humana o animal. El método incluye administrar al sujeto un polipéptido ZAG o un fragmento del mismo. En otro aspecto de la divulgación, el método incluye ingerir una formulación que incluye un polipéptido ZAG, tal como el polipéptido ZAG humano como se expone en la SEQ ID NO: 1. Una formulación puede ingerirse sola o en combinación con cualquier otra formulación conocida, en cualquier orden y durante períodos de tiempo relativos variables. En determinados aspectos de la divulgación, determinadas formulaciones se usan antes de otras formulaciones, mientras que otras formulaciones se ingieren simultáneamente.

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

40 ZAG también contrarresta algunas de las características metabólicas del estado diabético, que incluyen una reducción de los niveles de insulina en plasma y una mejor respuesta en el ensayo de tolerancia a la glucosa. Por tanto, en el presente documento se desvela un método para disminuir los niveles de insulina en plasma en un sujeto. El método incluye administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de un polipéptido que tiene la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma. En un aspecto de la divulgación, la disminución de la insulina plasmática se produce dentro de los 3 días posteriores al inicio del tratamiento. En otro aspecto de la divulgación, el régimen de tratamiento se administra durante 10 días o más. En otro aspecto de la divulgación, el régimen de tratamiento se administra durante 21 días o más.

50 Además, se ha demostrado que ZAG aumenta la oxidación de la glucosa y aumenta la tasa metabólica de la glucosa tisular en ratones macho adultos. Este aumento en la utilización de la glucosa explicaría la caída de los niveles tanto de glucosa en sangre como de insulina en ratones ob/ob a los que se administró ZAG. La utilización de triglicéridos también aumentó en ratones a los que se administró ZAG, lo que explicaría la caída en los ácidos grasos no esterificados (NEFA) y los triglicéridos (TG) en plasma a pesar del aumento en el glicerol en plasma, indicativo de un aumento de la lipólisis. El aumento de la utilización de lípidos se anticiparía a partir de la mayor expresión de UCP1 y UCP3 en TAP y UCP3 en el músculo esquelético, lo que daría como resultado un aumento de la temperatura corporal. Por tanto, ZAG se identifica como un factor movilizador de lípidos capaz de inducir lipólisis en adipocitos blancos del ratón en un proceso dependiente de GTP, similar al inducido por las hormonas lipolíticas. Como tal, en un aspecto de la divulgación, la mejoría de los síntomas asociados con la hiperglucemia también incluye un aumento de la temperatura corporal de aproximadamente 0,5 °C a aproximadamente 1 °C durante el tratamiento. En un aspecto de la divulgación, el aumento de la temperatura corporal se produce dentro de los 4 días posteriores al inicio del tratamiento. En otro aspecto de la divulgación, la mejoría de los síntomas asociados con la hiperglucemia también incluye un aumento de la insulina pancreática en comparación con los niveles de insulina pancreática antes del tratamiento, ya que se necesita menos insulina para controlar la glucemia como resultado de la presencia de ZAG.

65 También se ha demostrado que ZAG contrarresta algunas de las características metabólicas del estado diabético, incluyendo una reducción de los niveles de insulina en plasma y una respuesta mejorada en el ensayo de tolerancia a la glucosa. Además, ZAG aumenta la capacidad de respuesta de los adipocitos epididimarios al efecto lipolítico de

un estimulante β 3-adrenérgico. ZAG también aumenta la expresión de HSL y ATGL en el tejido adiposo epididimario que se ha descubierto que se reduce en el estado isulino-resistente obeso. Los factores que regulan la expresión de HSL y ATGL no se conocen. Sin embargo, el inhibidor de ERK específico, PD98059, regulaba negativamente la expresión de HSL en respuesta a ZAG, lo que sugiere un papel para MAPK en este proceso. Los ratones que carecen de MAPK fosfatasa-1 tienen un aumento de las actividades de ERK y p38MAPK en TAB, y son resistentes a la obesidad inducida por la dieta debido a un mayor gasto de energía. Estudios previos han sugerido un papel para MAPK en la expresión de UCP3 inducida por ZAG en el músculo esquelético. La activación de ERK puede regular la lipólisis en los adipocitos mediante la fosforilación de residuos de serina de HSL, tales como Ser-600, uno de los sitios fosforilados por la proteína cinasa A.

Los resultados presentados en el presente documento muestran que la administración de ZAG a la rata también aumenta la expresión de ATGL y HSL en la rata. La ATGL puede ser importante en el almacenamiento excesivo de las grasas en la obesidad, ya que los ratones deficientes en ATGL tienen depósitos de grasa grandes y liberación de NEFA del TAB reducida en respuesta a isoproterenol, aunque sí mostraron una sensibilidad normal a la insulina. Por el contrario los ratones sin HSL, cuando se les alimentó con una dieta normal, tenían pesos corporales similares a los animales de tipo silvestre. Sin embargo, la expresión tanto de ATGL como de HSL se ha reducido en el TAB humano en el estado de obesidad resistente a la insulina en comparación con el estado sensible a la insulina y la reducción del peso también disminuyó los niveles de ARNm y de proteínas.

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

Aunque la ZAG aumentó la expresión de HSL en adipocitos epididimarios no hubo incremento alguno ni en los adipocitos subcutáneos ni en los viscerales. Se observó una situación similar con la expresión de la lipasa adiposa de triglicéridos (ATGL). La expresión de HSL y ATGL se correlacionó con la expresión de la forma activa (fosfo) de ERK. La expresión de HSL y ATGL en adipocitos epididimarios correlacionó con un incremento de la respuesta lipolítica al agonista de β 3, BRL37344. Este resultado sugiere que ZAG puede actuar sinérgicamente con agonistas de β 3 y sugiere que los anticuerpos anti-ZAG pueden actuar sinérgicamente con los antagonistas β 3.

Como se usa en el presente documento, el término "agonista" se refiere a un agente o análogo que es capaz de inducir una respuesta farmacológica total o parcial. Por ejemplo, un agonista puede unirse productivamente a un receptor e imitar la reacción fisiológica del mismo. Como se usa en el presente documento, el término "antagonista" se refiere a un agente o análogo que no provoca una respuesta biológica en sí misma al unirse a un receptor, pero bloquea o amortigua las respuestas mediadas por agonistas. Los métodos y formulaciones descritos en el presente documento pueden incluir la administración de anticuerpos anti-ZAG, o un fragmento funcional de los mismos, en combinación con un antagonista de β 3, tal como, pero sin limitación, BRL37344, o un agonista de β 3.

Los ejemplos de agonistas de β 3 que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación: epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina), isoprotenerol, isoprenalina, propranolol, alprenolol, arotinolol, bucindolol, carazolol, carteolol, clenbuterol, denopamina, fenoterol, nadolol, octopamina, oxiprenolol, pindolol, [(ciano)pindolol], salbuterol, salmeterol, teratolol, tecradina, trimetoquinolol, 3'-yodotrimetoquinolol, 3',5'-yodotrimetoquinolol, Amibegron, Solabegron, Nebivolol, AD-9677, AJ-9677, AZ-002, CGP-12177, CL-316243, CL-317413, BRL-37344, BRL-35135, BRL-26830, BRL-28410, BRL-33725, BRL-37344, BRL-35113, BMS-194449, BMS-196085, BMS-201620, BMS-210285, BMS-187257, BMS-187413, la sustitución CONH2 de SO3H de BMS-187413, los racematos de BMS-181413, CGP-20712A, CGP-12177, CP-114271, CP-331679, CP-331684, CP-209129, FR-165914, FR-149175, ICI-118551, ICI-201651, ICI-198157, ICI-D7114, LY-377604, LY-368842, KTO-7924, LY-362884, LY-750355, LY-749372, LY-79771, LY-104119, L-771047, L-755507, L-749372, L-750355, L-760087, L-766892, L-746646, L-757793, L-770644, L-760081, L-796568, L-748328, L-748337, Ro-16-8714, Ro-40-2148, (-)-RO-363, SB-215691, SB-220648, SB-226552, SB-229432, SB-251023, SB-236923, SB-246982, SR-58894A, SR-58611, SR-58878, SR-59062, SM-11044, SM-350300, ZD-7114, ZD-2079, ZD-9969, ZM-215001 y ZM-215967.

Los ejemplos de antagonistas de β -AR que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación:

propranolol, (-)-propranolol, (+)-propranolol, practolol, (-)-practolol, (+)-practolol, CGP-20712A, ICI-118551, (-)-bupranolol, acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, esmolol, nebivolol, metoprolol, acebutolol, carteolol, penbutolol, pindolol, carvedilol, labetalol, levobunolol, metipranolol, nadolol, sotalol y timolol.

5 Se ha sugerido que la inducción de la lipólisis en adipocitos de rata por la ZAG está mediada por un β 3-AR y el efecto de la ZAG sobre el tejido adiposo y la masa corporal magra también puede deberse a su capacidad para estimular el β 3-AR. Se ha demostrado que la inducción de la expresión de UCP1 por ZAG está mediada por la interacción con un β 3-AR. El incremento de la expresión de UCP1 en TAB también puede ser un efecto del β 3-AR a través del remodelado de precursores de adipocitos del tejido pardo, ya que se produce con el agonista de β 3-AR
10 CL316.243. Usando ratones knock-out el efecto antiobesidad de la estimulación de β 3-AR se ha atribuido principalmente a UCP1 en TAP y menos a UCP2 y UCP3 a través de la degradación dependiente de UCP1 de los NEFA liberados por el TAB. La captación de glucosa en tejidos periféricos de animales se estimula mediante la exposición al frío, un efecto también mediado por el β 3-AR. Sin embargo, el direccionamiento al β 3-AR ha sido más difícil en seres humanos que en roedores, ya que β 3-AR desempeña un papel menos prominente que los subtipos
15 β 1- y β 2-AR en el control de la lipólisis y el flujo sanguíneo nutritivo en el tejido adiposo abdominal subcutáneo humano. Sin embargo, a pesar de esto se ha demostrado que el agonista de β 3-AR CL316.243 aumenta la oxidación de las grasas en voluntarios jóvenes sanos de sexo masculino. Esto puede deberse a la capacidad de los agonistas β -adrenérgicos para aumentar el número de β 3-AR en las membranas plasmáticas de TAP.

20 Por consiguiente, en el presente documento se describe un método para tratar a un sujeto para conseguir una reducción en la pérdida de peso debido a la caquexia o una enfermedad asociada con la atrofia muscular progresiva. El método incluye administrar al sujeto que necesita dicho tratamiento una dosis terapéuticamente eficaz de un antagonista de β 3 en combinación con un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que se une al polipéptido que tiene la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto de la divulgación, el método incluye administrar
25 al sujeto que necesita dicho tratamiento una dosis terapéuticamente eficaz de un antagonista de β 3-AR en combinación con un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que se une al polipéptido que tiene la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1.

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

En diversas realizaciones de la invención y aspectos de la divulgación, el fin de combinar ZAG, agonistas de β -3AR y antagonistas de β -AR varía dependiendo del fin del tratamiento y el estado del sujeto.

40 En una realización que implica el tratamiento de la obesidad o un aspecto de la divulgación que implica el tratamiento de la diabetes en el que se desea activar el mecanismo de β -3AR para conseguir la lipólisis deseada, el consumo de glucosa, la sensibilización a la insulina, la síntesis de proteínas, el aumento del gasto energético, y similares. En esta circunstancia con algunos sujetos, se puede observar que la ZAG administrada, o más probablemente el agonista de β -3AR, exhibirá alguna actividad no deseada en uno o más de los valores de β -1AR o
45 β -2AR, lo que provoca efectos secundarios o la disminución de la eficacia deseada. Esta circunstancia requeriría la administración adicional de antagonistas de β -AR, a veces denominados "bloqueadores beta clásicos" para prevenir la actividad no deseada en el β -1AR o el β -2AR. Estos antagonistas de β -AR se seleccionarían preferentemente, pero no necesariamente, para bloquear el subtipo de receptor (uno de β -1AR, β -2AR) que está asociado con el efecto secundario o la mitigación de la eficacia.

50 En otro aspecto de la divulgación que implica el tratamiento de la caquexia. En la caquexia causada por diferentes enfermedades, y dentro de poblaciones de sujetos con una enfermedad determinada, se observan diferentes grados de caquexia y con diferentes proporciones de pérdida muscular y pérdida de grasa.

55 En otro aspecto, un sujeto caquético puede estar sufriendo de pérdida de masa muscular, pero sin pérdida de grasa o con algún grado de pérdida de grasa. Debido a que la pérdida muscular es típicamente un resultado clínicamente más indeseable, utilizar ZAG para causar algo de la acumulación de músculo que se produce en animales caquéticos tratados con ZAG, aunque también causa cierto grado de pérdida de grasa, puede ser deseable. Por tanto, tratar a tales sujetos con ZAG, un agonista de β -3AR, y opcionalmente como se ha descrito anteriormente,
60 antagonistas de β -AR, podría aumentar la masa muscular.

65 En otro aspecto, En otro aspecto, un sujeto caquético puede estar sufriendo pérdida de masa grasa, ya sea con una pérdida de masa muscular o no, o con algún grado de pérdida de masa muscular. En este caso, puede ser deseable desde un punto de vista clínico bloquear la pérdida de grasa, por lo que se usaría la administración de anticuerpos específicos para ZAG, con el fin de bloquear la acción causada por ZAG y, por lo tanto, disminuir la acción posterior de β -3AR.

En otro aspecto de la divulgación, implica el tratamiento de la lipodistrofia, en el que las masas de grasa son desproporcionadas con respecto a la distribución normal dentro de un sujeto, y en el que se desea la pérdida de masa grasa. En este caso, se desearía la administración de uno o más de ZAG, un agonista de β -3AR y un antagonista de β -AR, con un razonamiento similar al de la primera circunstancia.

5 Todos los métodos pueden incluir además la etapa de asociar los ingredientes activos con un vehículo farmacéuticamente aceptable, que constituye uno o más ingredientes accesorios. Como tal, en el presente documento se describen composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de sujetos que tienen síntomas asociados con caquexia. En un aspecto de la divulgación, la composición incluye como constituyente activo una
10 cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-ZAG como se analizó anteriormente, o un fragmento funcional del mismo, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles para formular una composición para administración a un sujeto son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas tales como agua o solución salina fisiológicamente tamponada, u otros disolventes o vehículos tales como glicoles, glicerol, aceites tales como aceite de oliva o ésteres orgánicos inyectables. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede contener compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar o aumentar la absorción del conjugado. Dichos compuestos fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, hidratos de carbono, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizantes o excipientes. Además, dichos compuestos fisiológicamente aceptables también pueden estar en forma de sal (es decir, equilibrados con un contraión, tal como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , NH_4^+ , etc.), siempre que el vehículo sea compatible con la vía de administración deseada (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, oral, etc.). Un experto en la materia sabría que la elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, depende, por ejemplo, de las características físico-químicas del agente terapéutico y de la vía de administración de la composición, que puede ser, por ejemplo, oral o parenteral tal como intravenosa, y por inyección, intubación u otro método conocido en la técnica. La composición farmacéutica también puede contener un segundo (o más) compuestos como un reactivo de diagnóstico, sustancia nutricional adicional, toxina o agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico contra el cáncer y/o una o más vitaminas.

30 Las formulaciones para su uso en la presente invención también pueden incluir uno o más excipientes. Los excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden incluirse en la formulación son tampones tales como tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos; proteínas, tales como albúmina de suero, colágeno y gelatina; sales tales como EDTA o EGTA, y cloruro de sodio; liposomas; polivinilpirolidona; azúcares, tales como dextrano, manitol, sorbitol y glicerol; propilenglicol y polietilenglicol (por ejemplo, PEG-4000, PEG-6000); glicerol; y glicina u otros aminoácidos. Los sistemas de tampón para su uso con las formulaciones incluyen tampones de citrato; acetato; bicarbonato; y fosfato.

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

45 Las formulaciones de suplementos nutricionales pueden incluir además cualquier número de ingredientes adicionales que se sabe que promueven la salud y/o la reducción de peso. Los ingredientes adicionales ejemplares incluyen, pero sin limitación, ingredientes de bajo índice glucémico, tales como fuentes de carbohidratos, fuentes de proteínas y fuentes de fibra dietética. Se ha demostrado que dichos ingredientes de bajo índice glucémico reducen el apetito y reducen la ingesta calórica diaria.

50 Un importante macronutriente del suplemento nutricional es el carbohidrato porque tiene la mayor influencia sobre la saciedad y la subsiguiente pérdida de peso. Como se usa en el presente documento, saciedad, se refiere a la sensación de plenitud entre una comida y la siguiente, y la saciedad se refiere a una sensación de plenitud que se desarrolla durante el progreso de una comida y contribuye a la terminación de la comida. Los alimentos con bajos índices glucémicos provocan un aumento más pequeño de la glucemia y la insulina y una mayor concentración de glucagón, lo que promueve la saciedad y previene el aumento de peso mejor que aquellos alimentos que contienen carbohidratos con índices más altos porque tardan más en digerirse y absorberse que los carbohidratos con altos índices glucémicos.

60 El "índice glucémico" es un sistema para predecir aumentos posteriores en la glucemia después de la ingestión de alimentos que contienen carbohidratos (Anderson, J. S. et al., *Modern Nutrition in Health and Disease*, ch. 70: 1259-86 (1994); Wolever, T. M. S. et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 846-54 (1991); Wolever, T. M. S. et al., *Diab. Care*, 12: 126-32 (1990)). El índice glucémico caracteriza la tasa de absorción de carbohidratos después de una comida. Se define como el área bajo la curva de respuesta glucémica durante un período de 2 horas después del consumo de 50 g de carbohidratos de un alimento de ensayo dividido por el área bajo la curva de un estándar, que es pan blanco o glucosa. El índice glucémico de los carbohidratos tiene el pico más alto de glucosa circulante en un período de 2 horas después de la ingestión de alimentos. Por el contrario, los carbohidratos de bajo índice glucémico causan un

pico más bajo de glucosa y un área bajo de la curva más pequeña.

Muchos factores determinan el índice glucémico de los alimentos. Estos incluyen el tipo de carbohidratos, el contenido de fibra, proteínas y grasas y el método de preparación (los alimentos recocidos provocan una mayor respuesta). En general, los carbohidratos de alto índice glucémico son altamente refinados y tienen una cantidad relativamente alta de glucosa o almidón en comparación con la lactosa, la sacarosa o la fructosa. Además, son bajos en fibra soluble. La inclusión de fibra es importante debido a la forma en que la fibra facilita la pérdida de peso al formar un gel con el alimento en el estómago. Esta acción gelificante reduce la tasa de vaciamiento gástrico y, por lo tanto, las tasas de digestión que promueven la saciedad. Otros factores que afectan a la saciedad son la cantidad de carbohidratos, la complejidad de los carbohidratos y los otros alimentos que se consumen simultáneamente con los carbohidratos (por ejemplo, fibra, proteína, grasa) (Ludwig, D. S., *J Nutr.*, 130: 280S-3S (2000); Wolever, T. M. S. et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 846-54 (1991); Wolever, T. M. S. et al., *Diab. Care*, 12: 126-32 (1990)). El pan y las patatas elevan la glucemia más que las judías. Otros alimentos que no contienen carbohidratos ingeridos o no se digieren al mismo tiempo que los carbohidratos (por ejemplo, grasa, fibra y proteína) reducen los niveles de glucosa e insulina en la sangre postprandial (Wolever, T. M. S., et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 846-54 (1991)).

La fuente de carbohidratos de bajo índice glucémico puede ser proporcionada por un solo carbohidrato o una combinación. La fuente de carbohidratos puede proporcionar además una fuente de fibra y puede ser un edulcorante natural, fructosa, cebada, konjac manano, psilio y combinaciones de los mismos. La fuente de proteína es de alto valor biológico y se selecciona de al menos uno de los siguientes: concentrado de proteína de suero, caseína, soja, leche, huevo y combinaciones de los mismos. Adicionalmente, el suplemento nutricional puede contener, micronutrientes, vitaminas, minerales, suplementos dietéticos (por ejemplo, hierbas), nutrientes, emulsionantes, saborizantes y compuestos comestibles.

En un aspecto de la divulgación, En un aspecto de la descripción, la formulación de suplemento nutricional puede incluir además un carbohidrato para endulzar el suplemento nutricional. Los carbohidratos ejemplares útiles para endulzar el suplemento nutricional incluyen, pero sin limitación, fructosa, zumo de caña evaporado, inulina, agave, miel, sirope de arce, sirope de arroz integral, sirope de malta, azúcar de dátiles, concentrado de zumo de frutas y concentrado de zumo de frutas mixtas.

La fibra dietética que puede ser adecuada para su uso en la presente divulgación incluye, pero sin limitación, celulosa, semillas, hemicelulosa (por ejemplo, salvado, granos enteros), polifruktosa (por ejemplo, inulina y oligofruktanos), gomas de polisacárido (por ejemplo, arabinogalactano de alerce), avena, cebada, pectinas, lignina, almidones resistentes. Los ejemplos de fuentes de fibra adecuadas incluyen, pero sin limitación, salvado de trigo, celulosa, salvado de avena, salvado de maíz, goma guar, pectina y psilio.

Las fuentes de proteína pueden ser cualquier proteína adecuada utilizada en las formulaciones nutricionales y pueden incluir proteína de suero, concentrado de proteína de suero, polvo de huevo, huevo, proteína de soja, aislado de proteína de soja, caseinato (por ejemplo, caseinato de sodio, caseinato de calcio y sodio, caseinato de calcio y caseinato de potasio), proteínas animales y vegetales y mezclas de los mismos. Al elegir una fuente de proteína, el valor biológico de la proteína se debe considerar primero, y los valores biológicos más altos se encuentran en caseinato, suero de leche, lactoalbúmina, soja, sólidos lácteos deslactados, albúmina de huevo y proteínas de huevo completas. Estas proteínas tienen un alto valor biológico; es decir, tienen una alta proporción de los aminoácidos esenciales.

El suplemento nutricional también puede contener otros ingredientes como una o una combinación de otras vitaminas, minerales, antioxidantes, fibra (por ejemplo, ginkgo biloba, ginseng) y otros suplementos nutricionales. La selección de uno o varios de estos ingredientes es una cuestión de diseño de formulación, preferencia del consumidor y el usuario final. La cantidad de estos ingredientes añadidos a los suplementos nutricionales descritos en el presente documento es fácilmente conocida por el experto en la materia y las dosis de RDA y DRI (Ingesta de Referencia Dietética) para niños y adultos pueden proporcionar orientación sobre dichas cantidades. Las vitaminas y minerales que se pueden añadir incluyen, pero sin limitación, fosfato o acetato de calcio, tribásico; fosfato de potasio, dibásico; sulfato u óxido de magnesio; sal (cloruro de sodio); cloruro o acetato de potasio; ácido ascórbico; ortofosfato férrico; niacina amida; sulfato u óxido de zinc; pantotenato de calcio; gluconato de cobre; riboflavina; betacaroteno; clorhidrato de piridoxina; mononitrato de tiamina; ácido fólico; biotina; cloruro o picolinato de cromo; yoduro de potasio; selenio; selenato de sodio; molibdato de sodio; filoquinona; vitamina D3; cianocobalamina; selenito de sodio; sulfato de cobre; vitamina A; vitamina E; vitamina B6 y clorhidrato de la misma; vitamina C; inositol; vitamina B12; yoduro de potasio.

La cantidad de otros ingredientes por unidad de porción es una cuestión de diseño y dependerá del número total de porciones por unidad del suplemento nutricional que se administra diariamente al paciente. La cantidad total de otros ingredientes también dependerá, en parte, del estado del paciente. Preferentemente, la cantidad de otros ingredientes será una fracción o un multiplicador de las cantidades de RDA o DRI. Por ejemplo, el suplemento nutricional comprenderá un 50 % de la RDI (ingesta diaria de referencia) de vitaminas y minerales por dosis unitaria y el paciente consumirá dos unidades por día.

- En el producto se pueden incorporar sabores, agentes colorantes, especias, frutos secos y similares. Los aromatizantes pueden ser en forma de extractos aromatizados, aceites volátiles, saborizantes de chocolate (por ejemplo, cacao o chocolate sin cafeína, o sustitutos de chocolate, tales como la algarroba), saborizante de mantequilla de cacahuete, migas de galleta, arroz crujiente, vainilla o cualquier saborizante disponible en el mercado. Los saborizantes pueden protegerse con tocoferoles mixtos. Los ejemplos de saborizantes útiles incluyen, pero sin limitación, extracto de anís puro, extracto de plátano sintético, extracto de cereza sintético, extracto de chocolate, extracto de limón puro, extracto de naranja pura, extracto de menta pura, extracto de piña sintético, extracto de ron sintético, extracto de fresa sintético o extracto puro de vainilla; o aceites volátiles, tales como aceite de bálsamo, aceite de laurel, aceite de bergamota, aceite de madera de cedro, aceite de cereza, aceite de nuez, aceite de canela, aceite de clavo de olor o aceite de menta; mantequilla de cacahuete, saborizante a chocolate, miga de galleta de vainilla, caramelo o toffee. En un aspecto preferido de la divulgación, el suplemento nutricional contiene bayas u otros sabores de frutas. Las composiciones alimenticias pueden revestirse adicionalmente, por ejemplo, con un revestimiento de yogur, si se produce como una barra.
- 15 Se pueden añadir emulsionantes para la estabilidad del producto final. Los ejemplos de emulsionantes adecuados incluyen, pero sin limitación, lecitina (por ejemplo, de huevo o soja) y/o mono- y diglicéridos. Otros emulsionantes son fácilmente evidentes para el experto en la materia y la selección de uno o más emulsionantes adecuados dependerá, en parte, de la formulación y del producto final.
- 20 También se pueden añadir conservantes al suplemento nutricional para prolongar la vida útil del producto. Preferentemente, se usan conservantes tales como sorbato de potasio, sorbato de sodio, benzoato de potasio, benzoato de sodio o EDTA disódico de calcio.
- 25 Además de los carbohidratos descritos anteriormente, el suplemento nutricional puede contener edulcorantes artificiales, por ejemplo, sacáridos, ciclamatos, aspartamina, aspartamo, acesulfamo K y/o sorbitol. Dichos edulcorantes artificiales pueden ser deseables si el suplemento nutricional está destinado a una persona con sobrepeso u obesidad, o una persona con diabetes tipo II que es propensa a la hiperglucemia.
- 30 Los suplementos nutricionales descritos en el presente documento pueden formularse usando cualquier forma farmacéuticamente aceptable de las vitaminas, minerales y otros nutrientes mencionados anteriormente, incluidas sus sales. Pueden formularse en cápsulas, comprimidos, polvos, suspensiones, geles o líquidos que comprenden opcionalmente un vehículo fisiológicamente aceptable, tal como pero sin limitación, agua, leche, zumo, sodas, almidón, aceites vegetales, soluciones salinas, hidroximetilcelulosa, hidrato de carbono. En un aspecto de la divulgación, los suplementos nutricionales pueden formularse como polvos, por ejemplo, para mezclar con líquidos consumibles, tales como leche, zumo, sodas, agua o geles o jarabes consumibles para mezclarlos con otros líquidos o alimentos nutricionales. La forma en polvo tiene un atractivo particular para el consumidor, es fácil de administrar e incorporar en la dieta diaria, lo que aumenta las posibilidades de cumplimiento terapéutico del paciente. Los suplementos nutricionales descritos en el presente documento pueden formularse con otros alimentos o líquidos para proporcionar alimentos suplementarios medidos previamente, tales como barras de desayuno de una sola porción, barritas energéticas, panes, galletas, brownies, galletas saladas, cereales, pasteles o bebidas, por ejemplo.
- 40 Por tanto, la formulación de suplemento nutricional puede administrarse como un suplemento dietético o como un aditivo a un vehículo consumible tal como un producto alimenticio. La composición puede incorporarse en un producto alimenticio que posteriormente se cuece o se hornea. Los componentes de la composición son estructuralmente estables para permanecer sin oxidar y son estables al calor a las temperaturas requeridas para hornear o cocer.
- 45 Para fabricar dicha bebida, los ingredientes se secan y se hacen fácilmente solubles en agua u otros líquidos consumibles como se ha descrito anteriormente. La bebida es una forma de suplemento nutricional preferida debido a su capacidad para ayudar en la sensación de saciedad si se consume al menos media hora antes de las comidas.
- 50 Para fabricar dicha barra de alimento, los ingredientes secos se añaden con los ingredientes líquidos en un mezclador y se mezclan hasta que se alcanza la fase de masa; la masa se pone en una extrusora y se extruye; la masa extruida se corta en longitudes apropiadas; y el producto se enfría.
- 55 Para la fabricación de otros alimentos o bebidas, los ingredientes que componen el suplemento nutricional descrito en el presente documento se pueden añadir a las formulaciones tradicionales o se pueden usar para reemplazar los ingredientes tradicionales. Los expertos en la formulación de alimentos podrán diseñar alimentos/bebidas apropiados con el objetivo de esta divulgación en mente.
- 60 El suplemento nutricional se puede producir en diversas formas, tales como púdines, productos de confitería, (por ejemplo, golosinas), bebidas nutritivas, helado, productos de confitería y chucherías congeladas, o productos alimenticios extruidos al horno o sin hornear, tales como barras. En un aspecto de la divulgación, el suplemento nutricional está en forma de un polvo para una bebida o una barra nutricional extruida no horneada.
- 65 En un aspecto de la divulgación, el vehículo consumible es un producto cárnico, tal como carne natural o cultivada.

La carne *in vitro*, también conocida como carne cultivada, es carne animal que nunca ha sido parte de un animal vivo y completo. El proceso de desarrollar carne *in vitro* implica tomar células musculares y aplicar una proteína que ayuda a las células a crecer a grandes porciones de carne. Una vez que se hayan obtenido las células iniciales, no se necesitarían animales adicionales - similar a la producción de cultivos de yogur. En un aspecto de la divulgación, la producción de carne *in vitro*: células musculares sueltas y músculo estructurado, siendo el último mucho más difícil que el primero. Los músculos consisten en fibras musculares, células largas con múltiples núcleos. Dichas células no proliferan por sí mismas, sino que surgen cuando las células precursoras se fusionan. Las células precursoras pueden ser células madre embrionarias o células satélite, células madre especializadas en el tejido muscular. Teóricamente, es relativamente sencillo cultivarlas en un biorreactor y luego hacer que se fusionen. Para el crecimiento de músculo real, sin embargo, las células deben crecer "en el lugar", lo que requiere un sistema de perfusión similar a un suministro de sangre para suministrar nutrientes y oxígeno cerca de las células en crecimiento, así como para eliminar los productos de desecho. Además, se deben cultivar otros tipos de células, tales como los adipocitos, y los mensajeros químicos deben proporcionar pistas al tejido en crecimiento sobre la estructura. Finalmente, el tejido muscular debe estirarse físicamente o "ejercitarse" para desarrollarse adecuadamente (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.835.390 y la solicitud internacional publicada n° WO 99/31222). En otro aspecto más, la divulgación incluye carne cultivada que está diseñada para expresar ZAG en cantidades suficientes, de modo que la adición de ZAG recombinante sea innecesaria.

Los ingredientes pueden administrarse en una sola formulación o pueden administrarse por separado. Por ejemplo, puede ser deseable administrar un ingrediente de sabor amargo en una forma que oculte su sabor (por ejemplo, en forma de cápsula o píldora) en lugar de incorporarlo en la propia composición nutricional (por ejemplo, polvo o barra). Por tanto, en el presente documento se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones nutricionales descritas en el presente documento. Opcionalmente asociado con dicho recipiente o recipientes puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o de suplementos dietéticos, aviso que refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana. El paquete o kit se puede etiquetar con información sobre el modo de administración, la secuencia de administración (por ejemplo, por separado, secuencial o concurrentemente) o similares. El paquete o kit también puede incluir medios para recordarle al paciente que tome la terapia. El paquete o kit puede ser una dosis unitaria única de la terapia de combinación o puede ser una pluralidad de dosis unitarias. En particular, los agentes pueden estar separados, mezclados juntos en cualquier combinación, presentes en una formulación o comprimido. Se prefieren los agentes reunidos en un blíster u otros medios de dispensado.

En una realización, la formulación incluye de aproximadamente 1,0 mg a 1000 mg de ZAG. En otra realización, la formulación incluye de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 500 mg de ZAG. En otra realización, la formulación incluye de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 100 mg de ZAG. En otra realización, la formulación incluye de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 50 mg de ZAG. En otra realización, la formulación incluye de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 10 mg de ZAG. En otra realización, La formulación incluye aproximadamente 5,0 mg de ZAG.

Por consiguiente, en el presente documento se describe el uso de anticuerpos anti-ZAG, o fragmentos funcionales de los mismos, como se definen en el presente documento, para la fabricación de un medicamento útil en medicina humana para el tratamiento de síntomas y/o afecciones asociadas con caquexia o enfermedades asociadas con trastornos de atrofia muscular progresiva.

La formulación de la presente invención se administra por vía oral. En dichas realizaciones, la formulación es al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 % tan efectiva como cualquier otra vía de administración.

La cantidad total de formulación que se administrará en la puesta en práctica de la invención se puede administrar a un sujeto como una dosis única, ya sea como una embolada o por ingestión durante un período de tiempo relativamente corto, o se puede administrar usando un protocolo de tratamiento fraccionado, en el que dosis múltiples se administran durante un período prolongado de tiempo (por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, etc.). Un experto en la materia sabría que la cantidad de formulación depende de muchos factores que incluyen la edad y el estado de salud general del sujeto, así como la vía de administración y el número de tratamientos a administrar. En vista de estos factores, el experto en la materia ajustaría la dosis particular según fuera necesario. En general, la formulación de la composición farmacéutica y las vías y la frecuencia de administración se determinan, Inicialmente, usando ensayos clínicos de fase I y fase II.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la formulación de la invención se administra usando un régimen de tratamiento por intervalos. Se observó que la administración diaria a largo plazo de ZAG en ratones ob/ob produce una pérdida de peso continua. Como tal, en una realización, el tratamiento de ZAG o anticuerpos anti-ZAG, solos o en combinación con uno o más antagonistas de β -AR o agonistas de β 3-AR, se administra a días alternos. En otra realización, el tratamiento se administra cada dos días. En otra realización, el tratamiento se administra cada tres días. En otra realización, el tratamiento se administra cada cuatro días.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente las ventajas y características de la presente

invención, pero no están previstos para limitar el alcance de la invención. Si bien son típicos de los que podrían usarse, alternativamente pueden usarse otros procedimientos, metodologías o técnicas conocidas por los expertos en la materia.

5 EJEMPLO 1

La zinc- α_2 -glucoproteína atenúa la hiperglucemia

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

20 El medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y el medio Freestyle se adquirieron en Invitrogen (Paisley, Reino Unido), mientras que el suero fetal bovino procedía de Biosera (Sussex, Reino Unido). 2-[1- 14 C] Desoxi-D-glucosa (sp.act.1.85GBq mmol $^{-1}$) y L-[2,6- 3 H] fenilalanina (sp.act.37Bq mmol $^{-1}$) eran de American Radiolabeled Chemicals (Cardiff, Reino Unido). Los anticuerpos policlonales de conejo frente a fosfo (Thr-202) y ERK1 total, p38MAPK total, fosfo HSL (Ser-552), transportador de glucosa 4 (GLUT4), lipasa adiposa de triglicéridos, lipasa sensible a hormonas y la fosfo PLA $_2$ (Ser-505) y frente a ATGL humana se adquirieron de Abcam (Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo monoclonal de ratón contra la ZAG humana de longitud completa era de Santa Cruz (California, EE.UU.) y el anticuerpo monoclonal de ratón contra la cadena pesada de miosina de tipo II era de Novacastra (vía Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido). Los anticuerpos monoclonales de ratón contra las subunidades α del proteasoma 20S y p42 eran de Affinity Research Products (Exeter, Reino Unido). Los anticuerpos monoclonales de ratón contra fosfo (Thr-180/Tyr-182) p38MAPK y antisueros policlonales de conejo contra (Thr-451) PKR total y fosfo, eIF2 α fosfo (Ser-162) y contra eIF2 α total eran de England Biosciences (Herts, Reino Unido). Los anticuerpos policlonales de conejo contra UCP1, UCP3 y PKR total y el reactivo de extracción PHOSPHOSAFE $^{\text{TM}}$ eran de Calbiochem (vía Merk Chemicals, Nottingham, Reino Unido). Los anticuerpos anti-conejo de cabra y anti-ratón de conejo conjugados con peroxidasa se adquirieron de Dako (Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo policlonal de conejo contra la β -actina de ratón y el kit de ensayo de triglicéridos se adquirieron en Sigma Aldrich (Dorset, Reino Unido). Las membranas de nitrocelulosa Flybond A y los kits de desarrollo de quimioluminiscencia potenciados (ECL) eran de Amersham Pharmacia Biotech (Bucks, Reino Unido). Un kit de ensayo colorimétrico WAKO para NEFA se adquirió de Alpha Laboratories (Flampshire, UK) y un kit de ELISA de insulina de ratón se adquirió de DRG (Marburgo, Alemania). Las mediciones de los niveles de glucosa se realizaron usando un kit de glucosa en plasma Boots (Nottingham, Reino Unido).

45 *Producción de ZAG recombinante* - células HEK293F recombinantes se transfectaron con ADNc de ZAG humana de longitud completa en el vector de expresión pcDNA 3.1 y se mantuvieron en medio FreeStyle en atmósfera de CO $_2$ al 5 % en el aire a 37 °C. Se secretó ZAG al medio, que se recogió y los niveles máximos de la proteína (16 μ g/ml $^{-1}$) se obtuvieron después de 14 días de cultivo. Para purificar la ZAG, el medio (200 ml) se centrifugó a 700 g durante 15 minutos para eliminar las células y se concentró en un volumen de 1 ml de PBS estéril usando un filtro de centrifuga Amicon Ultra-15 con un valor de corte de 10 kDa. El concentrado (aproximadamente 2 mg de proteína) se añadió a 2 g de celulosa DEAE suspendida en 20 ml de Tris 10 mM, pH 8,8 y se agitó durante 2 horas a 4 °C. La celulosa DEAE se unió a ZAG y se sedimentó por centrifugación (1500 g durante 15 minutos) y la ZAG se eluyó mediante agitación con 20 ml de Tris 10 mM, pH 8,8 que contenía NaCl 0,3 M durante 30 minutos a 4 °C. El eluato se lavó y se concentró en un volumen de 1 ml en PBS estéril usando un filtro de centrifuga Amicon. La ZAG purificada estaba libre de endotoxina, según se determinó con un kit de ensayo único LAL Pyrogen (Lonza, Bucks, Reino Unido).

55 *Cultivo celular y purificación de ZAG*. Se prepararon suspensiones de una sola célula de adipocitos blancos a partir de depósitos adiposos triturados mediante incubación a 37 °C durante 2 horas en tampón de bicarbonato de Krebs-Ringer que contenía 1,5 mg/ml $^{-1}$ de colagenasa y seroalbúmina bovina al 4 % en una atmósfera de oxígeno al 95 %: CO $_2$ al 5 % como se ha descrito anteriormente. Para los estudios de evolución temporal los adipocitos se suspendieron en DMEM que contenía suero fetal bovino al 10 % a una concentración de 10 5 células ml $^{-1}$ y se mantuvieron en atmósfera de CO $_2$ al 10 % en aire a 37 °C. Las células 293 humanas transfectadas con un plásmido que contiene ZAG humana se sembraron a una concentración de 10 5 células ml $^{-1}$ en medio FreeStyle y se mantuvieron en una atmósfera de CO $_2$ al 5 % en aire a 37 °C. Los niveles máximos de la proteína (16 μ g/ml $^{-1}$) se obtuvieron después de 14 días de cultivo. Después el medio (200 ml) se centrifugó a 700 g durante 15 minutos para eliminar las células y se concentró en un volumen de 1 ml de PBS estéril usando un filtro de centrifuga Amicon Ultra-15 con un valor de corte de 10 kDa. Después de medir la concentración de la proteína de la muestra (aproximadamente 2 mg) se añadió a 2 g de celulosa DEAE suspendida en 20 ml de Tris 10 mM, pH 8,8 y se agitó a 4 °C durante 2 horas. La ZAG estando cargada negativamente se une a la celulosa DEAE, que se sedimentó

mediante centrifugación (1500 g durante 15 minutos) y se eluyó mediante agitación con 20 ml de Tris 10 mM, pH 8,8 que contiene NaCl 0,3 M durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se lavó y se concentró hasta un volumen de 1 ml en PBS estéril usando el filtro de centrifuga Amicon.

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

10 *Animales - ratas.* Ratas Wistar macho maduras (un año de edad de la colonia de los inventores) con un peso de $540 \pm 82,5$ g se alojaron individualmente y se trataron i.v. una vez al día, ya sea con ZAG en PBS (100 µl) (50 µg por 100 g de peso corporal) o con PBS (100 µl) como un control. Tanto la ingesta de alimento como de agua y el peso corporal se midieron diariamente. Se proporciona a los animales acceso libre al alimento (Special Diet Services, Essex, Reino Unido) y al agua ad libitum. El experimento con animales se llevó a cabo conforme a las condiciones de bienestar impuestas por el Ministerio del Interior británico. Después de 10 días de tratamiento se sacrificó a los animales y se determinó la composición corporal. Los animales se calentaron hasta 80-90 °C durante 7 días hasta que se alcanzó un peso constante. A continuación se determinó el contenido de agua a partir de la diferencia entre el peso húmedo y el peso seco. Se extrajeron los lípidos de la carcasa seca usando una secuencia de cloroformo:metanol (1:1), etanol/acetona (1:1) y éter dietílico (120 ml de cada uno) como describen Lundholm *et al* (14). Los disolventes se evaporaron y se pesó la grasa. La masa de la carcasa sin grasa se calculó como la diferencia entre el peso inicial de la carcasa y el peso del agua y la grasa.

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

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

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

35 *Actividad lipolítica en adipocitos de rata -* Se prepararon adipocitos blancos a partir de tejido adiposo de epidídimo finamente triturado de ratas Wistar macho (400 g) usando digestión con colagenasa, tal como se describe (Beck SA, et al. Production of lipolytic and proteolytic factors by a murine tumor-producing cachexia in the host. *Cancer Res*

47:5919-5923, 1987). La actividad lipolítica se determinó incubando 10^5 - 2×10^5 adipocitos durante 2 horas en 1 ml de tampón de bicarbonato de Krebs-Ringer, pH 7,2 y la extensión de la lipólisis se determinó midiendo el glicerol liberado (Wieland O. Glycerol UV method. Methods of Enzymatic Analysis, editado por Bergmeyer HU. Academic Press, Londres, pág. 1404-1409, 1974). La liberación espontánea de glicerol se midió incubando los adipocitos solos. La actividad lipolítica se expresó como μmol de glicerol liberados/ 10^5 de adipocitos/2 horas.

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

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

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

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

Síntesis y degradación de proteínas en el músculo. El método para la determinación de la síntesis y degradación de proteínas en el músculo ya se ha descrito anteriormente (Smith, K.L. y Tisdale, M.J. Increased protein degradation and decreased protein synthesis in skeletal muscle during cancer cachexia. Br. J. Cancer 67, 680-685 (1993)). Los músculos gastrocnemios se escindieron usando ligaduras y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en medio RPMI 1640 sin rojo fenol y se saturaron con $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (19:1) y después se lavaron con PBS. La síntesis de proteínas se midió mediante la incorporación de L-[2,6- ^3H]fenilalanina (640 MBq) en material insoluble en ácido usando un período de 2 horas en el que los músculos se incubaron a 37 °C en RPMI/640 sin rojo fenol y se saturaron con $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (19:1). A continuación los músculos se aclararon en un medio no radiactivo, se realizó transferencia y se homogeneizaron en ácido perclórico al 2 %. El índice de síntesis de proteínas se calculó dividiendo la cantidad de radiactividad unida a las proteínas por la cantidad de radiactividad soluble en ácido. La degradación de proteínas se determinó mediante la liberación de tirosina desde el músculo gastrocnemio durante un período de 2 horas en 3 ml de tampón de Krebs-Henseleit oxigenado, pH7,4, que contenía glucosa 5 mM y cicloheximida 0,5 mM.

Medición del proteasoma y actividad de la caspasa. La actividad de tipo quimotripsina del proteasoma se determinó fluorométricamente mediante la medición de la liberación de 7-amido-4-metilcumarina (AMC) a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm del sustrato fluorógeno N-succinil Lys Lys Val Tyr.AMC (SEQ ID NO: 2) como se ha descrito previamente para los miotubos (Whitehouse, A.S. y Tisdale, M.J. Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF- κB . Br. J. Cancer 89, 1116-1122 (2003)). El músculo gastrocnemio se homogeneizó en Tris 20 mM, pH 7,5, ATP 2 mM, MgCl_2 5 mM y TDT 50 mM a 4 °C, se sonicó y se centrifugó a 18.000 g durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar el material insoluble y se usó el sobrenadante resultante para medir la actividad de la enzima 'de tipo quimotripsina' en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma lactacistina (10 μM). Solo la actividad suprimible de lactacistina se consideró como verdadera actividad proteasómica. La actividad de la caspasa-3 se determinó mediante la liberación de AMC desde AcAsp.Gly.Val.Asp.AMC (SEQ ID NO: 3) y la actividad de la caspasa-8 se determinó mediante la liberación de 7-amino-4-trifluorometilcumarina (AFC) desde el sustrato específico Z-Ile Glu Phe Thr Asp-AFC (SEQ ID NO: 4), usando el sobrenadante de lo anterior (50 μg de proteína) y o bien el sustrato de caspasa-3 u -8 (10 μM) durante 1 hora a 37 °C, en presencia o ausencia de inhibidores de la caspasa-3 (AcAspGluValAsp-CHO) (SEQ ID NO: 5) o de la caspasa-8 (Ile Glu Phe Thr Asp-CHO) (SEQ ID NO: 6) (100 μM). El aumento de la fluorescencia debido a la AFC se determinó como anteriormente, mientras que el aumento de la fluorescencia debido a la AFC se midió con una

longitud de onda de excitación de 400 nm y una longitud de onda de emisión de 505 nm. La diferencia en los valores en ausencia y presencia de los inhibidores de caspasa fue una medida de la actividad.

5 *Análisis de transferencia de Western.* Los músculos gastrocnemios recién extirpados se lavaron en PBS y se lisaron en reactivo de extracción PHOSPHOSAFE™ durante 5 minutos a temperatura ambiente seguido de ultrasonidos a 4 °C. El lisado se aclaró mediante centrifugación a 18.000 g durante 5 minutos a 4 °C y las muestras de proteína citosólica (5 µg) se resolvieron en electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida al 12 % a 180 V durante aproximadamente 1 hora. A esto le siguió la transferencia a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µM, que después se bloquearon con Marvel al 5 % en solución salina tamponada con Tris, pH 7,5, a 4 °C durante una noche. 10 Los anticuerpos tanto primarios como secundarios se usaron a una dilución de 1:1000 salvo la anti-miosina (1:250). La incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente y el desarrollo se efectuó mediante ECL. Las transferencias se escanearon con un densitómetro para cuantificar las diferencias.

15 Las muestras de TAB epididimario, TAP y músculo gastrocnemio extirpadas de ratas tratadas con ZAG o PBS durante 5 días se homogeneizaron en sacarosa 0,25 M, HEPES 1 mM, pH 7,0 y EDTA 0,2 M y después se centrifugaron durante 10 minutos a 4.500 rpm. Las muestras de proteína citosólica (10 µg) se resolvieron en electroforesis en gel de poli(acrilamida)-dodecilsulfato de sodio al 12 % y las proteínas se transfirieron luego a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm, que habían sido bloqueadas con Marvel al 5 % en solución salina tamponada con Tris, pH 7,5, a 4 °C durante una noche y después de cuatro lavados de 15 minutos con Tween al 0,1 % en PBS, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. El desarrollo se realizó mediante ECL. 20

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

30 *Resultados - ratones.* La purificación de ZAG dio lugar a un producto que tenía una pureza superior al 95 % (figura 1A), confirmado como ZAG mediante inmunotransferencia (figura 1B). La ZAG estimuló la lipólisis en los adipocitos del epidídimo (figura 1D) pero el efecto lipolítico se redujo considerablemente en los adipocitos de los depósitos subcutáneos y viscerales, aunque estaba significativamente elevado sobre los niveles basales (figura 1E). No se observaron diferencias significativas en la extensión de la estimulación de la lipólisis entre la isoprenalina y ZAG en cualquiera de los grupos de adipocitos, aunque ZAG fue más potente en la inducción de la lipólisis que la isoprenalina sobre una base molar. El efecto de ZAG sobre el peso corporal de los ratones ob/ob en un período de 5 días se muestra en la figura 1F. Mientras que en los animales de control el peso se mantuvo estable, los animales 35 tratados con ZAG mostraron una pérdida de peso progresiva, de tal manera que después de 5 días se produjo una diferencia de peso de 3,5 g entre los grupos, a pesar de que la ingesta de alimentos (PBS 32 ± 3,1 g; ZAG 30 ± 2,5 g) y agua (PBS 140 ± 8,2 ml; ZAG 135 ± 3,2 ml) fue la misma durante el transcurso del experimento. Se produjo un aumento significativo de la temperatura corporal de 0,4 °C después de 4 días de administración de ZAG (figura 1G), 40 indicativo de un aumento en la tasa metabólica basal. La medición de los niveles de metabolitos en plasma sugiere un aumento en la utilización del sustrato metabólico en los animales tratados con ZAG (tabla 1). Por tanto hubo una disminución significativa en glucosa, triglicéridos (TG) y ácidos grasos no esterificados (NEFA) en plasma en los animales tratados con ZAG, a pesar de un aumento de la concentración de glicerol indicativo de una lipólisis aumentada. Se produjo una disminución del 36 % en los niveles de insulina en plasma que sugieren que ZAG es 45 eficaz en la reducción del estado diabético. Los niveles del ARNm de ZAG en diversos tejidos se muestran en la figura 1C.

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

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

50 Para investigar esto, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa, en los animales alimentados, después de 3 días de la administración de ZAG (figura 2A). Mientras que los niveles de glucosa en sangre se elevaron significativamente en los controles de PBS, solo se produjo un pequeño incremento en los animales tratados con ZAG, que permanecieron significativamente por debajo del grupo de control a lo largo del curso del estudio. Además,

los niveles de insulina en plasma fueron significativamente menores en los animales tratados con ZAG al inicio del estudio y se mantuvieron así durante los 60 minutos de la observación (figura 2B). La administración de ZAG aumentó la captación de glucosa en los adipocitos epididimarios, viscerales y subcutáneos en ausencia de insulina y también aumentó la captación de glucosa en los adipocitos epididimarios y viscerales en presencia de niveles bajos (1 nM) de insulina (figura 2C). La captación de glucosa en el músculo gastrocnemio también fue significativamente mayor en los animales tratados con ZAG tanto en ausencia como en presencia de insulina (100 nM) (figura 2D). La captación de glucosa en el músculo gastrocnemio de ratones tratados con ZAG fue mayor que la respuesta a la insulina en los animales no tratados.

La administración de ZAG también atenuó el efecto de la hiperglucemia sobre la atrofia del músculo esquelético. Por tanto los ratones ob/ob tratados con ZAG mostraron un aumento significativo en el peso húmedo de los músculos gastrocnemio y soleo (tabla 1). Esto se asoció con un aumento de más del doble de la síntesis de proteínas en el músculo soleo (figura 3A) y con una disminución del 60 % en la degradación de proteínas (figura 3B). Los músculos gastrocnemios de los ratones tratados con ZAG mostraron una disminución de la actividad de la enzima 'de tipo quimotripsina' del proteasoma (figura 3C), que no fue significativamente diferente de la descubierta en los ratones no obesos y una disminución de la expresión de las subunidades α del proteasoma 20S (figura 3D) y de p42, una subunidad de la ATPasa del regulador 19S (figura 3E), lo que sugiere una reducción de la actividad de la ruta de la ubiquitina-proteasoma. Los niveles de miosina aumentaron en los ratones tratados con ZAG (figura 3F), mientras que los niveles de actina no cambiaron (figura 3G). Además, se produjo una reducción del nivel de las formas fosforiladas de la proteína cinasa dependiente de ARNbc (PKR) (figura 4A) y del factor de iniciación eucariótico 2a (eIF2 α) (figura 4B), que se ha demostrado que son los responsables de la atrofia muscular inducida por factores catabólicos tumorales y altos niveles de glucosa extracelular. Otras enzimas en esta ruta, incluyendo la fosfolipasa A₂ (PLA₂) (figura 4C), proteína cinasa activada por mitógeno p38 (figura 4D) y las caspasas-3 y -8 (figura 4E) también estaban atenuadas en los músculos gastrocnemios de ratones ob/ob tratados con ZAG. Estos cambios eran proporcionales a una disminución en la señalización catabólica en el músculo en respuesta a ZAG.

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

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

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

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

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

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

Parámetro	PBS	ZAG	p
Peso inicial	92,5 ±3,1	93,1 ±1,9	
Peso final	89,9 ±1,3	83,95 ±2,2	
Alimento (g)	135 ±6	145 ±4	
Agua (ml)	268 ±15	259 ±20	
TAP (g)	0,36 ±0,21	0,41 ±0,35	
Gastrocnemio (g)	0,26 ±0,15	0,39 ±0,12	0,01
Sóleo (g)	0,15 ±0,06	0,18 ±0,07	

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

10 *Resultados - ratas.* El efecto lipolítico de la ZAG humana hacia los adipocitos epididimarios de rata en comparación con la isoprenalina se muestra en la figura 11. A concentraciones entre 233 y 700 nM de ZAG se produjo un aumento relacionado con la dosis en liberación de glicerol, que se atenuó con los anticuerpos monoclonales anti-ZAG, que muestran la especificidad de la acción. El alcance de la lipólisis en adipocitos de rata fue similar al indicado previamente para ratones. Como en el ratón, el efecto lipolítico de ZAG se vio completamente atenuado por el antagonista del receptor p3-adrenérgico (β3-AR) SR59230A, lo que sugiere que la acción de ZAG estaba mediada por el β3-AR. Estos resultados sugieren que ZAG puede ser eficaz en la inducción de la pérdida de grasa en ratas.

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

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

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

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

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

Metabolito	PBS	ZAG
Glucosa (mmol/l)	25,5 ± 2,3	16,2±2,1 ^c
Triglicéridos (mmol/l)	1,75 ± 0,01	1,1±0,09 ^a
Glicerol (umol/l)	300 ± 52	450±51 ^c
NEFA (mEq/l)	0,58 ± 0,008	0,26±0,06 ^b
Las diferencias con respecto a animales tratados con PBS se muestran como a, p<0,05; b, p<0,01 o c, p<0,001		

5 La administración de ZAG aumentó la expresión de las proteínas de desacoplamiento (UCP)-1 y - 3 tanto en TAP como TAB casi al doble (figuras 13A y 13B), lo que contribuiría a un aumento de la utilización de sustratos. En ratas tratadas con ZAG también se produjo un aumento de la expresión de las enzimas lipolíticas lipasa adiposa de triglicéridos (ATGL) y lipasa sensible a hormonas (HSL) en el tejido adiposo de epidídimo (figura 15), de nuevo con un aumento de dos veces. La ATGL es principalmente responsable de la hidrólisis del primer enlace éster en una molécula de triacilglicerol que forma diacilglicerol, mientras que su conversión en monoacilglicerol se lleva a cabo por HSL. La expresión de ZAG también se incrementó significativamente en el músculo esquelético, (figura 16A), el TAB (figura 16B) y el TAP (figura 16C) de ratas tratadas con ZAG durante 10 días, lo que muestra que de ZAG exógena refuerza su propia producción en los tejidos periféricos.

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

20 EJEMPLO 2

Intervalo de administración de zinc- α_2 -glucoproteína

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

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

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

40 EJEMPLO 3

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

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

55 EJEMPLO 4

La zinc- α_2 -glucoproteína atenúa la formación de ROS

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

EJEMPLO 5

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

También se realizó una prueba de tolerancia a la insulina en ratones ob/ob a los que se administró ZAG durante 3 días (figura 23). A los animales se les administraron dos dosis de insulina (10 y 20 U/kg) mediante inyección i.p. y la glucemia se midió durante los siguientes 60 minutos. Como se puede ver (figura 23A) los animales tratados con ZAG mostraron un aumento de la sensibilidad a la insulina (10 U/kg) respecto a los que recibieron PBS. A la concentración de insulina más alta (20 U/kg) esta diferencia desapareció (figura 23B). La curva de desaparición de la glucosa para 20 U/kg + PBS fue casi idéntica a 10 U/kg + ZAG, lo que a este nivel de dosis de ZAG es reducir la necesidad de insulina en un 50 %, pero esto puede superarse administrando más insulina.

EJEMPLO 6

Los anticuerpos anti-zinc- α_2 -glucoproteína reducen la pérdida de peso

Los datos mostrados en las figuras 26-29 son de un estudio en el que el agonista de β_3 , BRL37344, se administró solo y en combinación con un anticuerpo anti-ZAG a 50 μ g por día diariamente. Dentro de las 24 horas de la administración, los ratones a los que se les administró el anticuerpo mostraron una reducción significativa en la pérdida de peso, en comparación con los ratones que recibieron BRL37344.

EJEMPLO 7

Administración durante 5 días de zinc- α_2 -glucoproteína

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

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

EJEMPLO 8

Papel de los receptores β -adrenérgicos en los efectos anti-obesidad y anti-diabéticos de la zinc- α_2 -glucoproteína

El objetivo del estudio fue determinar si el β -adrenoceptor (β -AR) desempeña un papel en los efectos anti-obesidad y antidiabéticos de la zinc- α_2 -glucoproteína (ZAG). Esto se ha investigado en células CHO-K1 transfectadas con β_1 , β_2 , β_3 -AR humanos y en ratones ob/ob. En las células CHO-K1 transfectadas con el β_3 -AR, la concentración más baja de ZAG para estimular la producción de AMP cíclico fue de 350 nM, mientras que se requirieron concentraciones más altas (580 nM) para las células transfectadas con el β_2 -AR, y no hubo un aumento en el AMP cíclico en células transfectadas con el β_1 -AR. Esto se correlacionó con los valores de Kd para la unión a β_3 -AR (46 \pm 4 nM) y β_2 -AR (71 \pm 2 nM), mientras que no hubo unión a la β_1 -AR. La congelación y descongelación de ZAG, que destruyó su actividad biológica eliminó la unión a β_2 - y β_3 -AR. El tratamiento de ratones ob/ob con ZAG aumentó la expresión proteica de β_3 -AR en el músculo gastrocnemio y en el tejido adiposo blanco y pardo, pero no

tuvo efecto sobre la expresión de β 1- y β 2-AR. El efecto de ZAG sobre la reducción del peso corporal y la excreción urinaria de glucosa, el aumento de la temperatura corporal, la reducción de los niveles máximos de glucosa e insulina en plasma en el ensayo de tolerancia a la glucosa oral y la estimulación del transporte de glucosa al músculo esquelético y al tejido adiposo, se atenuó completamente mediante el antagonista de β -AR inespecífico propanolol. Estos resultados ponen de manifiesto que el efecto de ZAG sobre el peso corporal y la sensibilidad a la insulina en ratones ob/ob se manifiesta a través de un β -3AR, o posiblemente un β 2-AR.

Se reconoció por primera vez que la zinc- α 2-glucoproteína (ZAG) desempeña un papel en el metabolismo de los lípidos cuando se demostró que los fragmentos trópticos de un factor movilizador de lípidos (FML), que se cree que son responsables de la pérdida de tejido adiposo en la caquexia por cáncer, son idénticos en secuencia de aminoácidos a ZAG. Se demostró que tanto ZAG como FML eran inmunológicamente idénticos, y ambos estimulaban la lipólisis en adipocitos murinos en la misma cantidad, a la misma concentración, mediante la activación de la adenilil ciclasa en un proceso dependiente de GTP. Los estudios iniciales sugirieron que ZAG se originó a partir del tumor, ya que los tumores que iniciaron caquexia mostraron altos niveles de expresión, mientras que otros tumores que no indujeron caquexia no mostraron expresión. Estudios posteriores demostraron que ZAG también se producía en tejidos normales, incluyendo el hígado, el tejido adiposo pardo (TAP) y el tejido adiposo blanco (TAB), por lo que la ZAG se puede clasificar como una adipocina. Además, tanto en ratones caquéticos como en seres humanos, se observó que la expresión del ARNm de ZAG en TAB aumentaba 10 veces y 2,7 veces respectivamente. En pacientes con cáncer caquético, el ARNm de ZAG mostró una correlación negativa con el índice de masa corporal (IMC), pero una correlación positiva con la pérdida de peso y los niveles séricos de glicerol. En contraste, se ha demostrado que los niveles de ARNm de ZAG en TAB están regulados negativamente en la obesidad y se correlacionan negativamente con la masa grasa, el IMC, la insulina plasmática y la leptina. El tratamiento de ratones ob/ob con ZAG disminuyó el peso corporal y la masa grasa y mejoró los parámetros de la resistencia a la insulina, incluyendo la disminución de los niveles plasmáticos de glucosa, insulina y ácidos grasos no esterificados (NEFA), mejorando la sensibilidad a la insulina y aumentando la masa muscular. Se ha descubierto que los niveles séricos de ZAG son significativamente más bajos en los ratones alimentados con una dieta rica en grasas que en los alimentados con una dieta normal, así como en los seres humanos y ratones obesos. Mientras que la sobreexpresión de ZAG en ratones redujo tanto el peso corporal como el peso de la grasa epididimaria, los animales knock-out para ZAG mostraron un aumento de peso corporal, especialmente cuando se les dio una dieta alta en grasas. Estos resultados sugieren que ZAG, como la leptina, está estrechamente relacionada con la masa grasa. Sin embargo, mientras que la leptina se correlaciona positivamente con la masa grasa, ZAG se correlaciona negativamente.

Se demostró que el efecto lipolítico de ZAG era atenuado por el antagonista del β 3-adrenoceptor (β 3-AR), SR59230A, mientras que se ha demostrado que el FML se une al β 3-AR a través de un sitio de unión de alta afinidad (Kd $78 \pm 4,5$ nM). Estos resultados sugieren que la lipólisis mediada por ZAG se manifiesta a través de un β 3-AR. Este estudio examinó el papel de la β 3-AR en la acción de ZAG, así como determinar la unión a β 1 y β 2-AR, y el papel de β -AR en los efectos antiobesidad y antidiabéticos de ZAG.

El FCS (suero fetal de ternero) fue de Biosera (Sussex, Reino Unido), mientras que el DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) fue de PAA (Somerset, Reino Unido) y el medio Freestyle media y transcriptasa inversa Superscript II se adquirieron de Invitrogen (Paisley, Reino Unido). 2-[1- 14 C] desoxi-D-glucosa sp.act. 1.85GBq mmol $^{-1}$) se adquirió de American Radiolabeled Chemicals (Cardiff, Reino Unido). Na [25 I] (radiactividad específica > 17Ci mg $^{-1}$) se adquirió de Perkin Elmer Limited. El anticuerpo policlonal de pollo contra β 3-AR y los anticuerpos policlonales de conejo contra β 1-AR y β 2-AR se adquirieron de Abcam (Cambridge, Reino Unido) y el anticuerpo anti-pollo de cabra conjugado con peroxidasa se adquirió en Santa Cruz (EE. UU.). Los anticuerpos policlonales de conejo contra UCP1 y UCP3 fueron de Calbiochem (a través de Merck Chemicals, Nottingham, Reino Unido). El anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa fue de Dako (Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo policlonal de conejo contra la β -actina del ratón, el Tri-Reagent y el propanolol fueron de Sigma Aldrich (Dorset, Reino Unido). Las membranas de nitrocelulosa Hybond A fueron de GE Healthcare (Bucks, Reino Unido). El kit de ensayo de AMP cíclico Parameter se adquirió de New England Biolabs (Hitchin, Reino Unido). Los kits de desarrollo de perlas de yodo y quimioluminiscencia mejorada (ECL) se adquirieron de Thermo Scientific (Northumberland, Reino Unido). Se adquirió un kit de ELISA de insulina de ratón de DRG (Marburgo, Alemania) y se realizaron mediciones de glucosa usando un kit de glucosa en plasma Boots (Nottingham, Reino Unido). Los cebadores para la transcripción inversa y el sistema de RT-PCR Easy-A de un tubo fueron de Agilent Technologies (Cheshire, Reino Unido).

Animales. Se criaron ratones obesos (ob/ob) hiperglucémicos con un peso promedio de 71 g. Los antecedentes de estos animales se han descrito previamente (Bailey CJ, et al. Influence of genetic background and age on the expression of the obese hyperglycaemic syndrome in Aston ob/ob mice. Int J Obes 6: 11-21, 1982), y exhiben una forma más grave de diabetes que los ratones C57BL/6J ob/ob. Ratones macho (aproximadamente 20 semanas de edad) se agruparon en tres por jaula y se mantuvieron en una habitación con aire acondicionado a 22 ± 2 °C, con alimentación ad libitum de una dieta de cría de ratas y ratones (Special Diet Services, Witham, Reino Unido) y agua corriente. A los ratones se les administró ZAG (50 μ g, i.v. en 100 μ l de PBS) o PBS diariamente con o sin propanolol (40 mgkg $^{-1}$, po, diariamente) y se determinaron el peso corporal y la ingesta de alimentos y agua, así como la excreción urinaria de glucosa y la temperatura corporal, determinada mediante el uso de un termómetro rectal (RS

Componentes, Northants, Reino Unido). Se realizó un ensayo de tolerancia a la glucosa el día 3. Se administró glucosa por vía oral (1 gkg^{-1} en un volumen de $100 \mu\text{l}$) a los animales que habían estado en ayunas durante 12 h. Las muestras de sangre se extrajeron de la vena de la cola a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de glucosa y se usaron para las mediciones de glucosa e insulina. Al final del experimento, los animales se sacrificaron por dislocación cervical, se extirparon los tejidos y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, y se mantuvieron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Producción de ZAG humana recombinante. Células HEK293F humanas, que se habían transfectado con pcDNA3.1 que contenía ZAG humana, se mantuvieron en medio Freestyle, que contenía neomicina ($50 \mu\text{gm}^{-1}$), en una atmósfera de CO_2 al 5 % en aire. Después de 2 semanas de crecimiento, las células se retiraron por centrifugación (700 g durante 15 min) y el medio se concentró a un volumen de 1 ml de PBS estéril usando un filtro de centrifuga Amicon Ultra-15 con un valor de corte de P.M. de 10 kDa. La ZAG se purificó como se ha descrito (Russell ST and Tisdale MJ, Antidiabetic properties of zinc- α 2-glycoprotein in ob/ob mice. *Endocrinol* 151: 948-957, 2010), mediante la unión a la celulosa DEAE, ya que ZAG tiene una electronegatividad alta, y se eluyó con NaCl 0,3 M. La ZAG producida mediante este método tenía una pureza superior al 95 % y estaba libre de endotoxinas, según se determinó mediante el kit de ensayo único LAL Pyrogent (Lonza). La ZAG purificada se almacenó a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ en PBS.

Etiquetado con $[^{125}\text{I}]$ de ZAG. Una perla de yodo que se había lavado y secado se incubó con Na $[^{125}\text{I}]$ (1 mCi por $100 \mu\text{g}$ de proteína) durante 5 min en PBS, a continuación se añadió ZAG ($100 \mu\text{g}$ de proteína) y se dejó durante 15 min más. La reacción se terminó mediante la retirada de la perla de yodo, mientras que el Na $[^{125}\text{I}]$ libre se retiró usando una columna Sephadex G25 eluida con NaI 0,1 M. La $[^{125}\text{I}]$ ZAG se concentró contra PBS utilizando un microconcentrador Microcon con un filtro de valor corte de Mr 10.000. La actividad específica de $[^{125}\text{I}]$ ZAG fue 8 Cimg proteína¹.

Estudios de unión y determinación de AMP cíclico. Las células CHO-K1 transfectadas con β 1- y β 2-AR humanos se obtuvieron de la Universidad de Nottingham, Reino Unido, mientras que las células CHOK1 transfectadas con el β 3-AR se obtuvieron de Astra Zeneca, Macclesfield, Cheshire, Reino Unido. La expresión génica estaba bajo el control de higromicina, junto con una construcción indicadora β -gal, seleccionada para la resistencia a G418. Se mantuvieron en DMEM suplementado con glutamina 2 mM, higromicina B (50 mgml^{-1}), G418 (200 mgml^{-1}) y FCS al 10 %, en una atmósfera de CO_2 al 10 % en aire. Para determinar el efecto de los agonistas sobre la producción de AMP cíclico, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos que contenían 1 ml de medio nutriente. Se añadieron a las células ZAG o isoproterenol a las concentraciones mostradas en la figura 51 y se continuó la incubación durante 30 minutos. El medio se retiró y se reemplazó con 0,5 ml de HEPES 20 mM, pH 7,5, EDTA 5 mM e isobutilmetilxantina 0,1 mM, y las placas se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y se enfriaron en hielo durante 10 minutos. La concentración de AMP cíclico se determinó con un ensayo ELISA.

Para estudios de unión, las células se sonicaron en Tris HCl 2 mM, pH7,5, que contenía MgCl_2 0,5 M y las membranas totales en bruto se sedimentaron por centrifugación (13.000 g ; 15 minutos) a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Los estudios de unión se llevaron a cabo a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ incubando membranas ($500 \mu\text{g}$ de proteína) en 0,4 ml de Tris HCl 50 mM, pH 7,5, que contenía MgCl_2 0,5 mM durante 60 minutos con diversas concentraciones de $[^{125}\text{I}]$ ZAG (3.000 a 15.000 cpm) en el ausencia o presencia de ZAG sin etiquetar $100 \mu\text{M}$. Las membranas se precipitaron a continuación por centrifugación a 13000 g durante 20 minutos, se retiró el sobrenadante y se cuantificó el $[^{125}\text{I}]$ unido al sedimento usando un contador Packard Corbra Modelo 5005 Auto-gamma. La unión se analizó usando un análisis de regresión no lineal (GraphPad Prism, Versión 5.04). La unión específica se consideró como la cantidad de ZAG etiquetada desplazada por ZAG no radiactiva.

Aislamiento de ARN y RT-PCR. La cuantificación de los transcritos de ARNm para β 1, β 2 y β 3-AR en las tres células CHO-K1 se basó en la metodología ya descrita (Moniotte S, et al. Real-time RT-PCR for the detection of beta-adrenoceptor messenger RNAs in small human endomyocardial biopsies. *J Mol Cell Cardiol* 33: 2121-2133, 2001). El ARN total se extrajo con Tri Reagent y se cuantificó por espectrofotometría, se transcribieron de forma inversa $800+34 \text{ ng}$ de ARN total, junto con hexámeros aleatorios de 2000 pmol como cebadores usando la transcriptasa inversa Superscript II a $43 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 50 minutos. Las secuencias de la sonda se seleccionaron para obtener T_m S aproximadamente $10 \text{ }^\circ\text{C}$ más baja que el par de cebadores coincidentes. La PCR se llevó a cabo usando el sistema de RT.PCR Easy-A de un tubo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las condiciones de la PCR incluyeron una desnaturalización a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos, una etapa de hibridación a $42-65 \text{ }^\circ\text{C}$ y una etapa de extensión a $68 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 minutos, y con una extensión final a $68 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos. Hubo 40 ciclos de amplificación. La expresión del ARNm de β -AR se determinó mediante el método de Δ -CT usando Stratagenes MxPro, software QPCR v3.00.

Análisis de transferencia de Western. Se descongelaron TAB, TAP, corazón y músculo gastrocnemio, se lavaron en PBS y se lisaron en reactivo de extracción Phosphsafe™ durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de sonicación a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. El sobrenadante formado por centrifugación a 18.000 g durante 5 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ se usó para la transferencia de Western. La proteína citosólica ($5 \mu\text{g}$ para UCP y $20 \mu\text{g}$ para β -AR) se resolvió en geles de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio al 12 % mediante electroforesis a 180 V durante aproximadamente 1 hora y se transfirió a membranas de nitrocelulosa de $0,45 \mu\text{m}$, que se habían bloqueado con leche deshidratada desnatada al 5 % (p/v) (Marvel) en solución salina tamponada con Tris, pH 7,5, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante una noche. Antes de añadir los

anticuerpos primarios, las membranas se lavaron durante 15 minutos en una solución salina tamponada con Tween 20 al 0,1 %. Los anticuerpos primarios y secundarios se usaron a una dilución de 1:1000. La incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente y el desarrollo se efectuó mediante ECL. Las transferencias se escanearon con un densitómetro para cuantificar las diferencias.

Captación de glucosa en tejido adiposo y músculo esquelético. La captación de 2-[1-¹⁴C] desoxi-D-glucosa (2-DG) en adipocitos de epidídimo recién aislados y músculo gastrocnemio se determinó como se ha descrito anteriormente (Russell ST y Tisdale MJ, Antidiabetic properties of zinc- α 2-glycoprotein in ob/ob mice. *Endocrinol* 151: 948-957, 2010).

Análisis estadísticos. Los resultados se muestran como media + SEM de al menos tres experimentos replicados. Las diferencias en las medias entre los grupos se determinaron mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

El efecto de ZAG humana sobre la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con β 1, β 2 y β 3-AR humanas se muestra en la figura 51. A bajas concentraciones (hasta 460 nM) hubo una estimulación específica de la producción de AMP cíclico solo en células transfectadas con el β 3-AR (figura 51A). Sin embargo, a 580 nM también hubo un aumento significativo en el nivel de AMP cíclico en las células CHO transfectadas con el β 2-AR, aunque la magnitud del cambio fue menor que en las células transfectadas con el β 3-AR. No hubo aumento en el AMP cíclico en células CHO transfectadas con el β 1-AR a cualquier concentración de ZAG (figura 51A). En contraste, la isoprenalina (10 μ M) mostró aumentos significativos en el nivel de AMP cíclico en células CHO transfectadas con β 1-, β 2- y β 3-AR, demostrando la falta de especificidad a las tres isoformas de la β -AR (figura 51B). El aumento en AMP cíclico por isoprenalina a través de β 1-, β 2- y β 3-AR fue atenuado por SR59230A, demostrando una falta de especificidad de este agente para el β 3-AR.

Para determinar si la expresión de β -AR fue la misma en las tres líneas celulares, los niveles de ARNm de β 1-AR, β 2-AR y β 3-AR se determinaron mediante RT-PCR como se ha descrito (Moniotte S, et al. Real-time RT-PCR for the detection of beta-adrenoceptor messenger RNAs in small human endomyocardial biopsies. *J Mol Cell Cardiol* 33: 2121-2133, 2001). Los datos en la figura 51C muestran que el nivel de expresión de cada β -AR es el mismo en relación con el gen de mantenimiento GAPDH. Además, el nivel de adenilato ciclasa, según lo determinado por la producción de AMP cíclico en presencia de forskolina, también fue similar en las tres líneas celulares (figura 51D). Estos resultados sugieren que una comparación entre el β -AR en las tres líneas celulares es válida.

La afinidad de la unión de ZAG a los tres β -AR se determinó usando ZAG etiquetados con ¹²⁵I y membranas en bruto de células CHO-K1, β 1, β 2 y β 3 (figuras 51E, F y G). Los datos se evaluaron usando un análisis de regresión no lineal y se muestran los valores de Kd y Bmax. Los datos de unión reflejan la estimulación de la producción de AMP cíclico por ZAG como se muestra en la figura 51A. Por tanto, ZAG se unió principalmente a β 3-AR (Bmax alta y Kd la más baja), menos a β 2-AR (Bmax 20 % de β 3-AR y Kd dos veces β 3-AR), y nada en absoluto a β 1-AR (sin Bmax y alta Kd). La unión inespecífica se determinó mediante la unión de [¹²⁵I] ZAG en presencia de ZAG no etiquetado 100 μ M, y estos valores se restaron de la unión total para dar los valores de unión específica. La actividad lipolítica de ZAG demostró ser destruida por un solo ciclo de congelación y descongelación (figura 51H), probablemente debido a un cambio en la conformación de la proteína. Para determinar si esto alteraba la unión a β -AR se realizaron dos experimentos: (i) En los estudios de unión se usó congelación-descongelación de [¹²⁵I] ZAG, que atenuó completamente la unión a la β 2- y β 3-AR (figuras 51F y G). (ii) Se usó ZAG no etiquetado congelado/descongelado en un ensayo de competición con [¹²⁵I] ZAG, como en la determinación de la unión inespecífica anterior. En contraste con ZAG fresco no etiquetado, esto no tuvo ningún efecto ni sobre la Kd ni sobre la Bmax para la unión a β 2-AR o β 3-AR. Estos resultados sugieren que la congelación/descongelación de ZAG destruye la actividad biológica impidiendo la unión a β -AR.

Para determinar si los efectos de ZAG sobre el peso corporal y la sensibilidad a la insulina se debieron a la interacción con un β -AR, los ratones ob/ob se trataron con ZAG (50 μ g, iv, diariamente), como se notificó anteriormente (Russell ST y Tisdale MJ, Antidiabetic properties of zinc- α 2-glycoprotein in ob/ob mice. *Endocrinol* 151: 948-957, 2010), en ausencia y presencia del antagonista de β -AR inespecífico propanolol (40 mg kg⁻¹, po, diariamente). Este nivel de dosis es más alto que el empleado comúnmente con los agonistas de β 2-AR, ya que se requieren niveles más altos para contrarrestar el efecto de los agonistas β 3-AR (Liu YL y Stock MJ, Acute effects of the beta 3-adrenoreceptor agonist, BRL 35135, on tissue glucose utilisation. *Br J Pharmacol*. 114: 888-894, 1995). El propanolol atenuó completamente la disminución del peso corporal producida por ZAG (figura 52A), aunque los animales tratados con propanolol solo no mostraron una ganancia de peso tan grande como lo hicieron los controles de PBS. Como se notificó anteriormente (Russell ST y Tisdale MJ, Antidiabetic properties of zinc- α 2-glycoprotein in ob/ob mice. *Endocrinol* 151: 948-957, 2010) ratones tratados con ZAG mostraron un aumento de la temperatura corporal (figura 52B), y esto fue totalmente atenuado por propanolol, al igual que la reducción en la excreción urinaria de glucosa (figura 52C). La ZAG sola no tuvo ningún efecto sobre los lípidos hepáticos, aunque hubo un aumento en el glucógeno (figura 52D). El propanolol también bloqueó la reducción en los niveles máximos de glucosa en plasma y el área bajo la curva de glucosa (AUC) inducida por ZAG en el ensayo de tolerancia oral a la glucosa (figura 53A), así como la reducción correspondiente en los niveles máximos de insulina en plasma (figura

53B). Los animales tratados con ZAG mostraron un aumento en la captación de glucosa en el músculo gastrocnemio en presencia de insulina (10 nM) (figura 53C), y esta se atenuó completamente en el músculo gastrocnemio de ratones que recibieron propanolol. Los adipocitos de epidídimo de ratones tratados con ZAG también mostraron una mayor captación de glucosa en ausencia y presencia de insulina (figura 53D), y esta también se atenuó completamente en animales tratados con propanolol. La disminución en los niveles séricos de triglicéridos (TG) y ácidos grasos no esterificados (NEFA) producidos por ZAG también se atenuaron con propanolol (figuras 53E y F). Estos resultados sugieren que los efectos biológicos de ZAG están mediados a través de un β -AR. Para determinar si ZAG puede aumentar la insulina, se determinó el efecto sobre la expresión de Glut4. Tanto la insulina como ZAG aumentaron la expresión de Glut4 en el músculo gastrocnemio (figura 53G) y TAB (figura 53H), pero la combinación no produjo un aumento respecto a la de la insulina sola. Estos resultados sugieren que ZAG influye en las mismas rutas de señalización que la insulina, pero no aumenta la señalización de insulina.

Se sabe que varios agonistas de β 3 aumentan la expresión del β 3-AR. Para determinar si ZAG tenía el mismo efecto, se cuantificó la expresión de β 3-AR tisular mediante transferencia de Western después de 5 días de tratamiento de ratones ob/ob con ZAG. Los resultados en la figura 54 muestran un aumento de dos veces en la expresión de β 3-AR en el músculo gastrocnemio (figura 54A), un aumento del 89 % en TAP (figura 54B) y un aumento del 85 % en TAB (figura 54C). En contraste, no hubo cambios en la expresión de β 1-AR o β 2-AR en el músculo gastrocnemio (figura 55A) o TAB (figura 55B) y no hubo cambios en la expresión de β 1-AR en el corazón (figura 55C), pero un pequeño aumento en β 2-AR que acababa de alcanzar significación (figura 55C).

Se esperaría que el aumento de la expresión de β 3-AR en TAP y TAB (figura 54) causara un aumento de la expresión de UCP1, que se observa tanto en TAP (figura 56A) como en TAB (figura 56B) después de la administración de ZAG. Los experimentos *in vitro* han demostrado que la inducción de la expresión de UCP3 por ZAG fue atenuada por el inhibidor de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPKK) PD98059, lo que sugiere la participación de MAPK en este proceso. Estudios anteriores han demostrado un aumento en la expresión de ERK en TAB de ratones tratados con ZAG. Se esperaría que esto causara un aumento en la expresión de UCP3 en TAB, como se observó (figura 56C). También se notificó previamente un aumento en UCP3 en el músculo esquelético de ratones ob/ob después de la administración de ZAG. El aumento de la expresión de los UCP proporcionaría un sumidero para el NEFA liberado desde el tejido adiposo, generando calor como se notificó anteriormente.

Además, el tratamiento con ZAG produjo un aumento en la expresión de AMPK en el músculo esquelético (figura 56D), lo que causaría un aumento de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, disminuyendo la disponibilidad para la síntesis de triglicéridos, así como estimulando la absorción de glucosa a través de expresión aumentada de GLUT4.

Este estudio ha descubierto que ZAG se une principalmente al β 3-AR, con una unión intermedia al β 2-AR, y sin unión al β 1-AR. El β 3-AR humano es un 51 % homólogo en la secuencia de aminoácidos del β 1-AR y un 46 % homólogo al β 2-AR. La Bmax para la unión de ZAG al β 3-AR es aproximadamente tres veces la del β 2-AR, mientras que la Kd es aproximadamente la mitad. La Kd para ZAG para la unión al β 3-AR es aproximadamente 100 veces más baja que la de CGP12177, un agonista parcial, mientras que la Bmax es solo ligeramente inferior. Estos resultados se obtuvieron usando [¹²⁵I] ZAG que puede tener una actividad de unión no equivalente a la ZAG nativa, lo que podría causar una sobre- o subestimación de la Kd. Si bien la mayoría de los estudios con ZAG se han realizado en roedores, existe una diferencia entre β 3-AR humano y de roedor. Por tanto, BRL37344 es menos eficaz para estimular la adenilil ciclasa a través del β 3-AR humano que de roedor, mientras que CGP12177 es un agonista eficaz en el β 3-AR humano, pero un mal agonista parcial en el β 3-AR de rata. No se sabe cómo se une ZAG a β 3-AR y β 2-AR, mientras que no se une a β 1-AR, pero la conformación de la proteína es muy importante, ya que la unión es destruida con un solo ciclo de congelación/descongelación, como lo es también la capacidad de ZAG para estimular la lipólisis en adipocitos murinos. Los valores de Kd están en el intervalo esperado, tanto de estudios sobre la estimulación de la lipólisis como de la producción de AMP cíclico por ZAG. Sin embargo, son más de 10 veces más bajas que la concentración plasmática humana notificada usando un ELISA (600 nM), pero son comparables con las notificadas usando espectrometría de masas (85 nM). Si el valor anterior fuera cierto, ZAG estaría estimulando al máximo el β 2 y el β 3-AR a concentraciones plasmáticas normales, lo que claramente no es correcto. Se debe tener cuidado al interpretar las concentraciones plasmáticas de ZAG usando un ELISA, ya que puede haber otros componentes que se unen al anticuerpo anti-ZAG, dando concentraciones aparentemente más altas. Por tanto, se ha demostrado que ZAG se une inespecíficamente a un anticuerpo anti-eritropoyetina humana monoclonal dando valores aparentemente más altos en muestras que contienen cantidades aumentadas de ZAG urinaria.

El efecto de ZAG sobre la obesidad y la diabetes en el modelo de ratón ob/ob puede deberse a su capacidad para unirse a β 3-AR. Por tanto, los agonistas de β 3-AR muestran efectos anti-obesidad en modelos de roedores similares a ZAG, que indujeron una movilización aumentada de triglicéridos de los depósitos de TAB, una mayor oxidación de las grasas y un aumento de la termogénesis mediada por TAP, lo que da como resultado una reducción selectiva en la grasa corporal y la preservación de masa libre de grasa. Al igual que con ZAG, los efectos anti-diabéticos de los agonistas de β 3-AR son independientes de los efectos anti-obesidad, y ocurren a niveles de dosis que no inducen pérdida de peso. El tratamiento de ratones ob/ob con el agonista de β 3-AR BRL 35135 normalizó los niveles de glucosa en plasma y redujo significativamente la insulina en plasma y los niveles de ácido graso no esterificado (NEFA). Al igual que con ZAG, BRL 35135 estimuló la captación de glucosa en tres tipos de músculo esquelético,

TAP, TAB, corazón y diafragma, que fue independiente de la acción de la insulina. Otro agonista de β_3 , L-796568 aumentó la lipólisis y el gasto energético en hombres obesos cuando se administró en una dosis única. Sin embargo, el tratamiento durante 28 días no tuvo un efecto lipolítico o termógeno importante, aunque disminuyó la concentración de triacilglicerol. Esto puede deberse a un reclutamiento insuficiente de tejidos sensibles a β_3 -AR en seres humanos, o a una regulación negativa de β_3 -AR con dosificación crónica. Los estudios en tejido adiposo abdominal subcutáneo humano muestran que el β_3 -AR juega un papel más débil en el control de la lipólisis que el descubierto en los roedores, y que la movilización de lípidos se realiza principalmente a través de los subtipos de β_1 y β_2 -AR. Por tanto, ZAG puede ejercer su efecto en humanos a través de un β_2 -AR en lugar de β_3 -AR.

Este estudio ha demostrado que el propanolol, un antagonista de β -AR inespecífico, atenúa el efecto de ZAG en la reducción del peso corporal y la excreción urinaria de glucosa, aumentar la temperatura corporal, mejorar la respuesta a la glucosa en el ensayo de tolerancia a la glucosa oral y aumenta la captación de glucosa en el músculo esquelético y TAB de ratones ob/ob, cuando se administra a niveles de dosis alta. Además, la congelación-descongelación, que destruyó la capacidad de ZAG para inducir la lipólisis en TAB y reducir la grasa corporal en ratones obesos de edad avanzada, también atenúa por completo su capacidad de unirse a β_2 - y β_3 -AR humanos. Estos resultados confirman que los efectos anti-obesidad y anti-diabéticos de ZAG están mediados a través de un β -AR.

Este estudio también ha demostrado que la administración de ZAG a ratones ob/ob aumenta la expresión de la proteína β_3 -AR en TAP, TAB y músculo esquelético. Este efecto también se observa con otros agonistas de β_3 -AR. Por tanto, el tratamiento crónico de ratones ob/ob con el agonista de β_3 -AR, BRL35135, produjo un aumento de dos veces en el ARNm de β_3 -AR en TAP. Se notificaron efectos similares con otro agonista de β_3 -AR, CL 316.243, en ratas Zucker fa/fa, y en adipocitos de humanos adultos. Por tanto, la capacidad de ZAG para inducir la expresión de β_3 -AR aumentaría su efecto sobre la obesidad y la diabetes. El β -AR reducido mediaba en la lipólisis, y la oxidación de grasa observada en sujetos obesos puede deberse a niveles bajos de ZAG, y la administración de ZAG podría mejorar la sensibilidad. Ciertamente, la administración de ZAG a ratones ob/ob aumentó la sensibilidad de los adipocitos de epidídimo al efecto lipolítico del agonista β_3 -AR, BRL 37344. La capacidad de ZAG para inducir la expresión de β_3 -AR explicaría la falta de respuesta del tejido adiposo de Ratones knock-out para ZAG, al efecto lipolítico del agonista de β_3 -AR, CL316243.

Usando ratones knock-out, se ha demostrado que el efecto antiobesidad de la estimulación con β_3 -AR es a través de la degradación dependiente de UCP-1 de los ácidos grasos liberados a partir de TAB. Hasta hace poco, el TAP se consideraba restringida a roedores y humanos neonatos. Sin embargo, tres estudios independientes identificaron de manera concluyente el TAP en seres humanos adultos, principalmente detrás de los músculos de la parte inferior del cuello y la clavícula, así como a lo largo de la columna vertebral del tórax y el abdomen. Se ha demostrado que los agonistas de β_3 -AR estimulan la remodelación de TAB en TAP, determinado histológicamente, o por la aparición de UCP1. La aparición de UCP1 en TAB en respuesta a ZAG sugeriría que esta inicia un proceso similar. Estudios anteriores han sugerido un papel para el β_3 -AR en la inducción de UCP1 por ZAG. Se ha demostrado que los agonistas de β_3 -AR inducen la regulación positiva de UCP1 en TAP a través de la estimulación de la proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK) corriente abajo de AMP cíclico/proteína cinasa A, lo que lleva a la activación (fosforilación) del receptor activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR) El coactivador γ 1 (PCG-1 α), así como el ATF-2, permitiendo que los elementos CRE y PPAR del potenciador UCP1 estén ocupados.

ZAG es un ligando de origen natural con actividad agonista selectiva hacia el β_3 -AR. Muy pocas proteínas muestran dicha actividad, aunque el péptido hipotensor adrenomedulina también puede activar β_3 -AR causando la relajación del músculo ileal. Dado que ZAG es mucho más grande que los agonistas de catecolamina normales, es posible que la activación se produzca a través de modulación alostérica. Sin embargo, estudios previos que usaron FML han demostrado que la unión está completamente atenuada por el propanolol, lo que sugiere una interacción directa con un β_3 -AR. Es probable que solo una parte de la molécula de ZAG se requiera para la unión, ya que los indicios sugieren que los fragmentos trípticos de un factor lipolítico (Mr aproximadamente 5 kDa) todavía eran biológicamente activos. Es posible que determinados grupos en aminoácidos, tales como hidroxilo de serina, puedan imitar las interacciones de enlace de hidrógeno observadas entre las catecolaminas y el β_3 -AR. Los estudios de modelado molecular pueden proporcionar información adicional sobre las interacciones implicadas. Se ha demostrado que los agonistas de β_3 -AR tales como BRL37344 aumentan la expresión de ZAG en los adipocitos, y también se ha sugerido que la inducción de la expresión de ZAG por ZAG se produce a través de un β_3 -AR. Por tanto, el β_3 -AR es importante tanto en la producción como en los efectos biológicos de ZAG, y ZAG es un agonista natural de β_2 - y β_3 -AR.

EJEMPLO 9

Uso de zinc- α_2 -glucoproteína en la síntesis de músculo esquelético para el tratamiento de la caquexia

El objetivo del estudio fue explorar el mecanismo de ganancia de proteína neta en ratones ob/ob cuando se tratan con ZAG. En algunos experimentos de tratamiento con ZAG, se observa que los ratones ob/ob pierden grasa corporal significativa pero simultáneamente ganan una cantidad de masa muscular (compensatoria) como proteína.

La síntesis de proteínas se midió mediante la incorporación de L-[2,6-3H] fenilalanina en material insoluble en ácido con 2 h de incubación a 37 °C sin rojo fenol y saturado con O₂CO₂ (95:5). El índice de síntesis de proteínas se calculó dividiendo la cantidad de radiactividad unida a las proteínas por la cantidad de radiactividad soluble en ácido.

- 5 La degradación de la proteína se determinó mediante la liberación de tirosina (21) a partir del músculo gastrocnemio durante 2 h en un tampón Krebs-Henselit oxigenado que contenía glucosa 5 mM y cicloheximida 0,5 mM.

Los resultados que se muestran en la figura 30 indican que la ganancia neta de proteínas en el músculo esquelético es consecuencia de una disminución de la degradación de las proteínas y un aumento de la síntesis de proteínas.

10 EJEMPLO 10

Administración oral de zinc- α_2 -glucoproteína para pérdida de peso y reducción de la glucosa

- 15 El objetivo del estudio fue explorar la capacidad de ZAG para generar pérdida de peso a través de la pérdida de grasa y la reducción de los niveles de glucosa en plasma y orina en un período prolongado de tiempo y mediante la administración oral de ZAG. Sorprendentemente, la ZAG humana recombinante administrada por vía oral fue capaz de generar el mismo conjunto de respuestas que la administración intravenosa de ZAG humana recombinante, y fue capaz de hacerlo sin entrar en el espacio plasmático desde el espacio digestivo del cuerpo. Un novedoso mecanismo de acción funciona para transducir la señal de ZAG humana recombinante presente en el espacio digestivo, lo que provoca la generación de ZAG murino endógeno en el espacio de plasma y TAB y otros tejidos, como se ve en las figuras 34 y 35.

- 20 Se administraron 50 μ g por día de rhZAG p.o. a los ratones Aston ob/ob. La dosificación oral se consiguió suponiendo un consumo de agua de 5 ml/día, y añadiendo ZAG para conseguir una dosis de 50 μ g por día según esa suposición. No se intentó corregir las variaciones de consumo en un día determinado.

- 25 La administración de ZAG p.o generalmente duplica los resultados obtenidos mediante administración i.v. Esta amplia gama de efectos incluye una importante pérdida de peso (figuras 31, 36, 41, 47), un ligero aumento en la temperatura corporal representativo del aumento del gasto energético (figuras 32, 37, 43), una disminución de la glucosa en orina y plasma (figuras 33, 42), y una mejora significativa en la respuesta al ensayo de tolerancia a la glucosa oral (figuras 40, 48).

- 30 El mecanismo de acción reproduce el de la inyección intravenosa, con una diferencia crítica. Los mecanismos son similares, ya que existe un amplio conjunto de respuestas en TAB, TAP, plasma, hígado y músculo esquelético que son idénticos. La diferencia fundamental es que la rhZAG administrada por vía oral nunca entra en el espacio ocupado por la sangre y los órganos del cuerpo. En cambio, la rhZAG administrada permanece en el espacio del sistema digestivo, persistiendo 24 horas o más en el estómago. La sorprendente y crítica diferencia en el mecanismo es que el animal responde a la dosificación oral de rhZAG mediante la creación de su propia ZAG endógena, que media en el conjunto posterior de respuestas mencionadas anteriormente.

Tres experimentos se describen en detalle a continuación.

- 35 *Experimento uno (estudio de ZAG oral de 8 días):* se administraron 50 μ g de ZAG p.o. diariamente en agua potable. Se observó que se produjo una pérdida de peso, un aumento de la temperatura corporal y un descenso de la glucosa en la orina. Un aumento en ZAG murino en suero y TAB, pero una ausencia de rhZAG en suero demuestra que la administración de rhZAG por vía oral está regulando positivamente la expresión de ZAG de ratón.

- 40 *Experimento dos (estudio de ZAG más propranolol oral de 8 días):* 50 μ g de ZAG administrado p.o. Diariamente, con y sin propranolol. El propranolol bloquea todos los efectos de ZAG, incluyendo la disminución del peso corporal y la glucemia en el ensayo de tolerancia, y también bloquea el aumento de la temperatura corporal y el aumento de ZAG de ratón en plasma, lo que confirma que esto ocurre a través de un receptor beta adrenérgico. El propranolol atenúa totalmente la pérdida de peso con ZAG, así como el aumento de la temperatura corporal. Parece que lo hace impidiendo el aumento de ZAG de ratón en el suero después de la administración oral de rhZAG. La segunda transferencia muestra que no hay rhZAG en el suero, como se esperaría si rhZAG permanece secuestrado en el tracto GI sin ser transferido al torrente sanguíneo.

- 45 Por tanto, la ZAG oral funciona uniéndose a los receptores beta adrenérgicos del tracto GI, lo que causa un aumento del ZAG en suero y los efectos consiguientes sobre el peso corporal y la glucosa en la sangre. La figura 38 muestra que el propranolol bloquea el aumento en el suero murino de ZAG debido al tratamiento con rhZAG p.o. Adicionalmente, la figura 39 muestra que no se detecta ZAG humana en suero de ratón.

- 50 *Experimento tres (estudio oral):* ZAG administrada p.o. diariamente durante un período de tiempo prolongado, con un grupo de recuperación separado del grupo tratado a 30 días (datos no mostrados).

- 55 La pérdida de peso, la temperatura corporal y la disminución de la glucosa en la orina reproducen y amplían los

resultados obtenidos mediante la inyección intravenosa. Los animales perdieron hasta un 13,5 % de peso corporal a la mitad del estudio. Después de la mitad de duración del tratamiento del estudio, los animales tratados mostraron lo siguiente. En la glucosa urinaria, pasaron 12 días antes de que ocurriera una reversión del 50 % al control, y se produjo una reversión completa a los niveles de control de glucosa urinaria al final de la duración del estudio (datos no mostrados). La pérdida de peso corporal alcanzó el 13,5 %, y en el día del final del estudio, los animales habían revertido solo el 46 % hacia los pesos de control (datos no mostrados). Al igual que la acción de ZAG cuando se administró por vía intravenosa, ZAG administrada por vía oral causó pérdida de peso pero no cambios en la actividad (no mostrada), el consumo de alimentos (datos no mostrados) o el consumo de agua (datos no mostrados).

10 EJEMPLO 11

La administración de zinc- α_2 -glucoproteína consigue la pérdida de grasa corporal y una ganancia simultánea en masa muscular en los músculos esqueléticos

15 En algunos experimentos, se ha observado que los ratones ob/ob perderán grasa corporal significativa, pero simultáneamente ganarán una cantidad de masa muscular (compensatoria) como proteína. Esto se ha explorado y la ganancia neta de proteína se debe a una ralentización de la degradación de las proteínas y al aumento concomitante en la síntesis de proteínas (figura 30).

20 EJEMPLO 12

Administración oral de zinc- α_2 -glucoproteína en comparación con administración i.v.

25 El objetivo del estudio fue comparar la eficacia de ZAG a través de diversas vías de administración. A los ratones se les administraron por vía oral 50 μ g de ZAG o PBS (control). Los resultados se muestran en las figuras 31, 32, 33 (estudio de ZAG oral de 8 días); 36, 37, 40 (estudio de ZAG oral más propranolol de 8 días); y figuras 47, 48 (estudio de sondaje gástrico con ZAG oral). Como se muestra en estos estudios repetidos, se demostró inesperadamente que ZAG es eficaz para conseguir un cambio de peso cuando se administra por vía oral simplemente mezclando dosis bajas de ZAG en el agua potable de ratones sin requerir la absorción sistémica de ZAG administrada. La dosificación oral típica de proteínas, tales como insulina, puede requerir hasta 10 veces (o megadosificación) la dosis intravenosa para conseguir el mismo nivel de eficacia y una eficacia tan limitada requiere la absorción sistémica de dichas proteínas.

35 Se generaron datos adicionales (tabla 6) que muestran que, sorprendentemente, la dosificación oral de ZAG alcanzó hasta el 75 % de la eficacia de pérdida de peso de la administración intravenosa con exactamente la misma dosis. Además, después de 5 días de dosificación, la eficacia de reducción de la glucosa en orina es igual de buena cuando se administra por vía oral o i.v.

40 La dosificación oral con rhZAG hace que los animales generen ZAG endógeno en respuesta, como se muestra en las figuras 34, 35 y 38. El propranolol bloquea el aumento de ZAG en suero murino debido al tratamiento con rhZAG p.o. (figura 38), pero la ZAG humana administrada no se encuentra en el plasma (figura 39).

45 La figura 38 es una transferencia de Western de ZAG usando anti-ZAG de ratón en suero de ratón de ratones tratados con y sin ZAG en ausencia o presencia de propranolol. No se detecta ZAG humana en el suero de ratón. La figura 39 es una transferencia de Western de ZAG usando anti-ZAG humana en suero de ratón de ratones tratados con y sin ZAG en ausencia o presencia de propranolol (figura 39).

Tabla 6 - Pérdida de peso corporal (y % de pérdida i.v. durante el mismo tiempo) debido a la dosificación diaria de ZAG a 50 μ g/día en ratones ob/ob de 70 g por ROA durante 8 o 20 días: ROA 8 días 20 días

intravenosa	-6,0 %	(100 %)	-9,0 %	(100 %)
oral-agua(1)	-4,3 %	(72 %)	-6,1 %	(68 %)
oral-sondaje(2)	-2,3 %	(38 %)	NA	
oral-caseína(3)	-3,4 %	(57 %)	-6,8 %	(76 %)

(1) Literalmente en el agua potable

(2) Sondaje coloca la dosis de ZAG directamente en el estómago, sin pasar por la vía del sistema digestivo que precede al estómago (boca, faringe, esófago)

(3) La caseína se incluyó con la ZAG en el agua potable.

50 Aunque la invención se ha descrito con referencia al ejemplo anterior, se entenderá que modificaciones y variaciones están abarcadas. Por consiguiente, la invención solo está limitada por las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> ASTON UNIVERSITY

TISDALE, Michael J.
 RUSSELL, Steven

5 <120> GLUCOPROTEÍNAS QUE TIENEN PROPIEDADES DE MOVILIZACIÓN DE LÍPIDOS Y USOS
 TERAPÉUTICOS DE LAS MISMAS

<130> P52504WO/JCH

10 <150> US 61/420.677
 <151> 07-12-2010

<150> US 61/384.652
 <151> 20-09-2010

15 <150> US 61/358.596
 <151> 25-06-2010

<160> 7

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 276
 <212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Gln Glu Asn Gln Asp Gly Arg Tyr Ser Leu Thr Tyr Ile Tyr Thr Gly
 1 5 10 15
 Leu Ser Lys His Val Glu Asp Val Pro Ala Phe Gln Ala Leu Gly Ser
 20 25 30
 Leu Asn Asp Leu Gln Phe Phe Arg Tyr Asn Ser Lys Asp Arg Lys Ser
 35 40 45
 Gln Pro Met Gly Leu Trp Arg Gln Val Glu Gly Met Glu Asp Trp Lys
 50 55 60
 Glu Asp Ser Gln Leu Gln Lys Ala Arg Glu Asp Met Glu Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Asp Ile Val Glu Tyr Tyr Asn Asp Ser Asn Gly Ser His Val Leu Gln
 85 90 95
 Gly Arg Phe Gly Cys Glu Ile Glu Asn Asn Arg Ser Ser Gly Ala Phe
 100 105 110
 Trp Lys Tyr Tyr Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Glu Phe Asn Lys Glu
 115 120 125
 Ile Pro Ala Trp Val Pro Phe Asp Pro Ala Ala Gln Ile Thr Lys Gln
 130 135 140
 Lys Trp Glu Ala Glu Pro Val Tyr Val Gln Arg Ala Lys Ala Tyr Leu

ES 2 706 913 T3

<220>
<223> Construcción sintética

5 <400> 4

Ile Glu Phe Thr Asp
1 5

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética

15 <400> 5

Asp Glu Val Asp
1

20 <210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 6

Ile Glu Phe Thr Asp
1 5

30 <210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> construcción sintética: Enlazador peptídico

40 <400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación que comprende una zinc- α_2 -glucoproteína (ZAG) para su uso en el tratamiento de la obesidad en un sujeto aumentando el nivel endógeno del sujeto de una zinc- α_2 -glucoproteína (ZAG), en la que la formulación se administra al sujeto mediante administración oral.
2. La formulación para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en la que el sujeto es un ser humano.
- 10 3. La formulación para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en la que la formulación se administra diariamente durante al menos 10 o 21 días.
4. La formulación para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en la que la formulación se administra dos veces al día, una vez cada tres días, semanalmente o mensualmente.
- 15 5. La formulación para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en la que la formulación se administra en combinación con un agonista de β_3 .

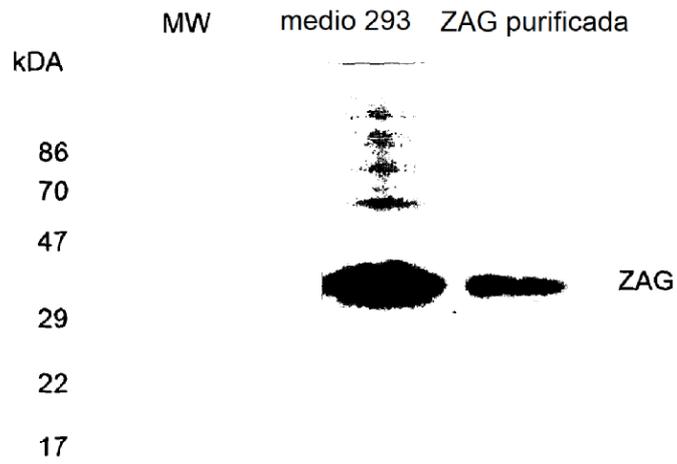


FIG. 1A

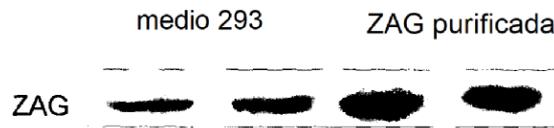


FIG. 1B

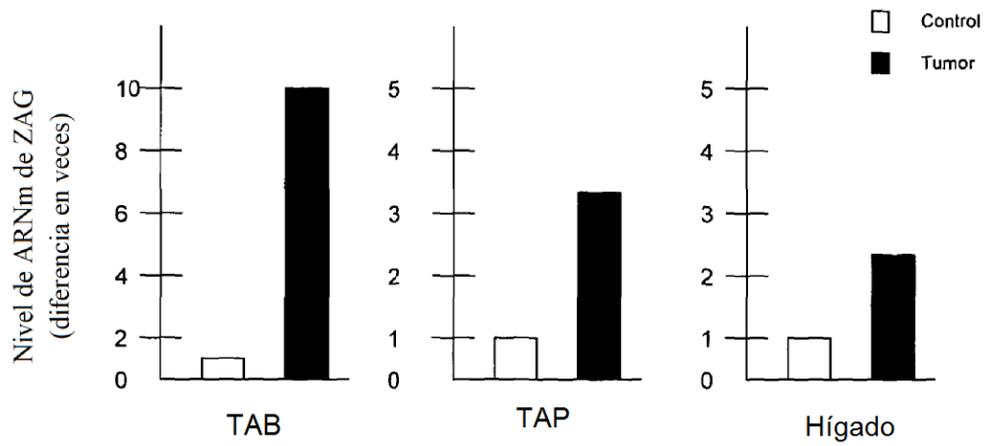


FIG. 1C

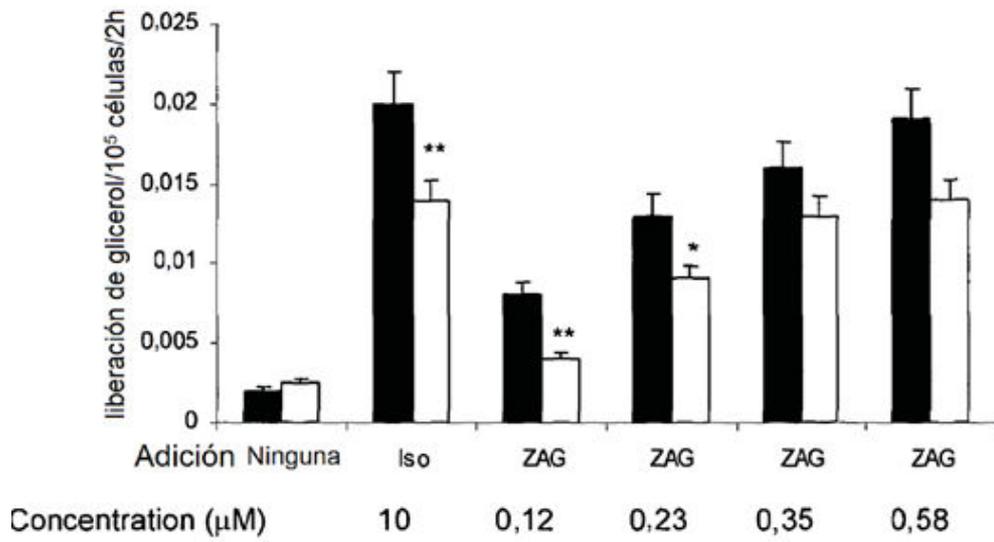


FIG. 1D

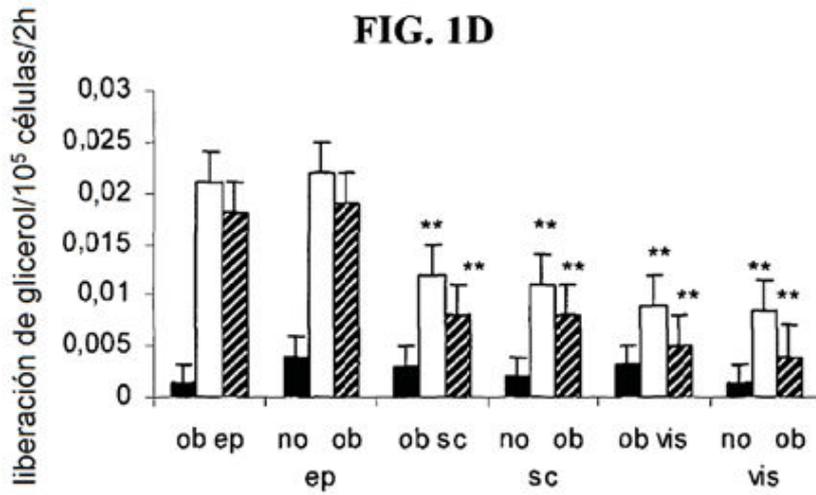


FIG. 1E

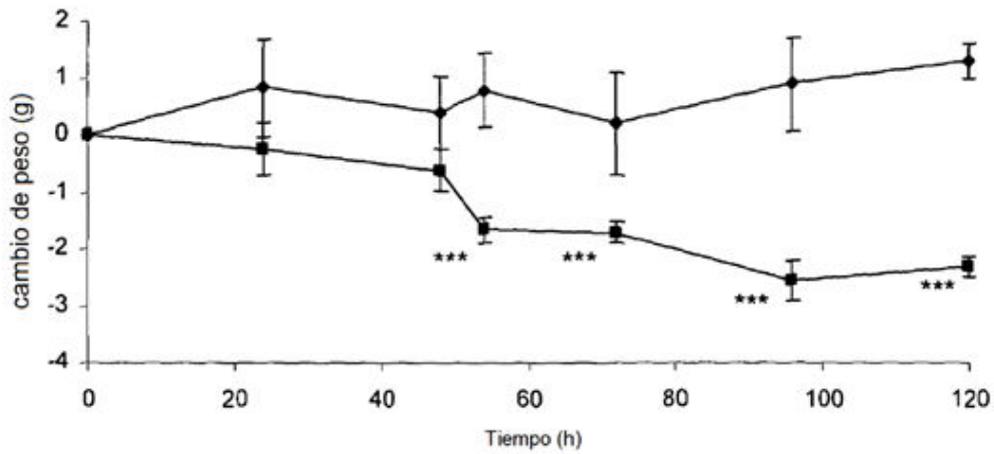


FIG. 1F

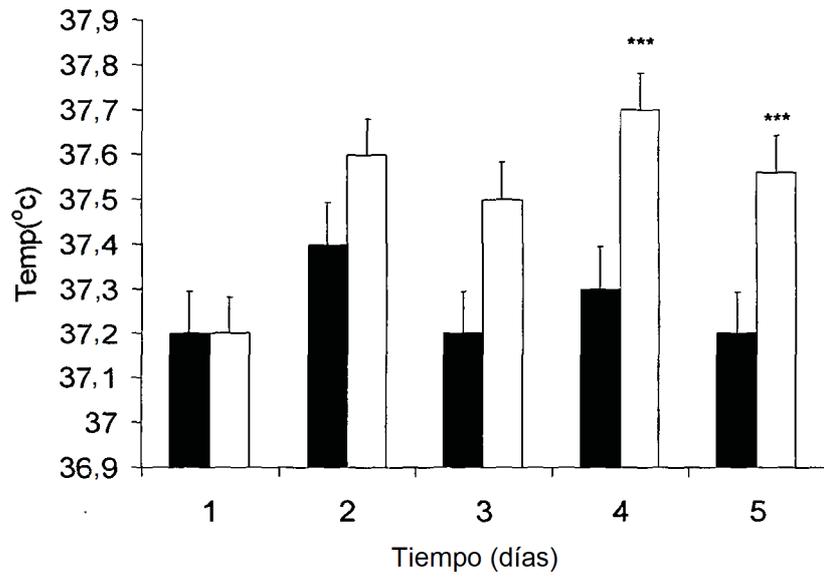


FIG. 1G

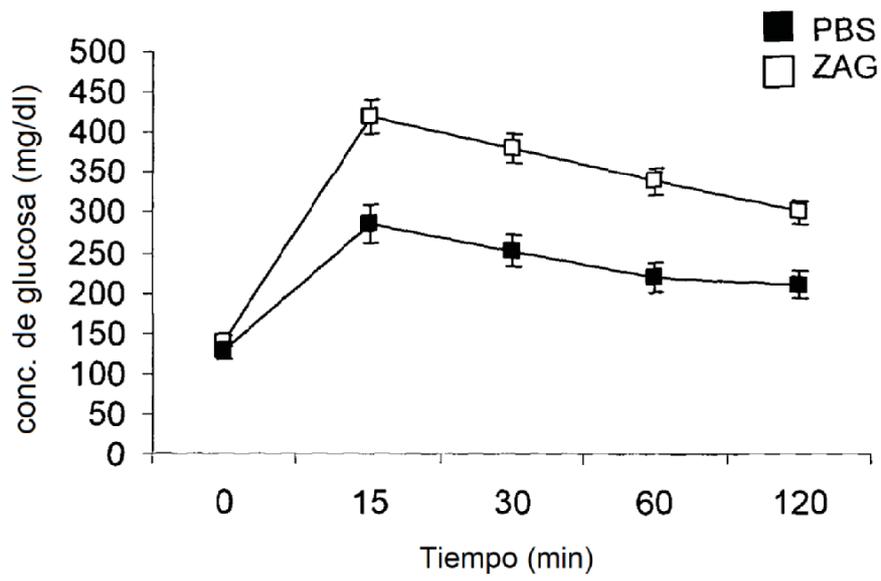


FIG. 2A

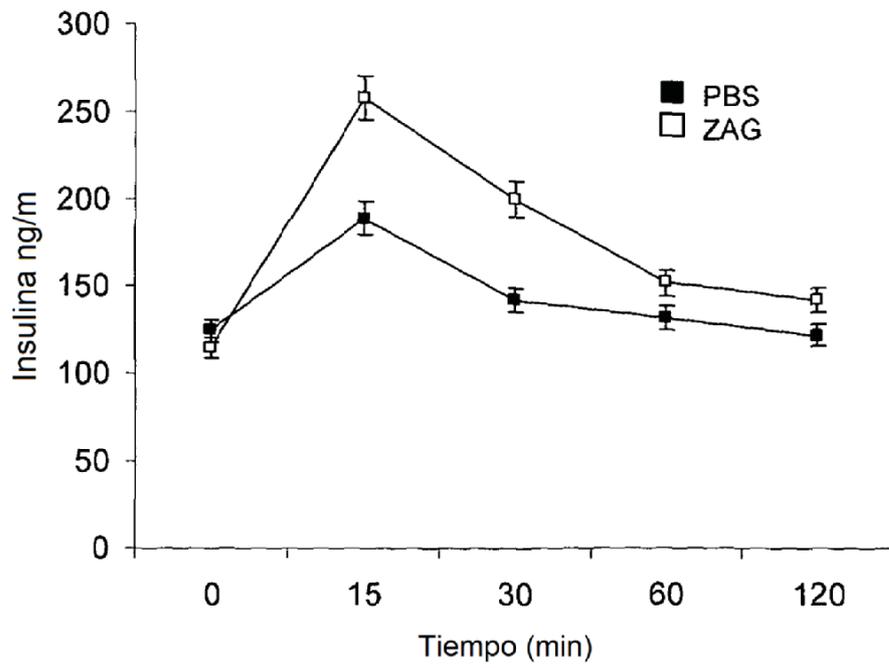


FIG. 2B

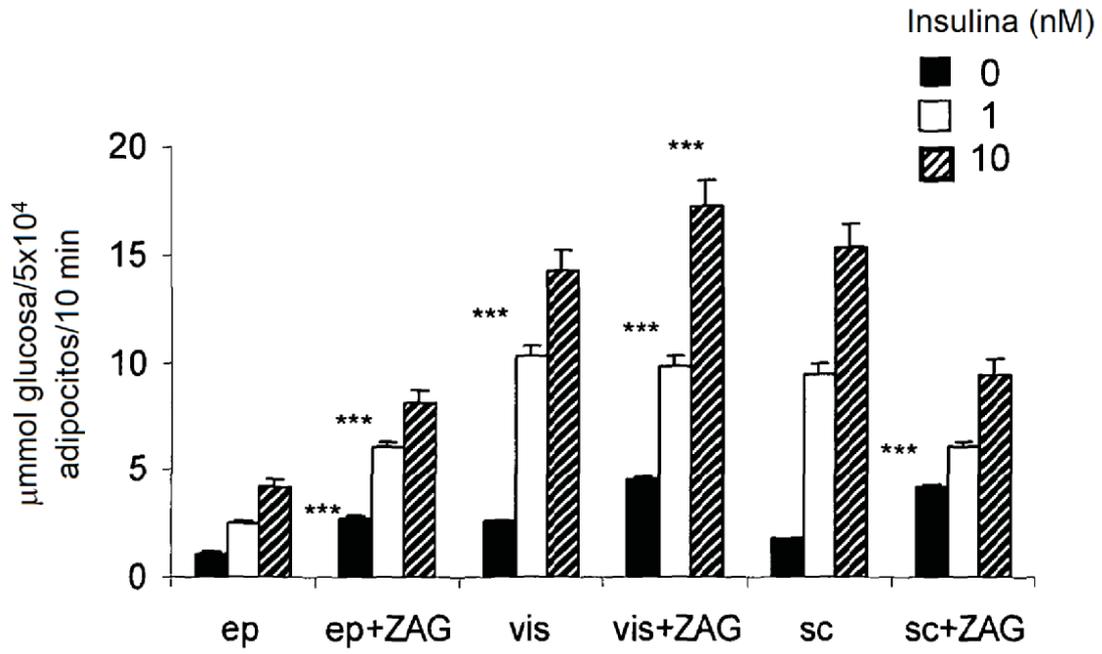


FIG. 2C

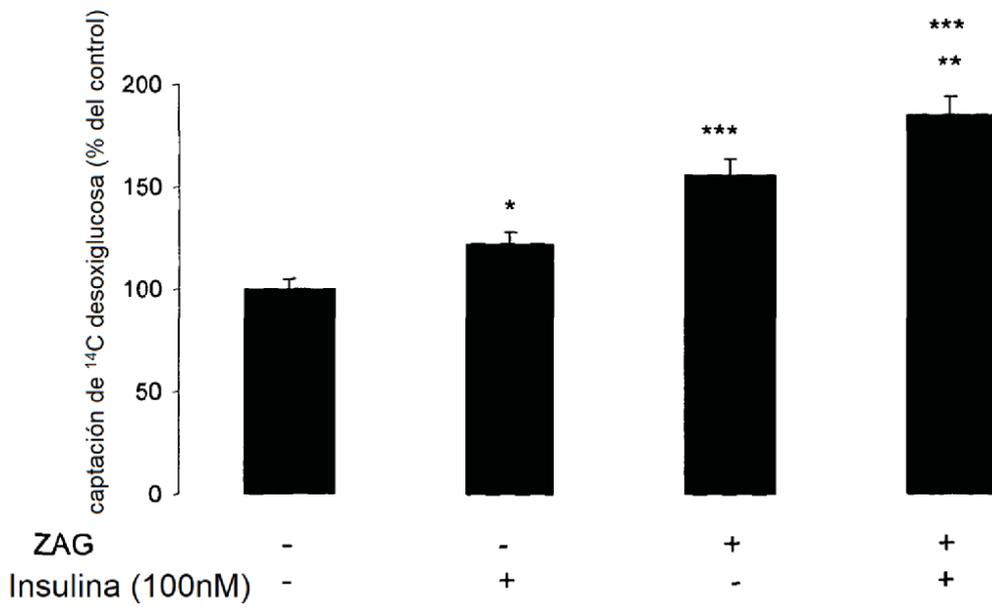


FIG. 2D

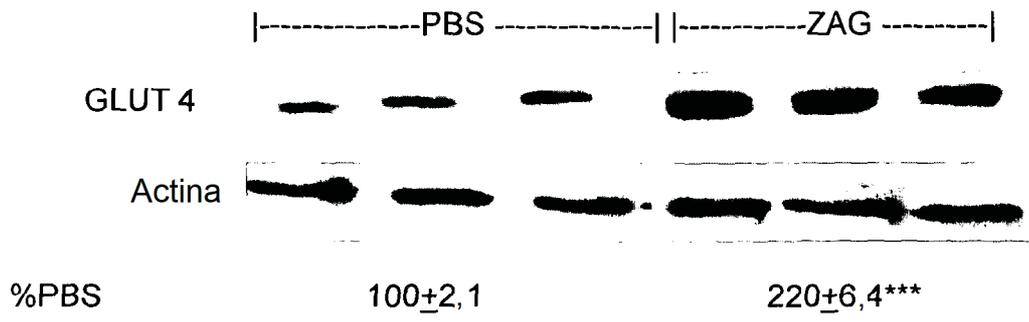


FIG. 2E

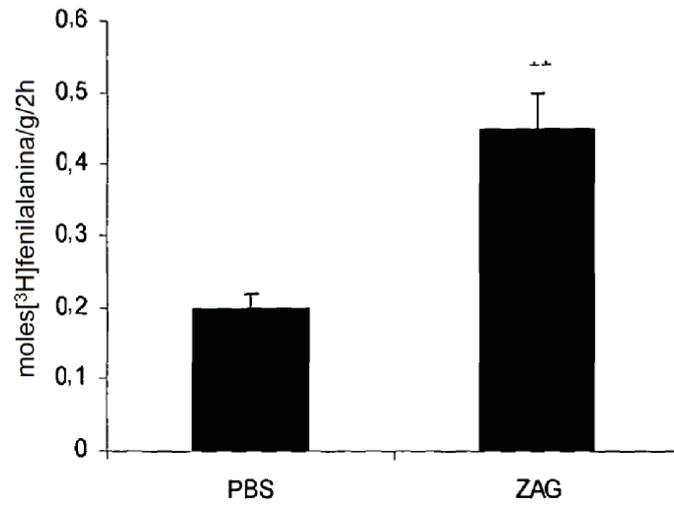


FIG. 3A

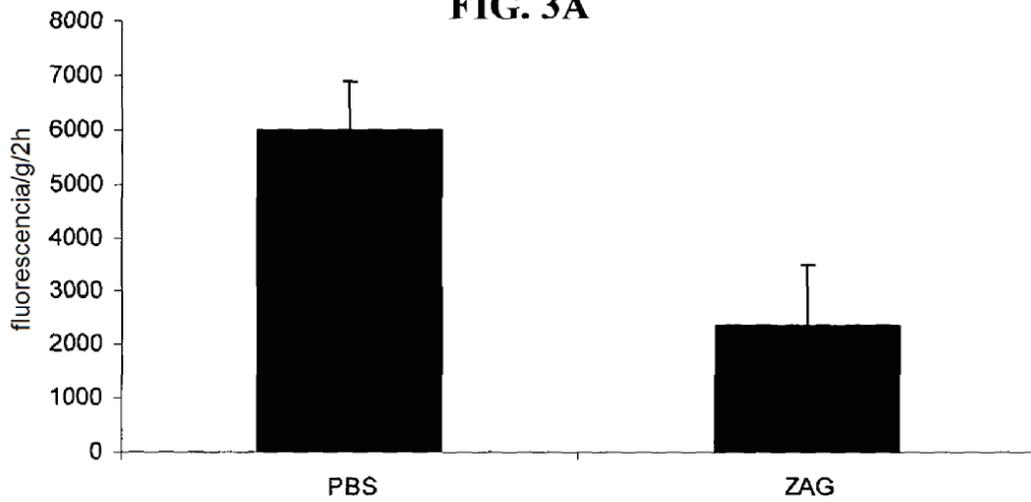


FIG. 3B

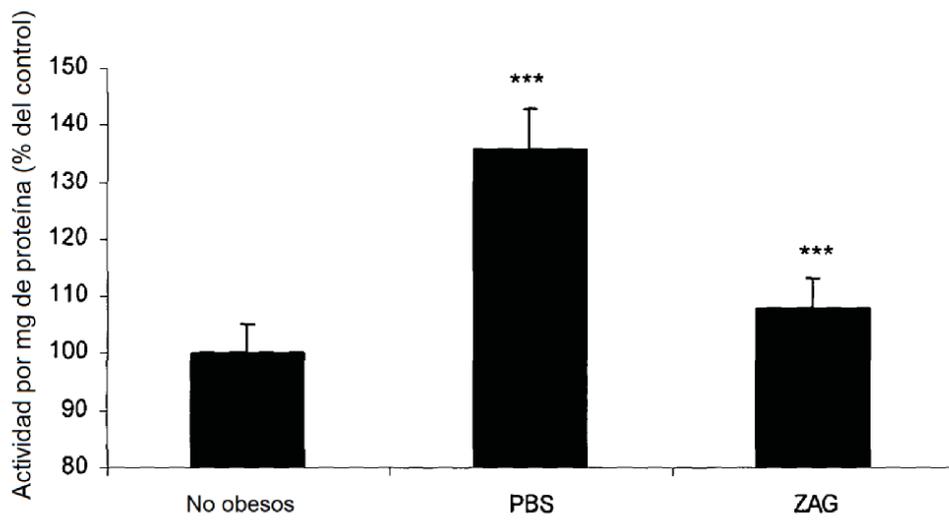


FIG. 3C

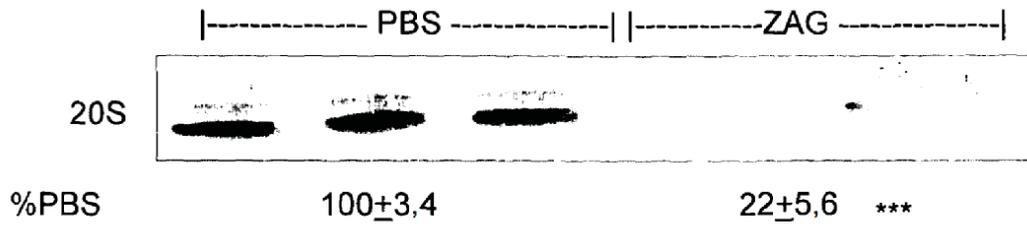


FIG. 3D

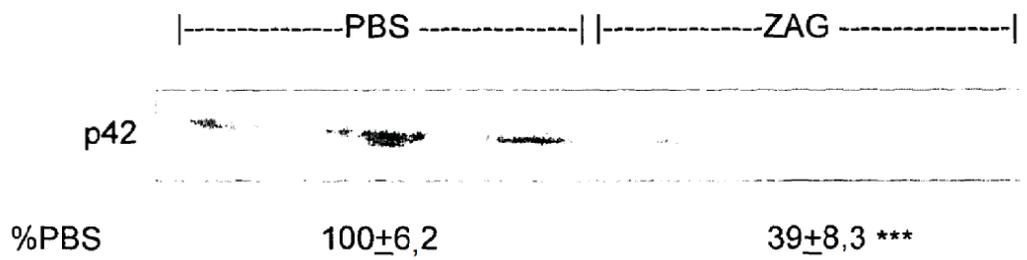


FIG. 3E

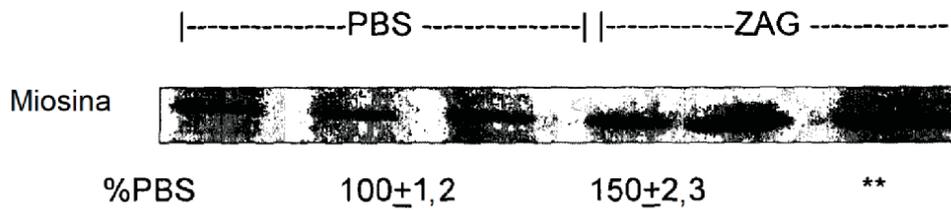


FIG. 3F

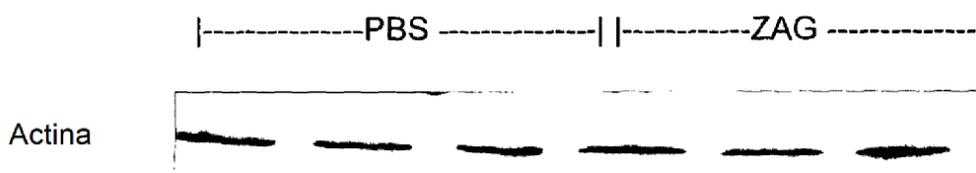


FIG. 3G

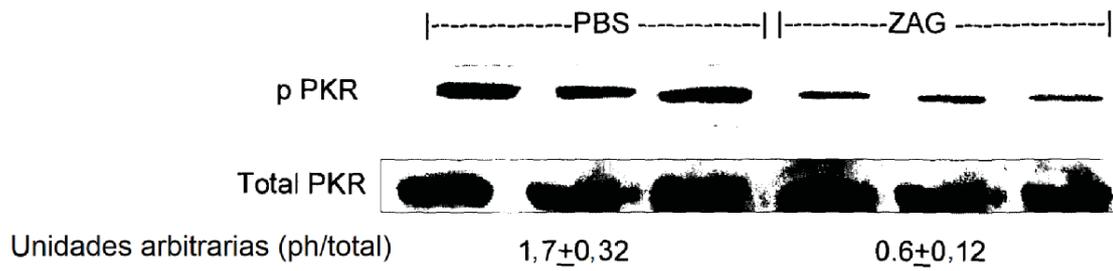


FIG. 4A

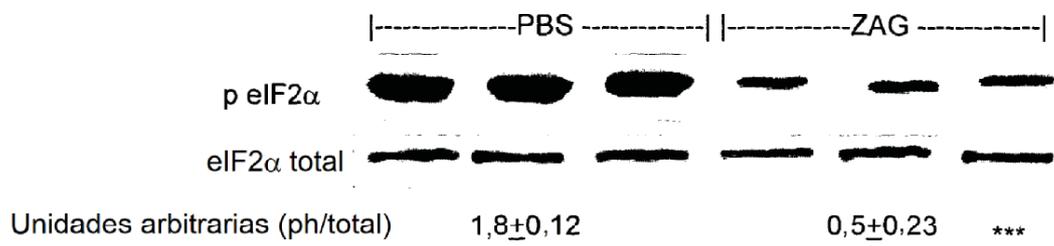


FIG. 4B

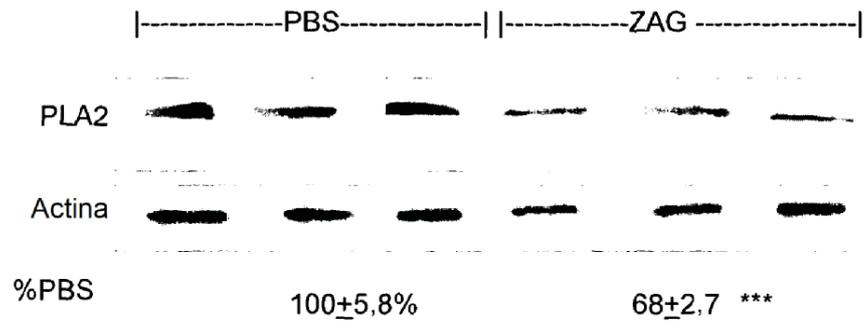


FIG. 4C

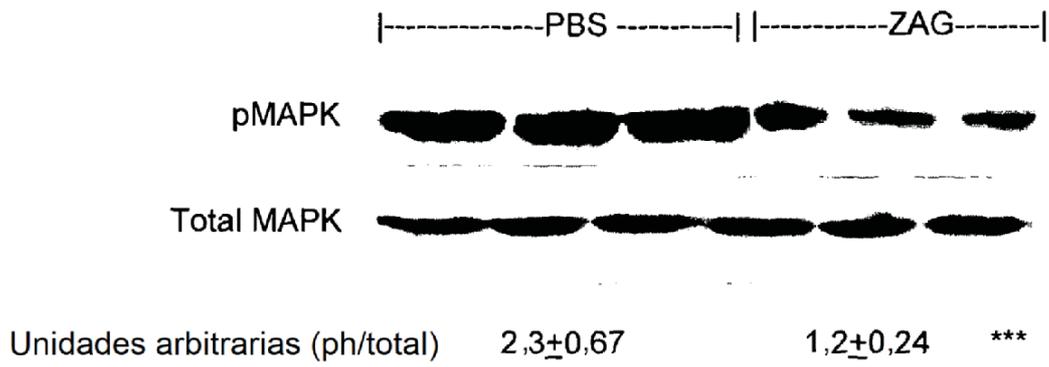


FIG. 4D

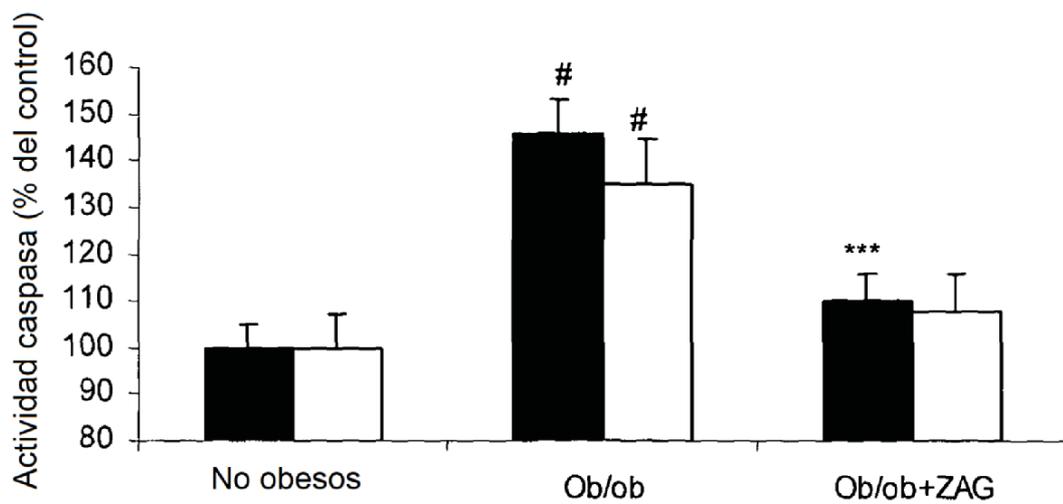


FIG. 4E

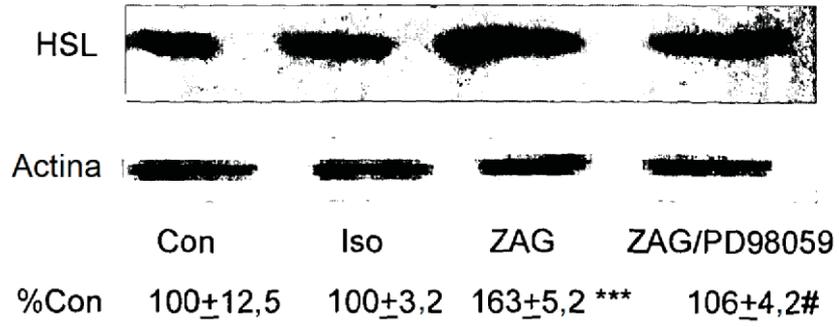


FIG. 5A

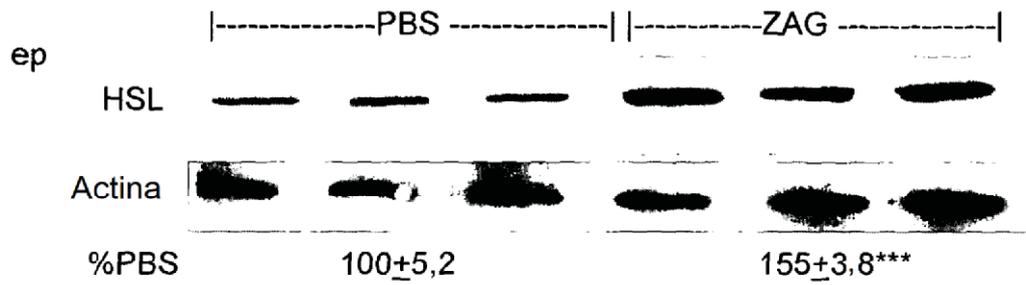


FIG. 5B

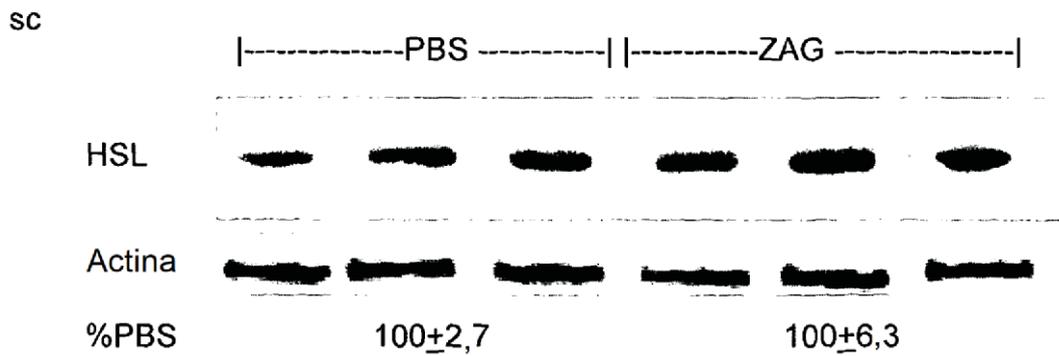


FIG. 5C

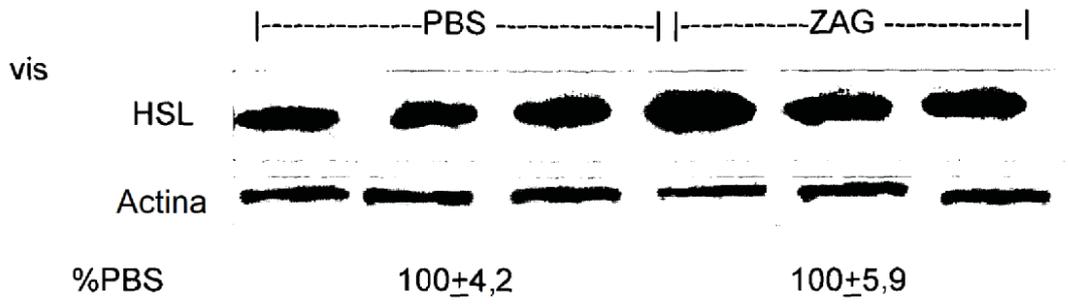


FIG. 5D

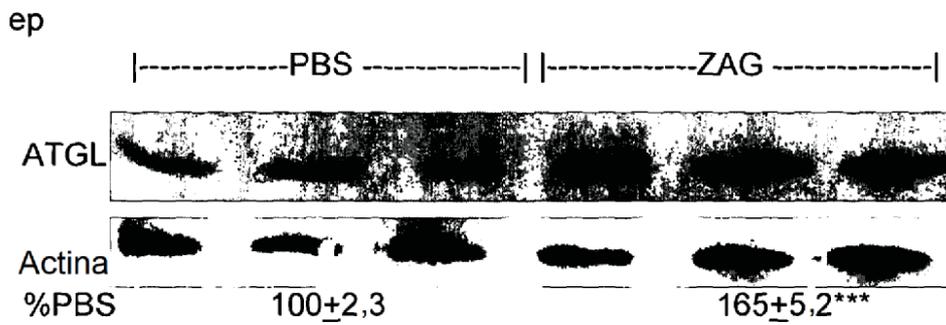


FIG. 5E

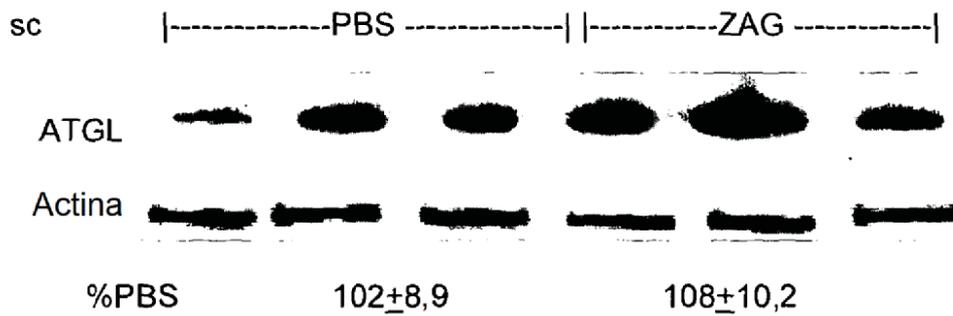


FIG. 5F

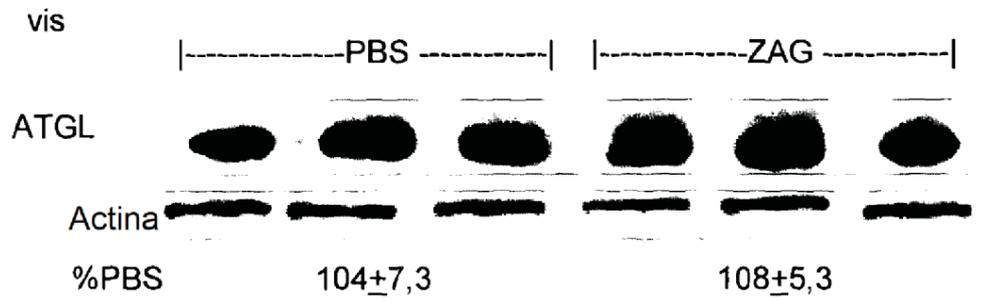


FIG. 5G

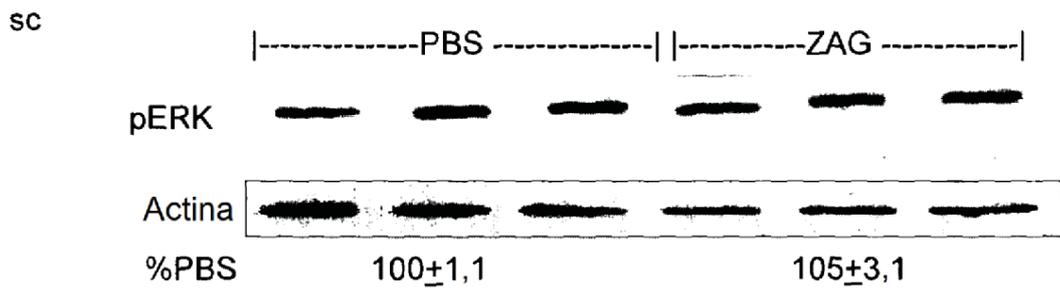
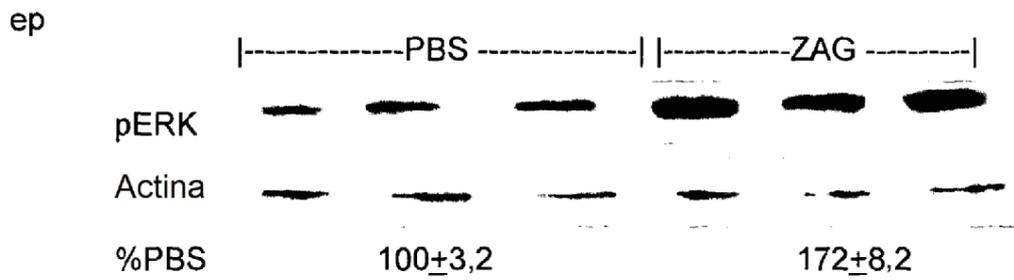


FIG. 5I

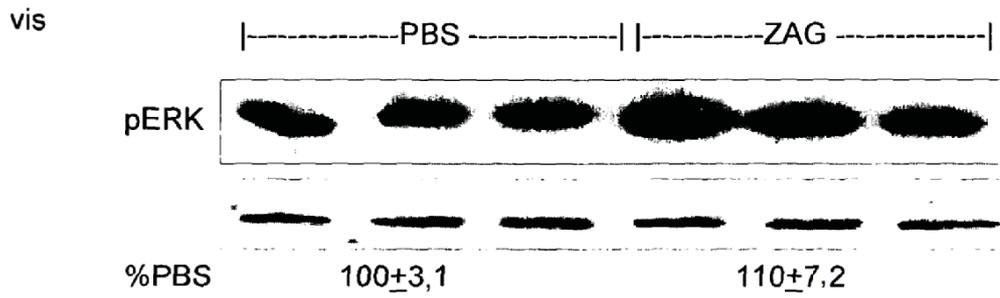


FIG. 5J

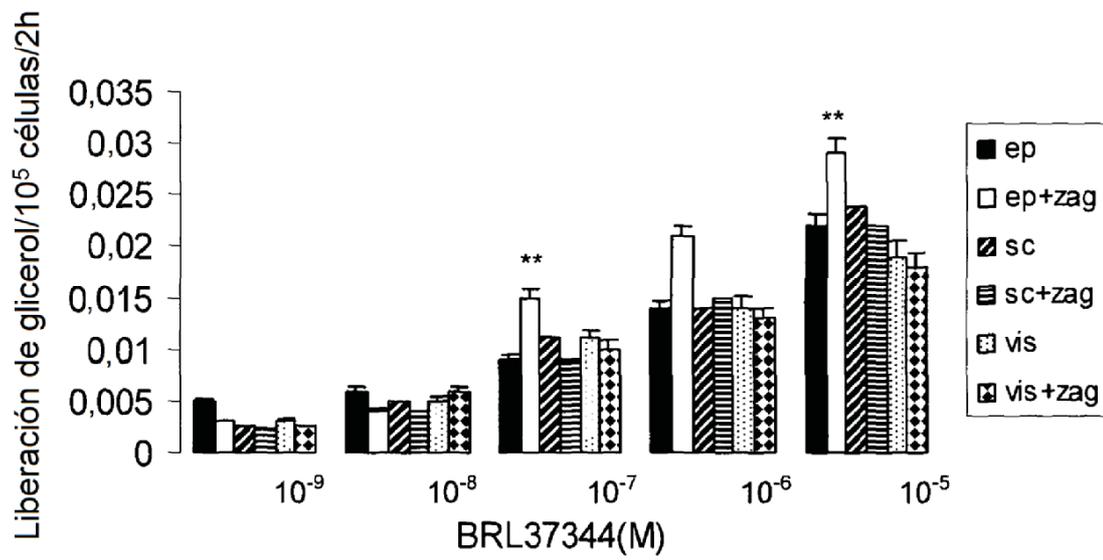


FIG. 5K

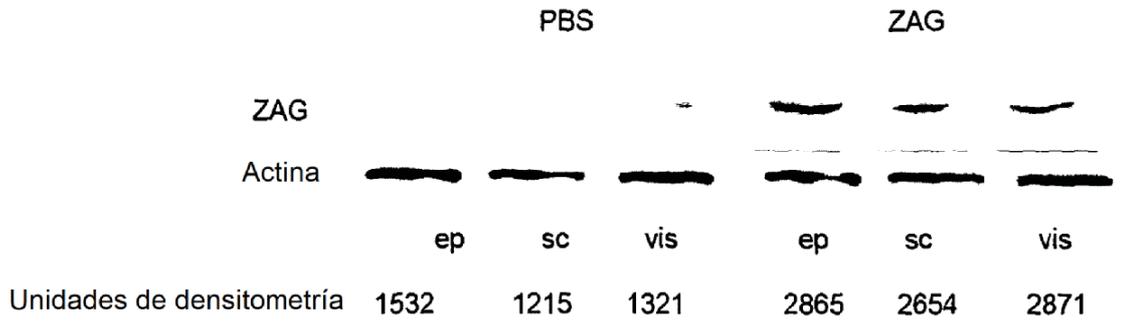


FIG. 6A

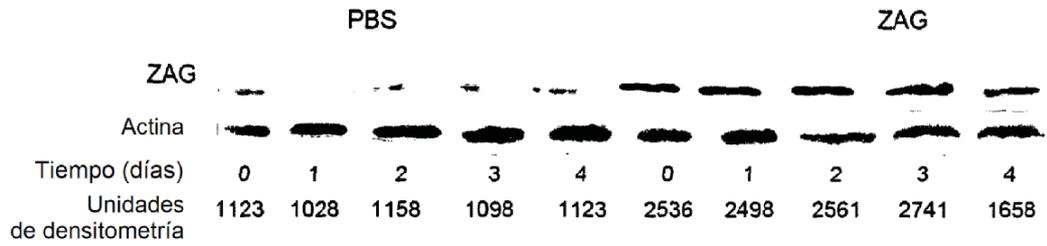
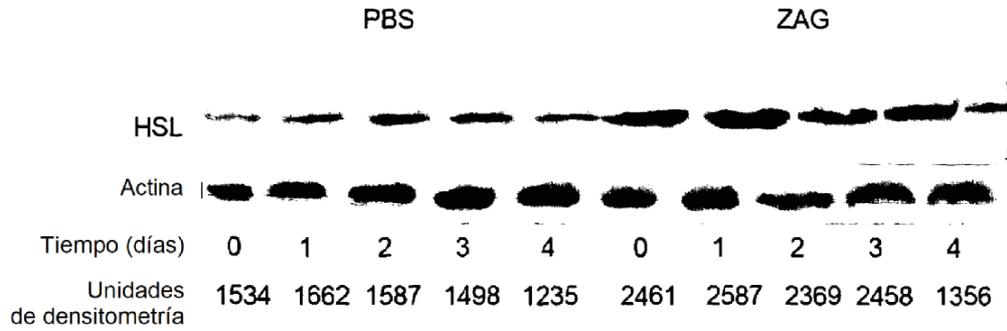


FIG. 6B



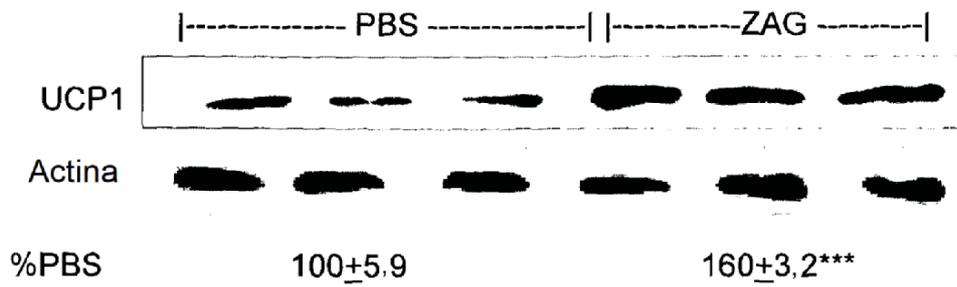


FIG. 6D

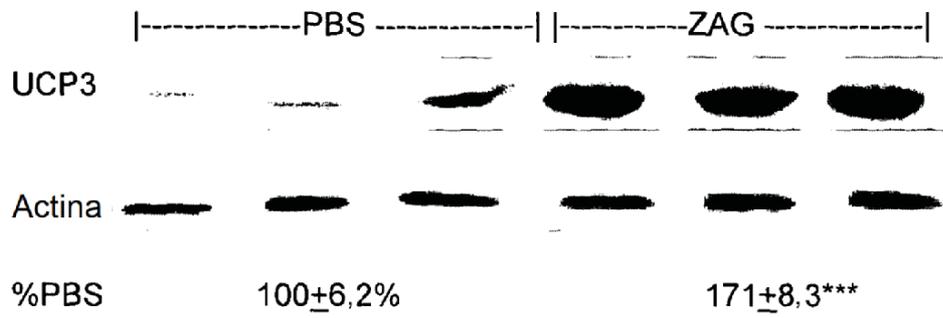


FIG. 6E

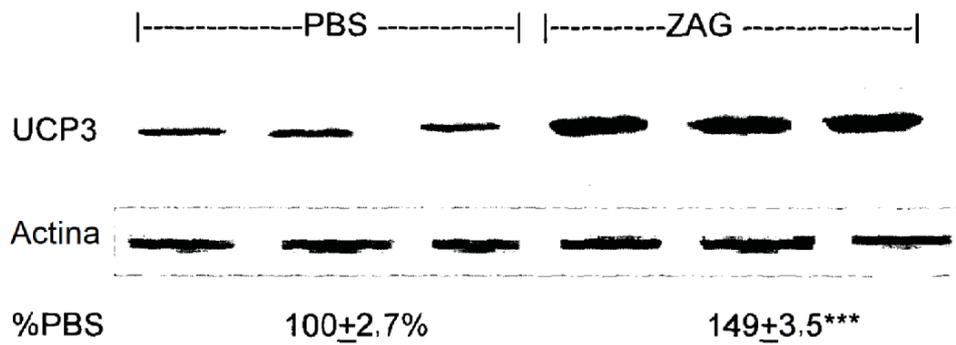


FIG. 6F

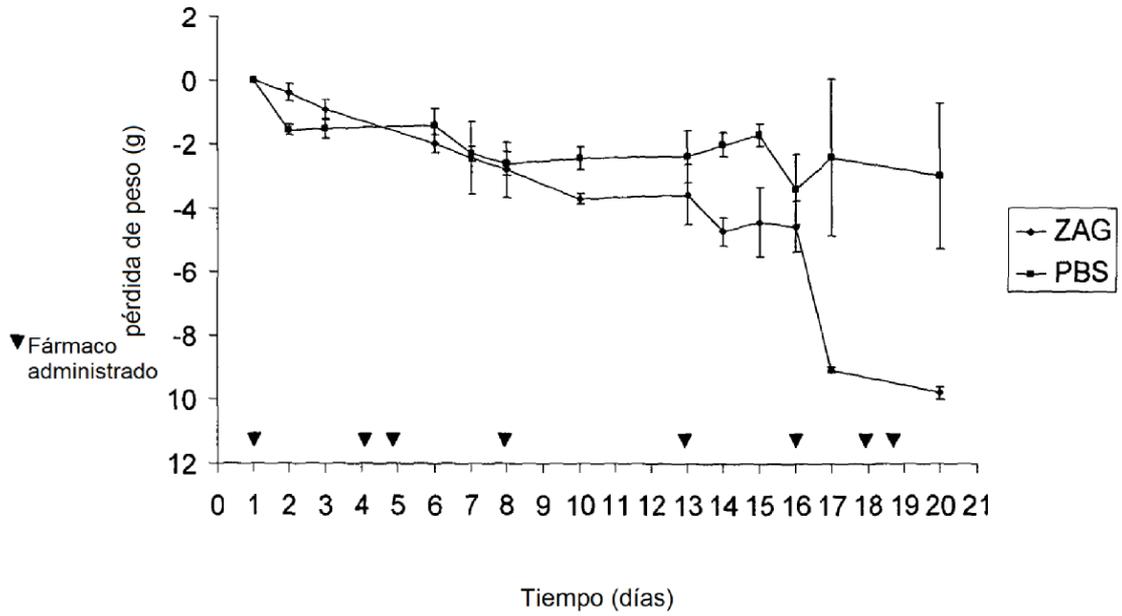


FIG. 7A

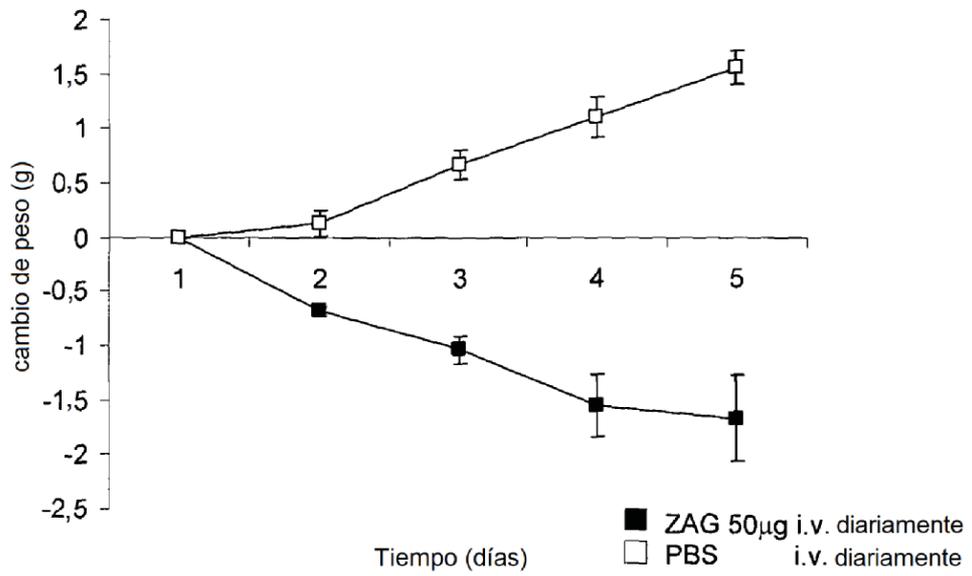


FIG. 7B

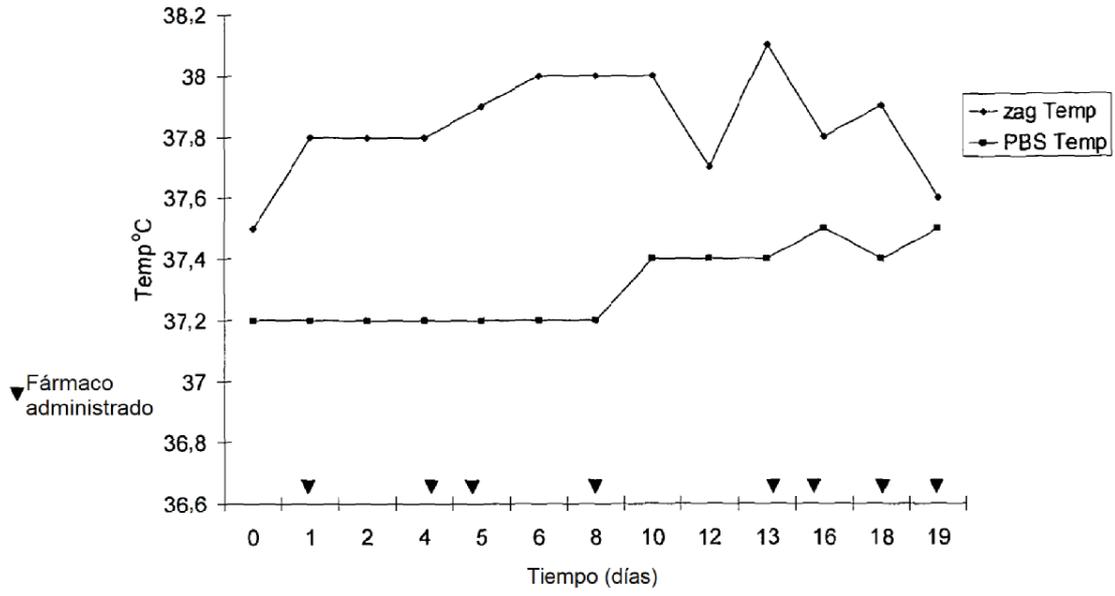


FIG. 7C

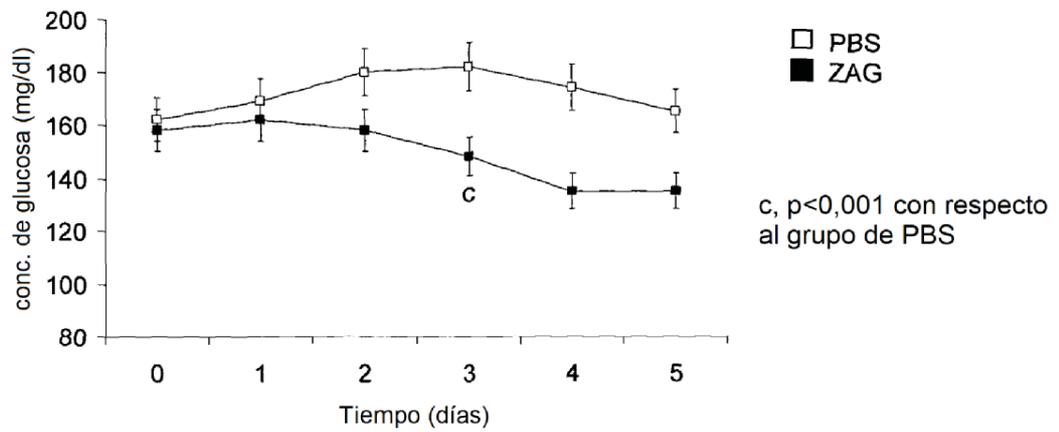


FIG. 8A

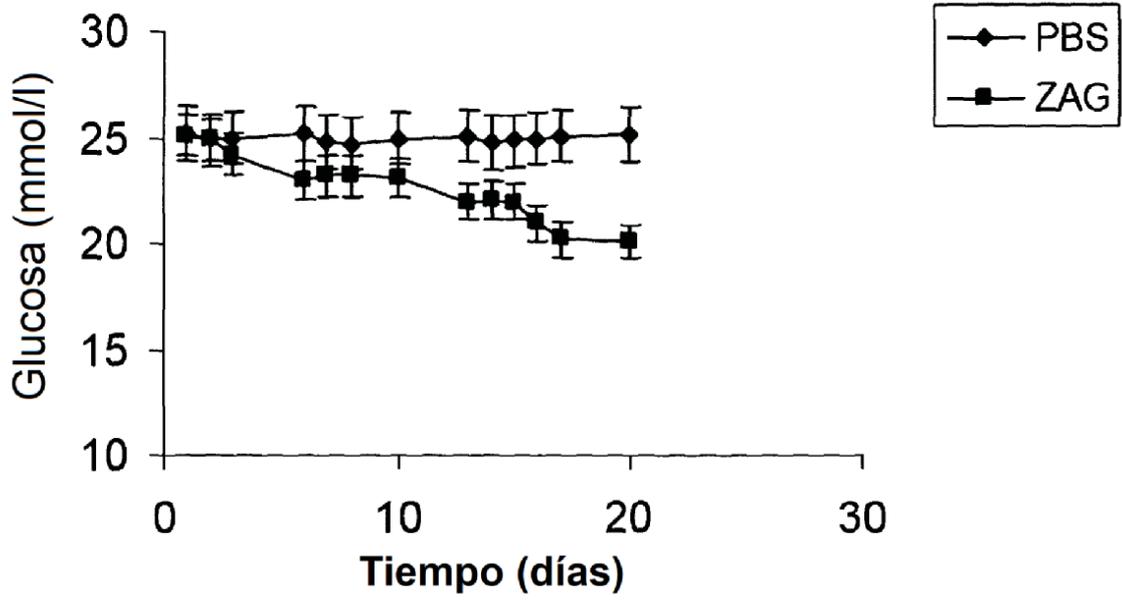


FIG. 8B

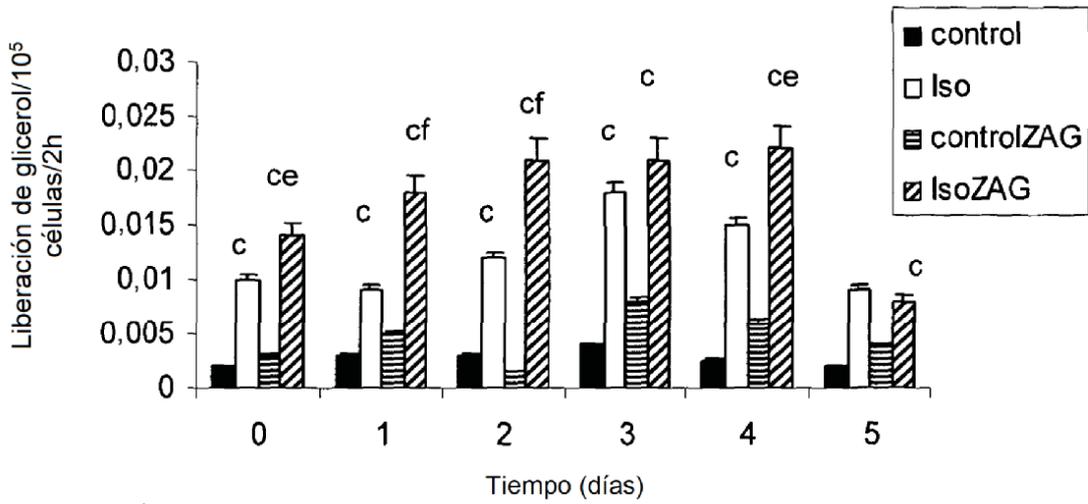
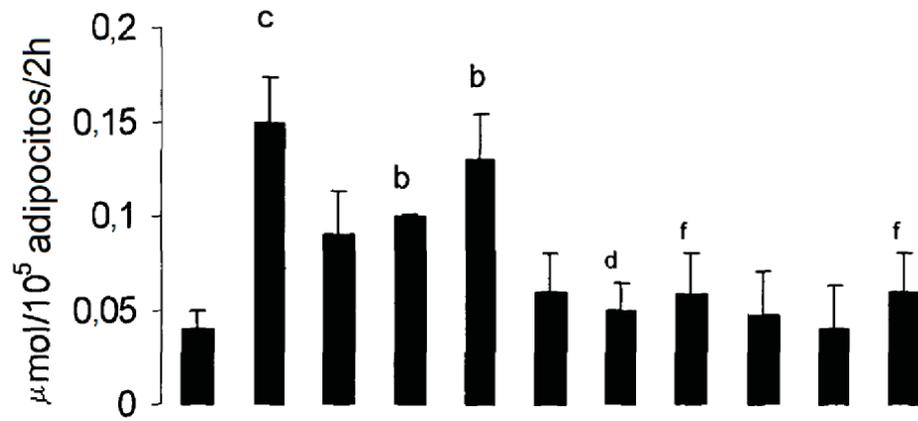


FIG. 9

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

FIG. 10



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

FIG. 11

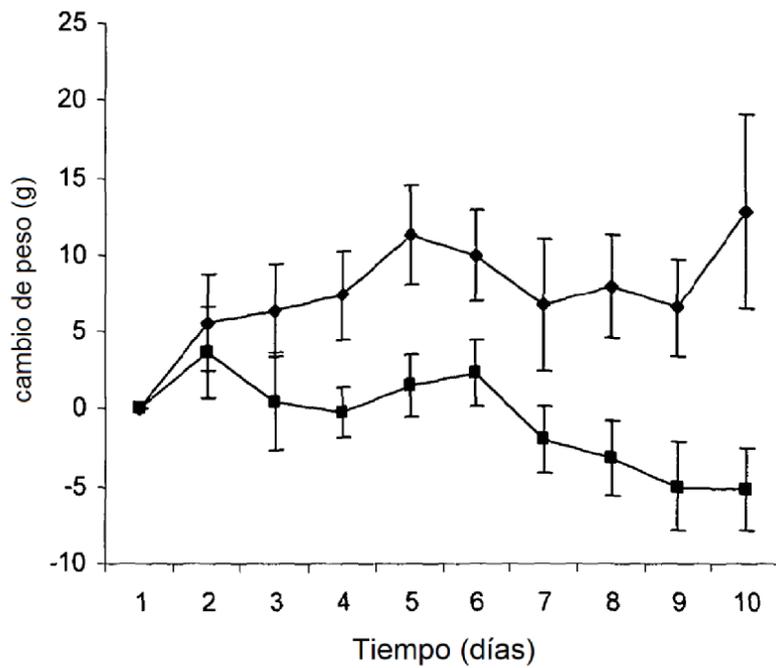


FIG. 12A

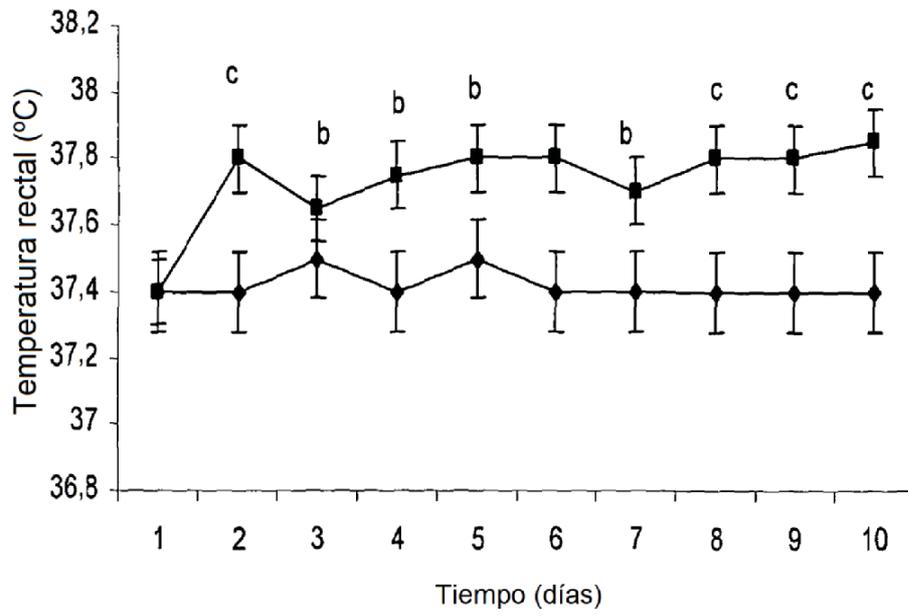


FIG. 12B

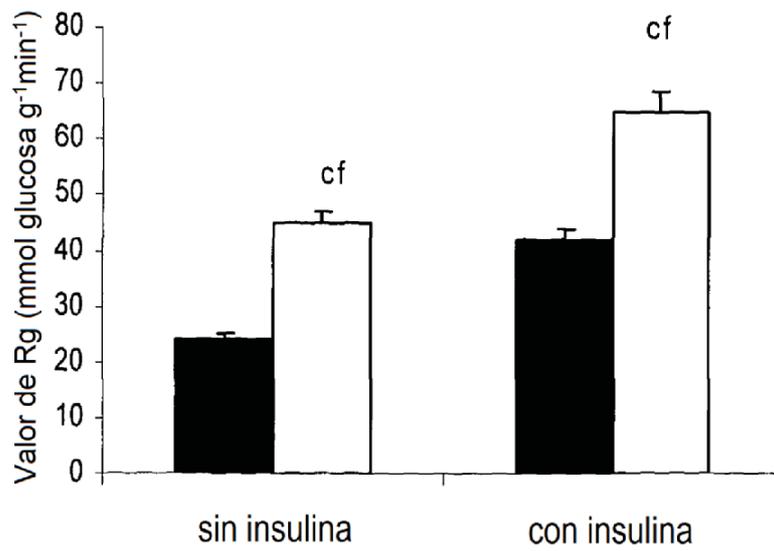


FIG. 12C

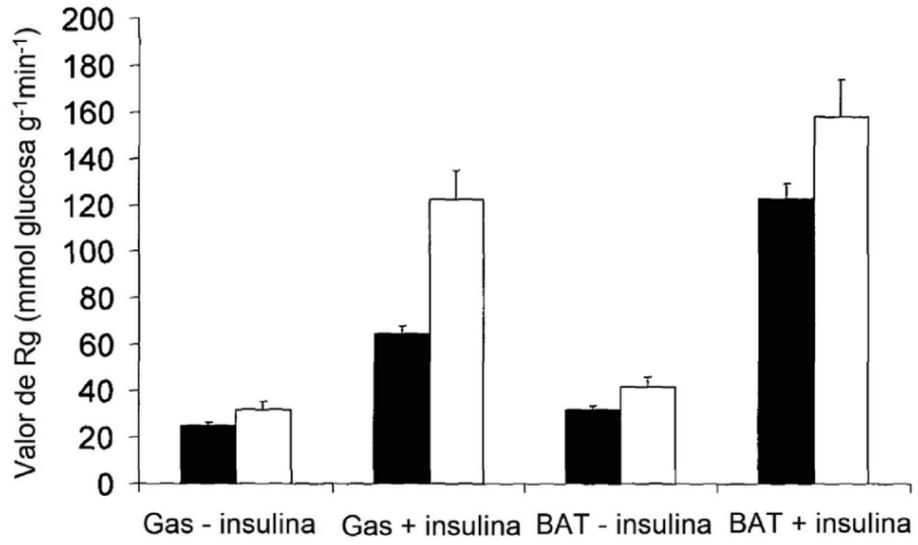


FIG. 12D

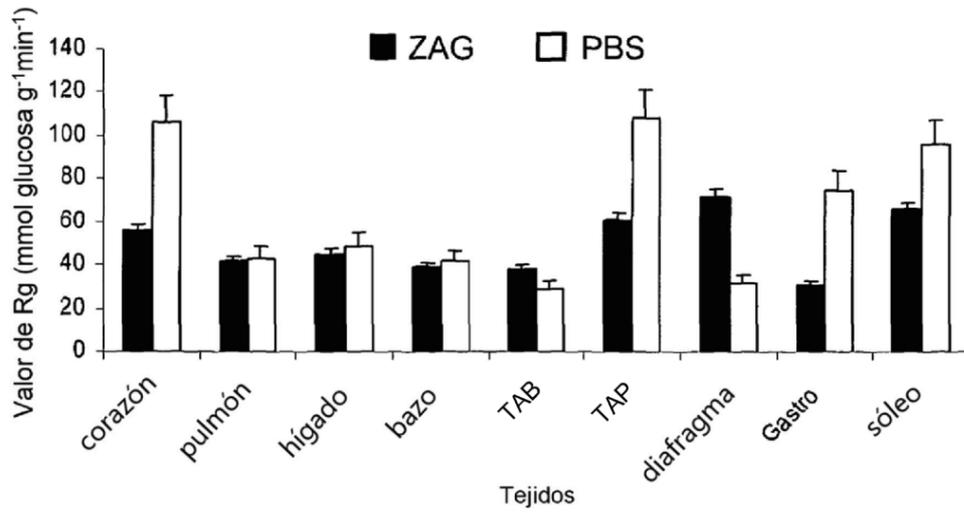


FIG. 12E

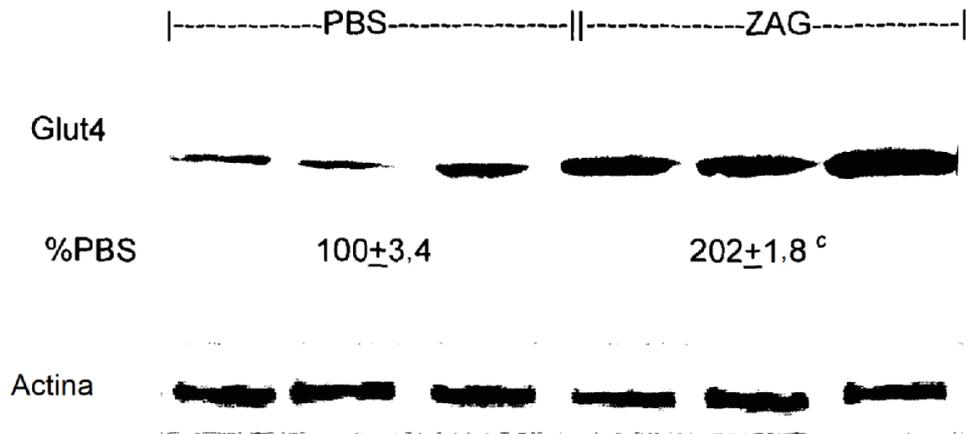


FIG. 13A

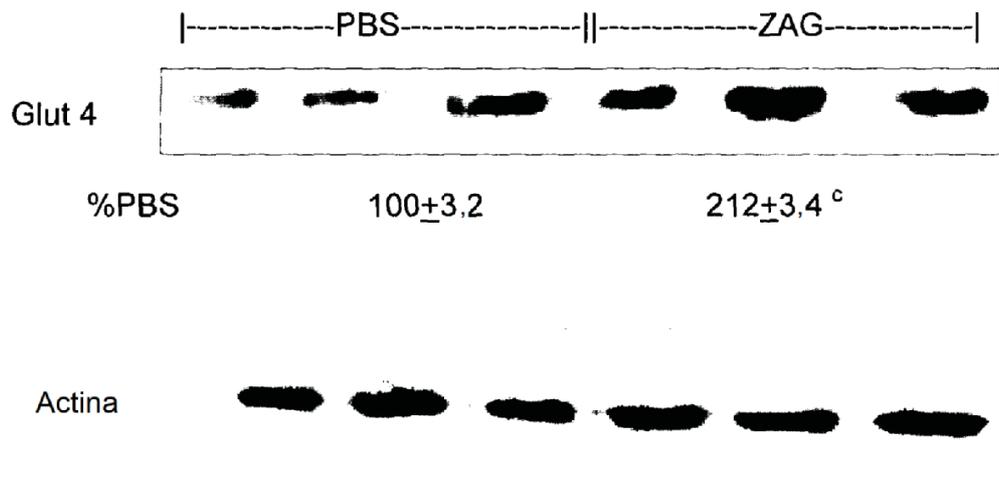


FIG. 13B

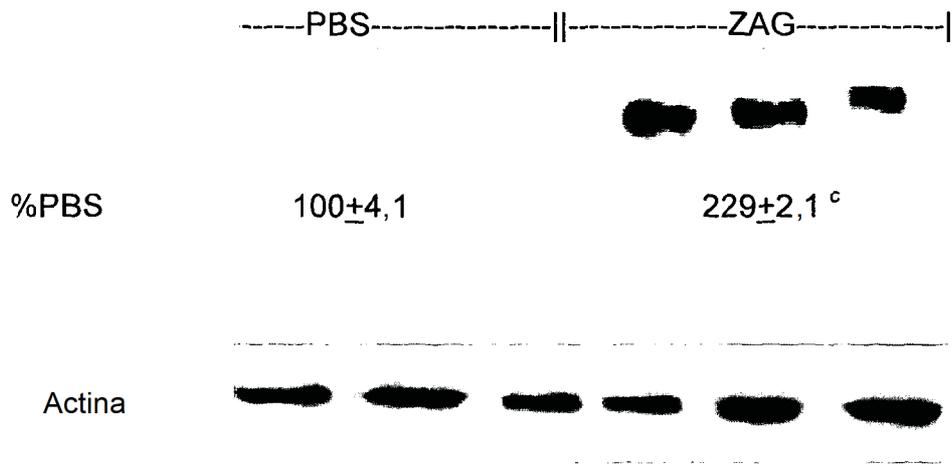


FIG. 13C

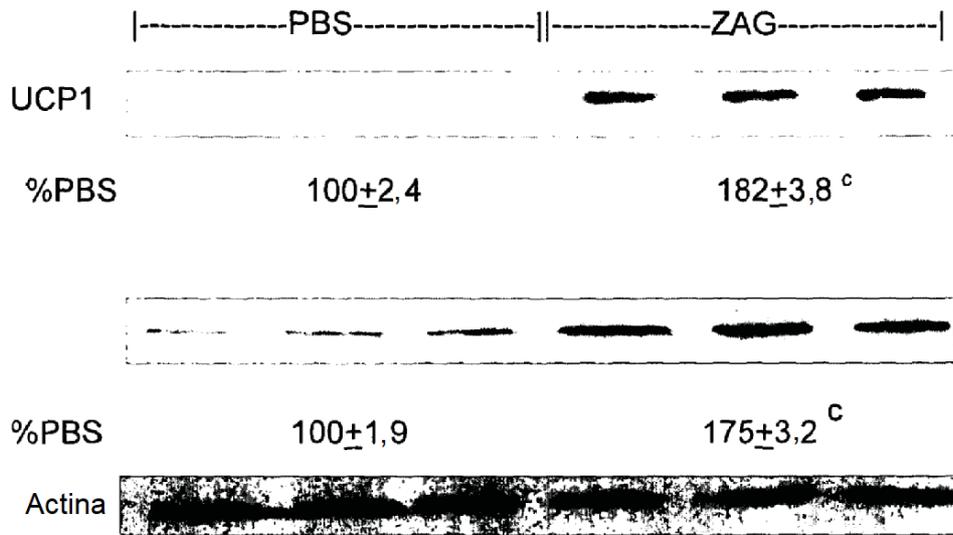


FIG. 14A

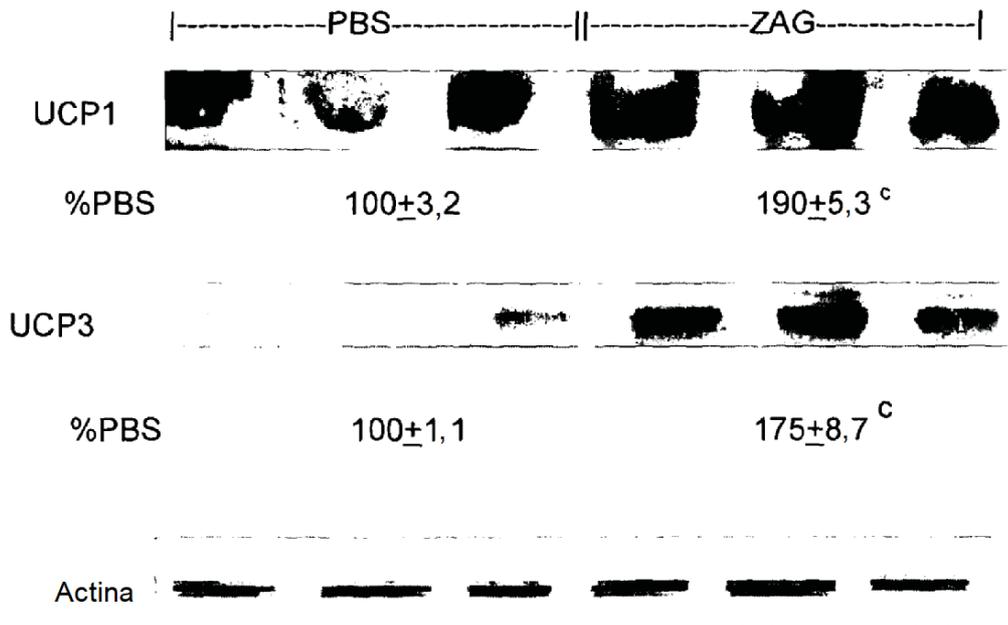


FIG. 14B

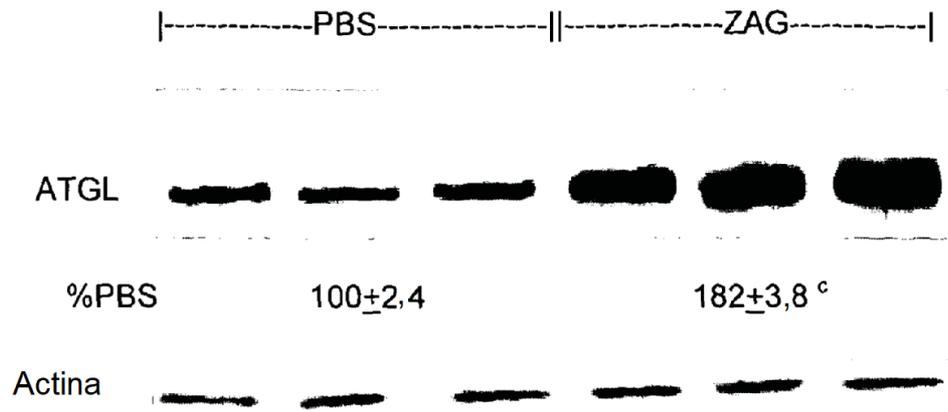


FIG. 15A

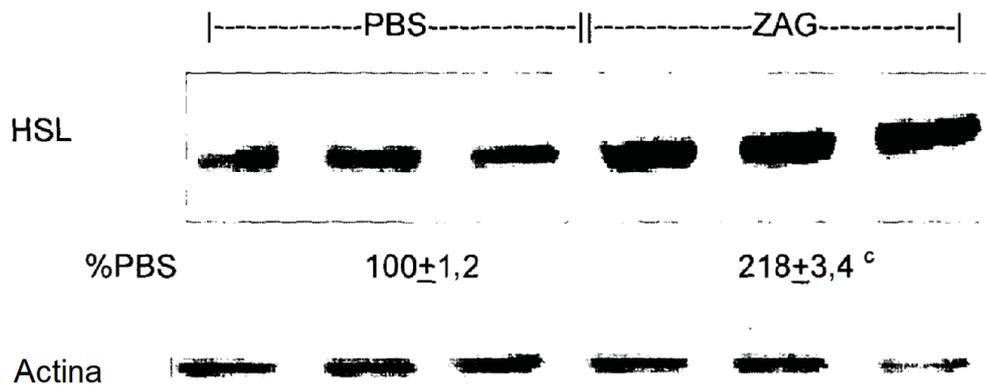


FIG. 15B

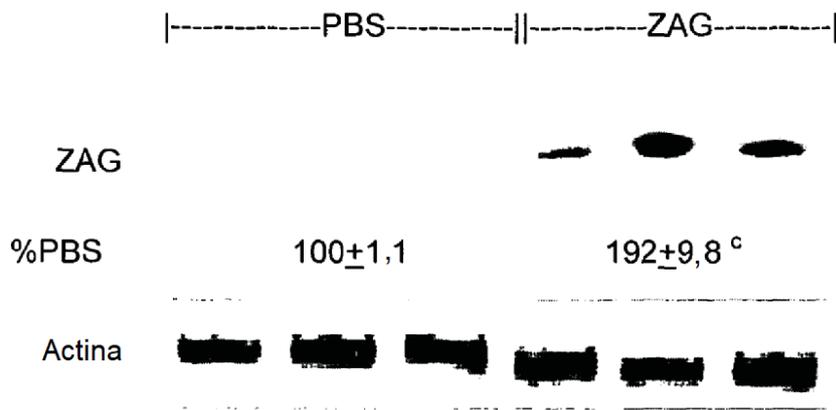


FIG. 16A

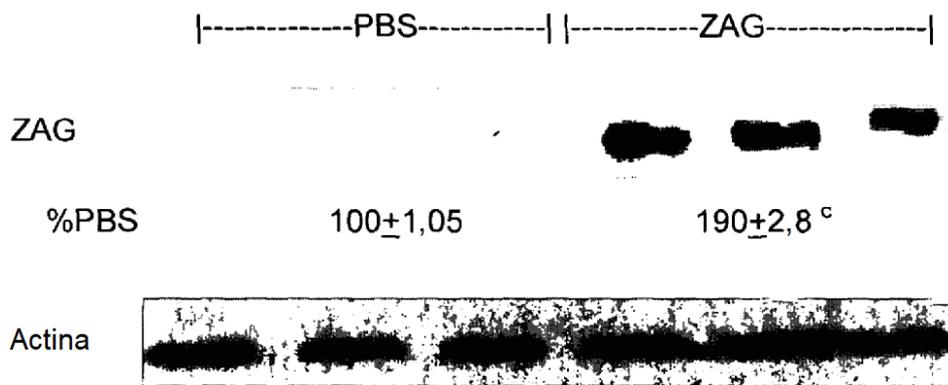


FIG. 16B

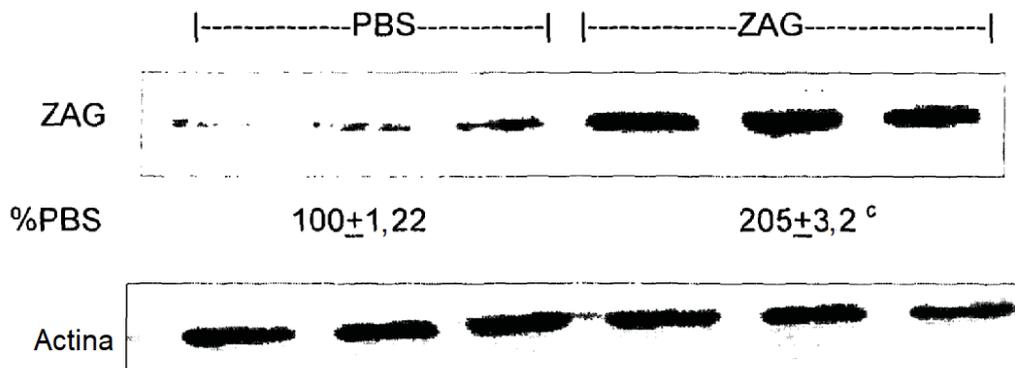


FIG. 16C

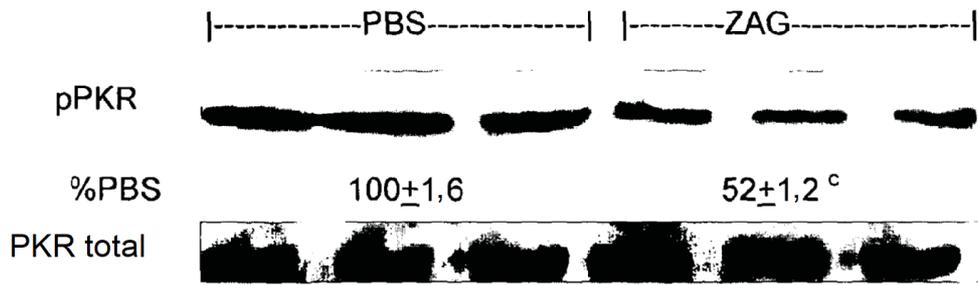


FIG. 17A

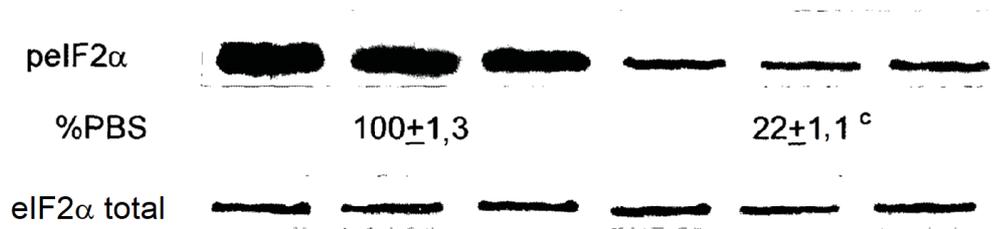


FIG. 17B

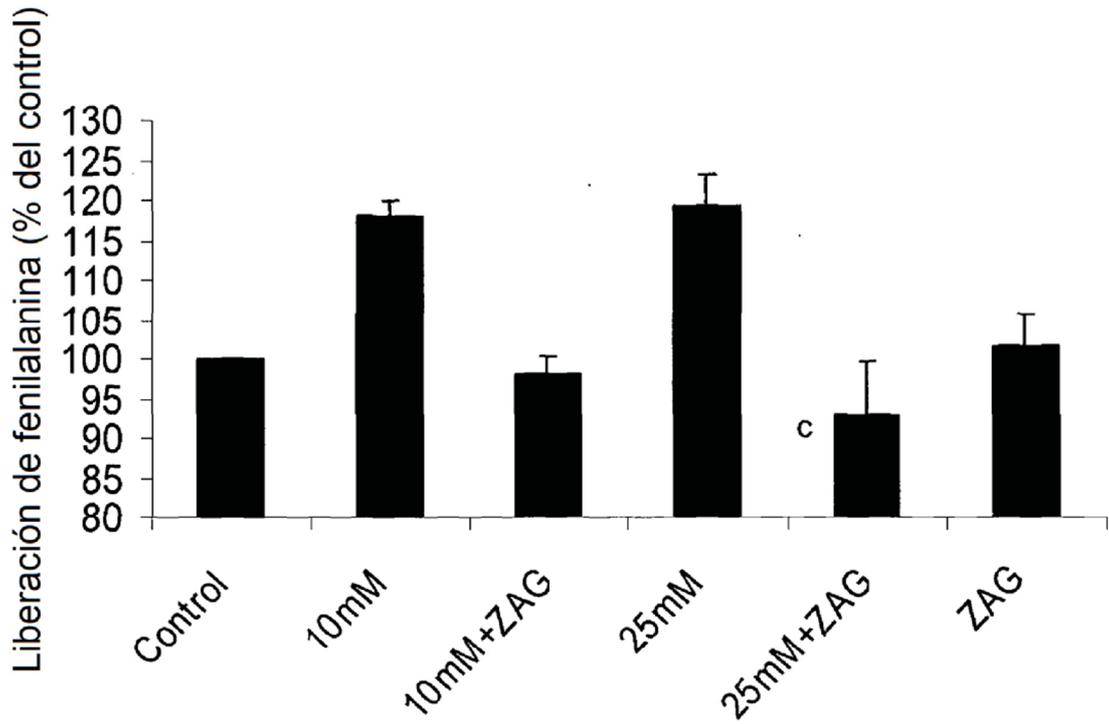


FIG. 18A

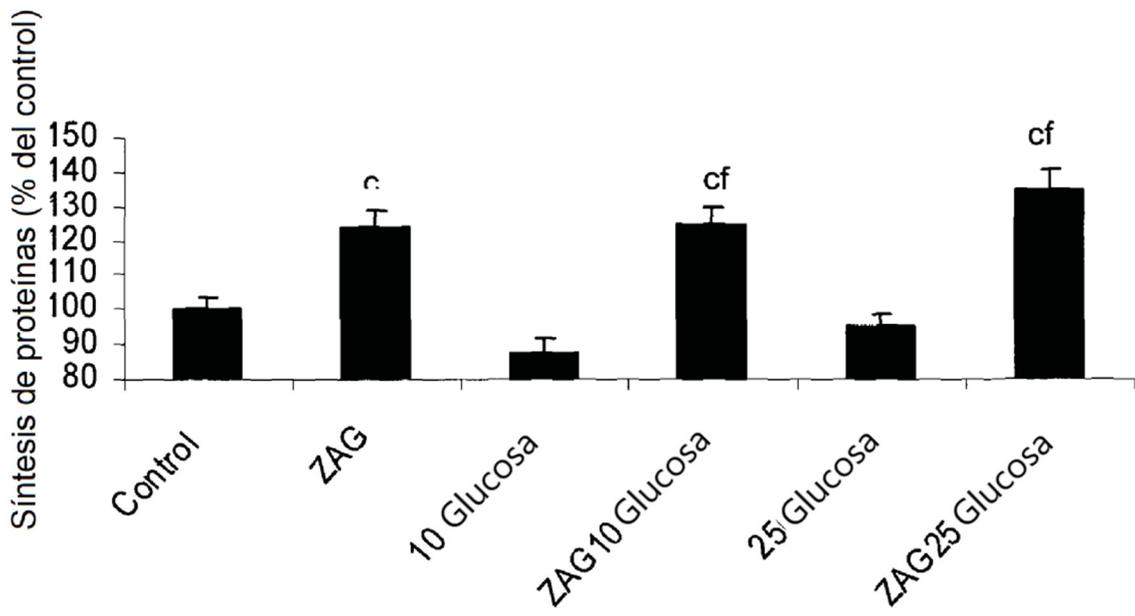


FIG. 18B

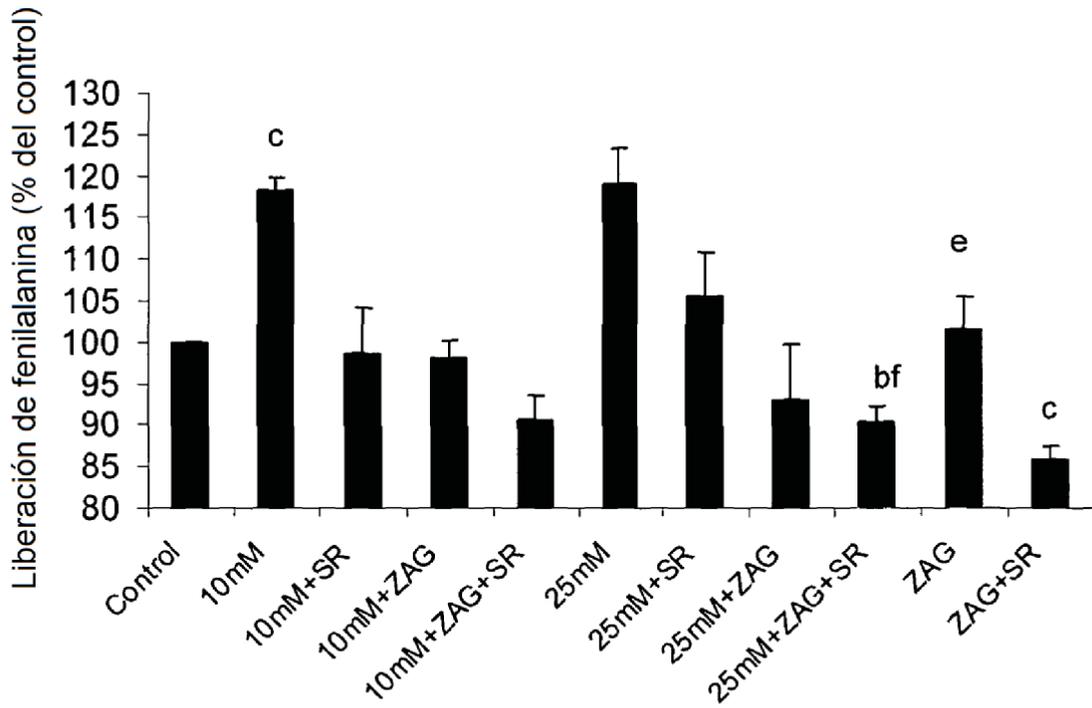


FIG. 19

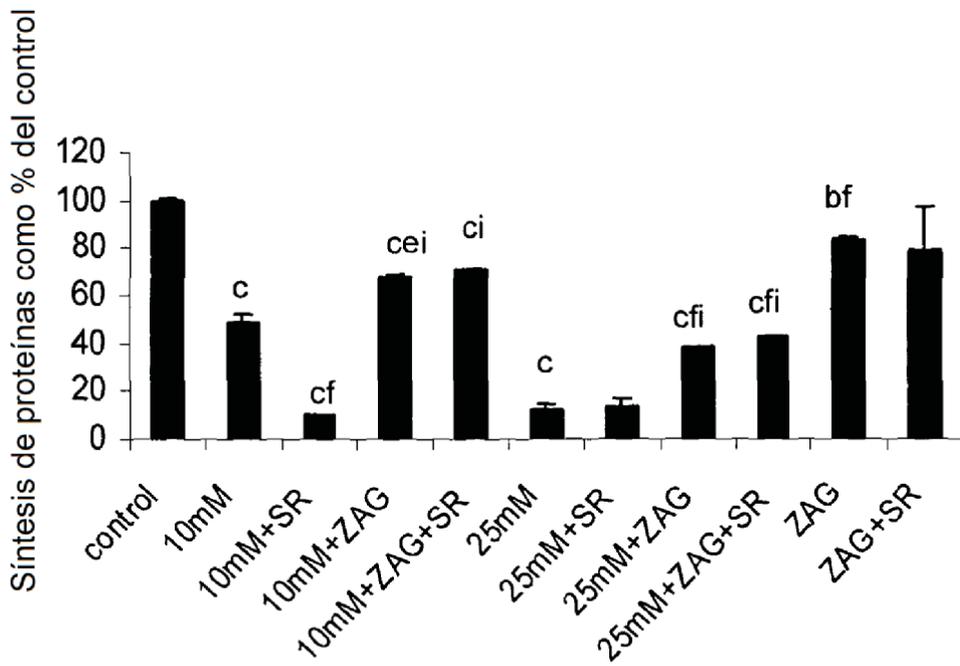


FIG. 20

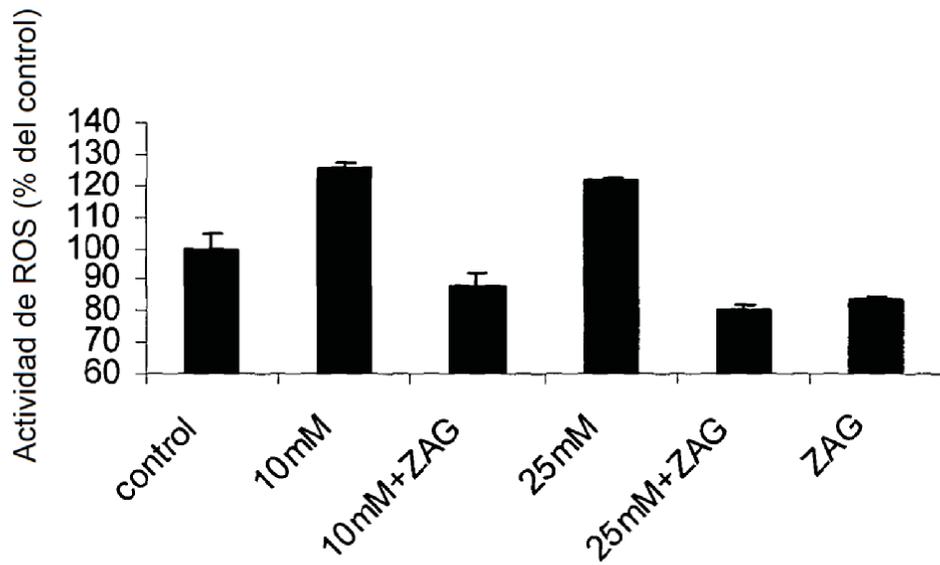


FIG. 21

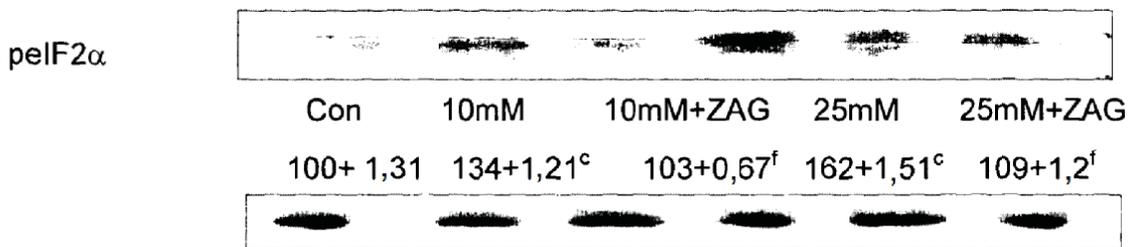
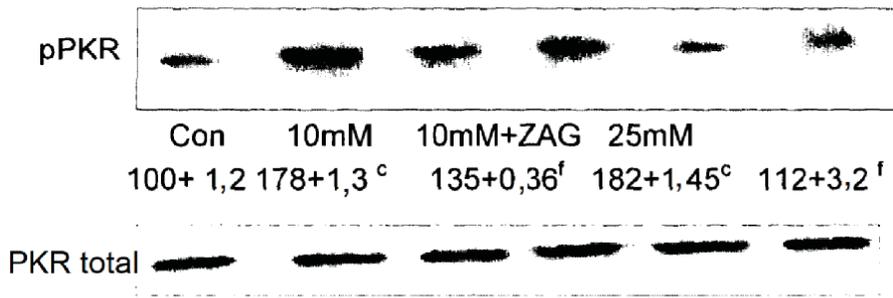


FIG. 22B

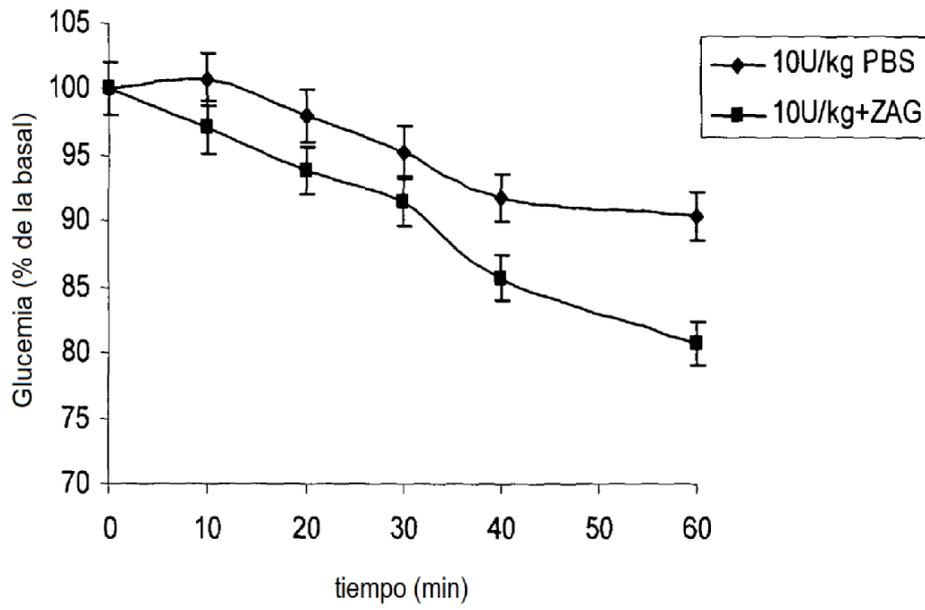


FIG. 23A

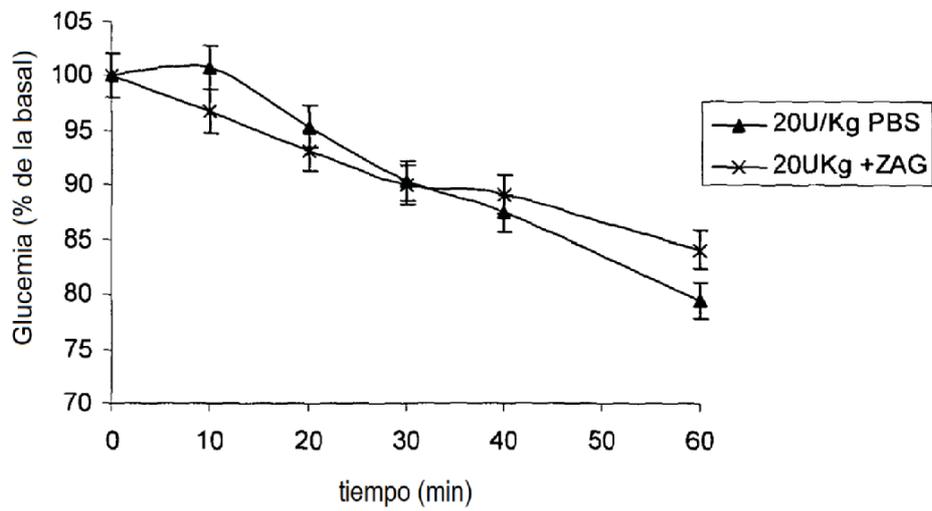


FIG. 23B

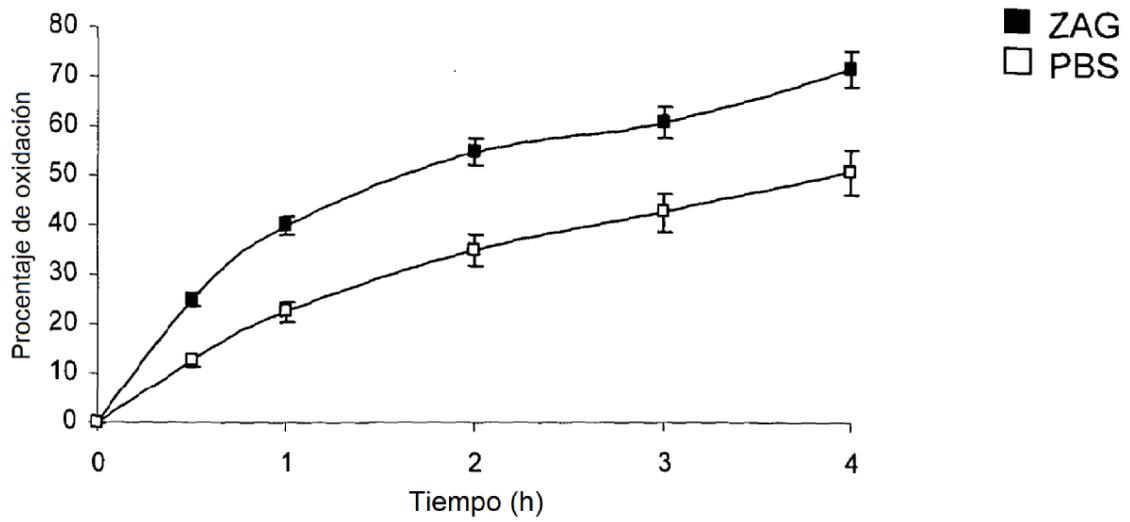


FIG. 24

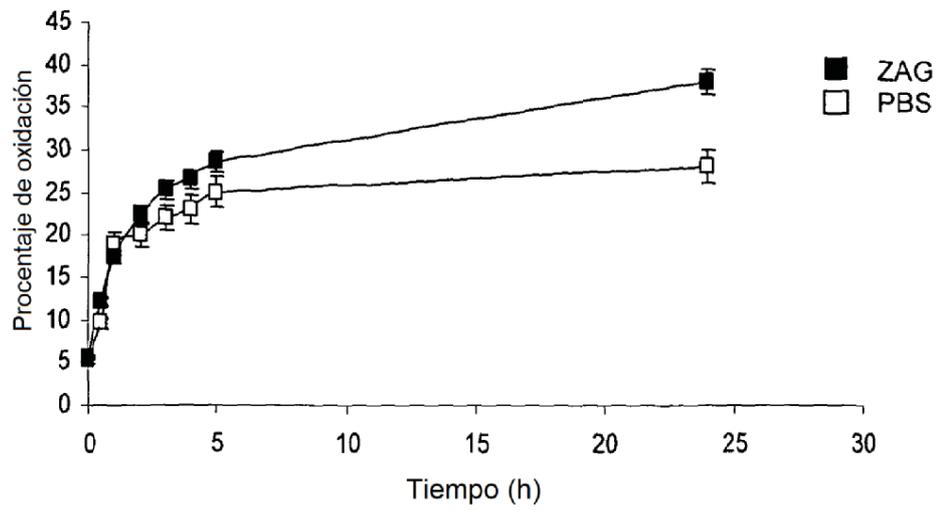


FIG. 25

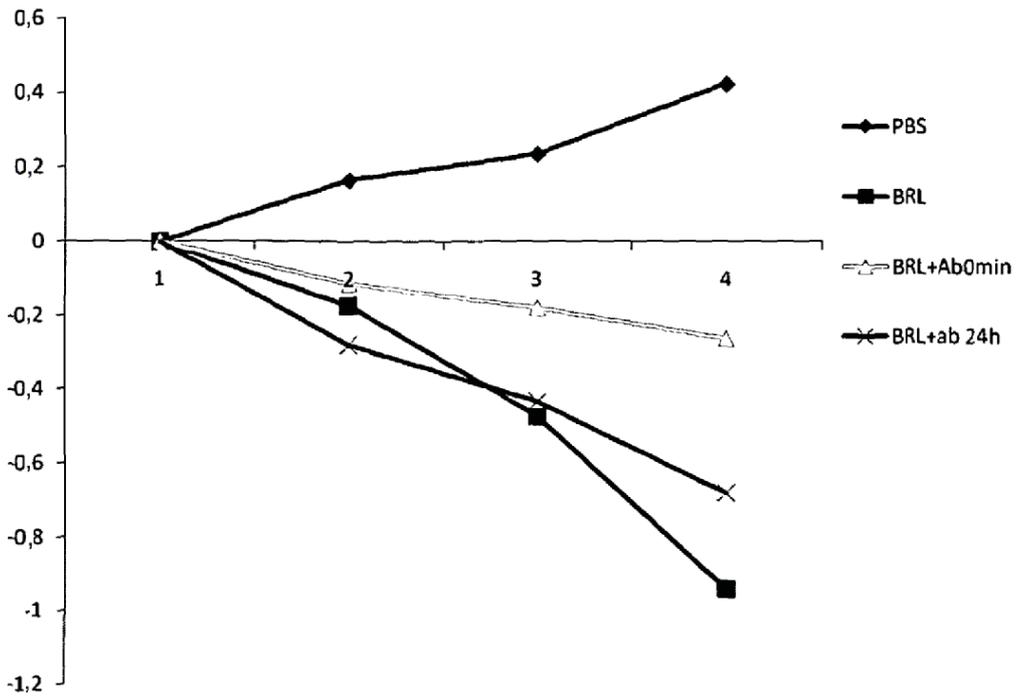
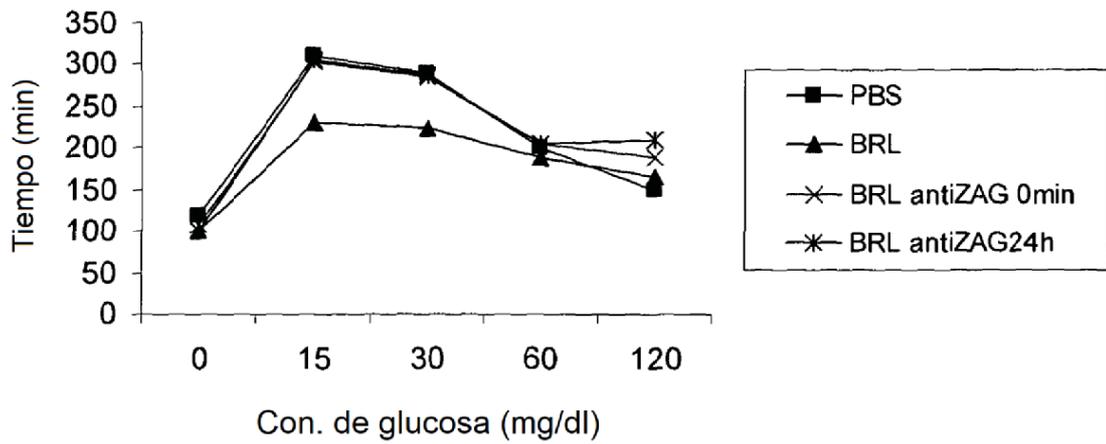


FIG. 26



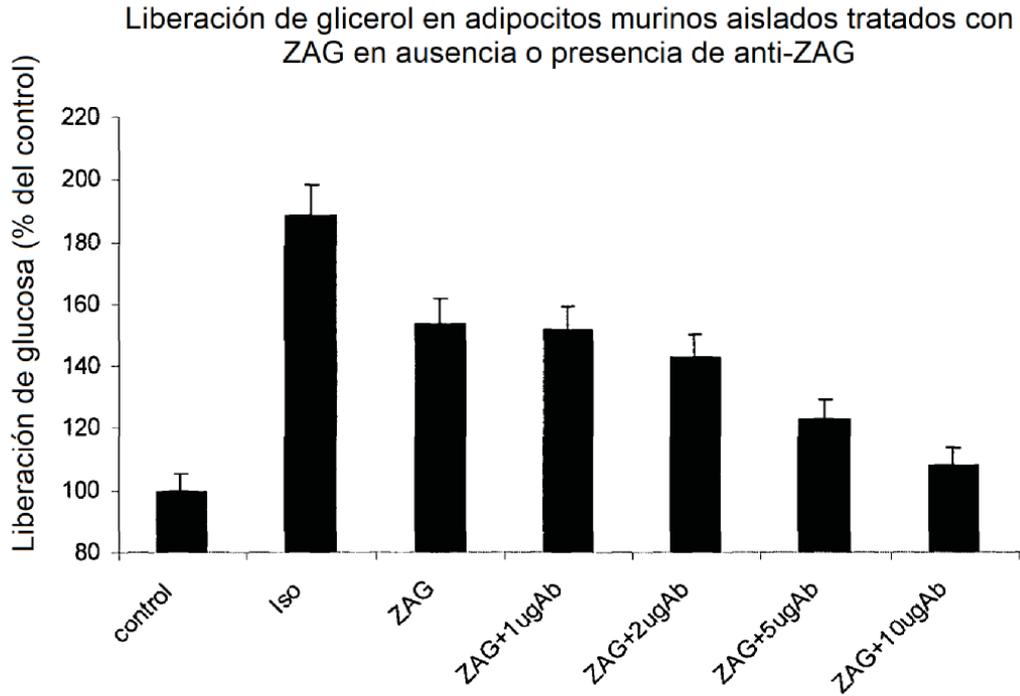


FIG. 28

Cambio de peso en ratones ob/ob tratados con BRL en ausencia o presencia de anti-ZAG donde se añadió BRL 24 h antes al ab o al mismo tiempo

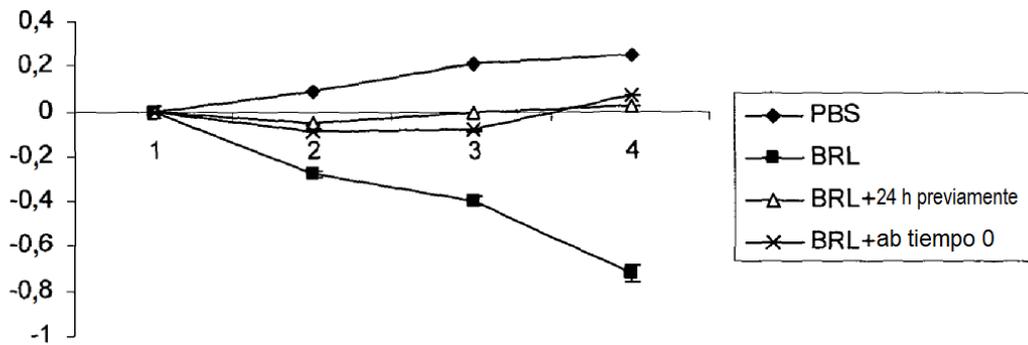


FIG. 29

La síntesis de proteínas neta en músculo esquelético está regulada positivamente

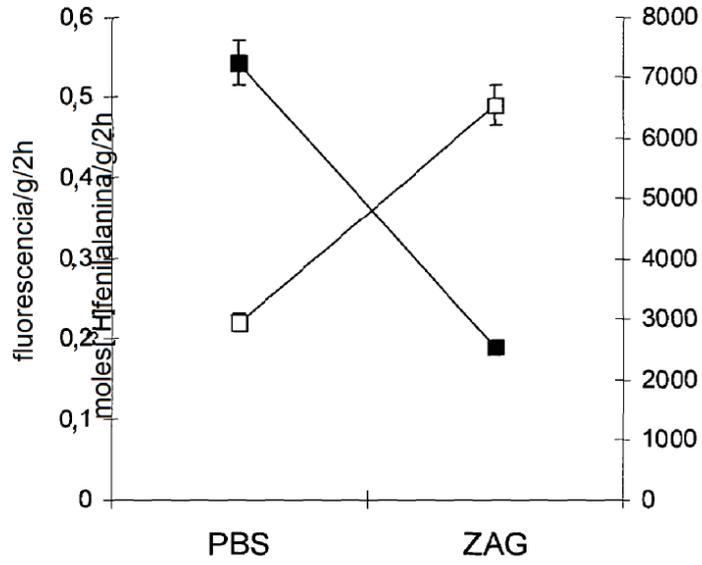


FIG. 30

Pérdida de peso en ratones ob/ob tratados con y sin ZAG (50 ug po)

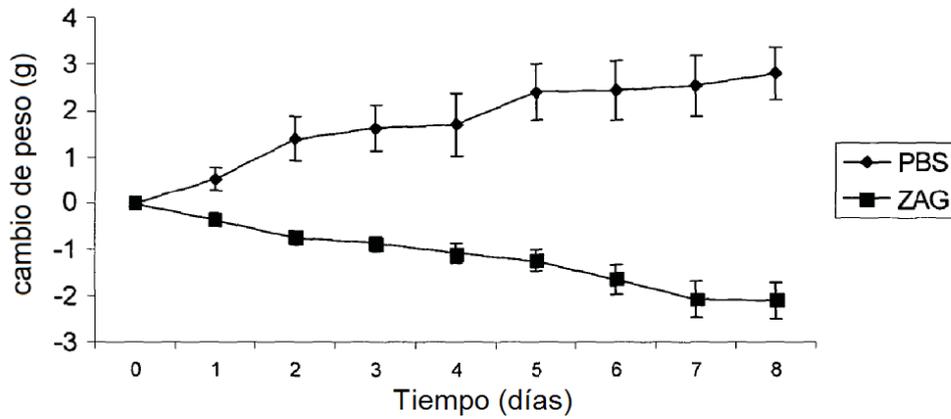


FIG. 31

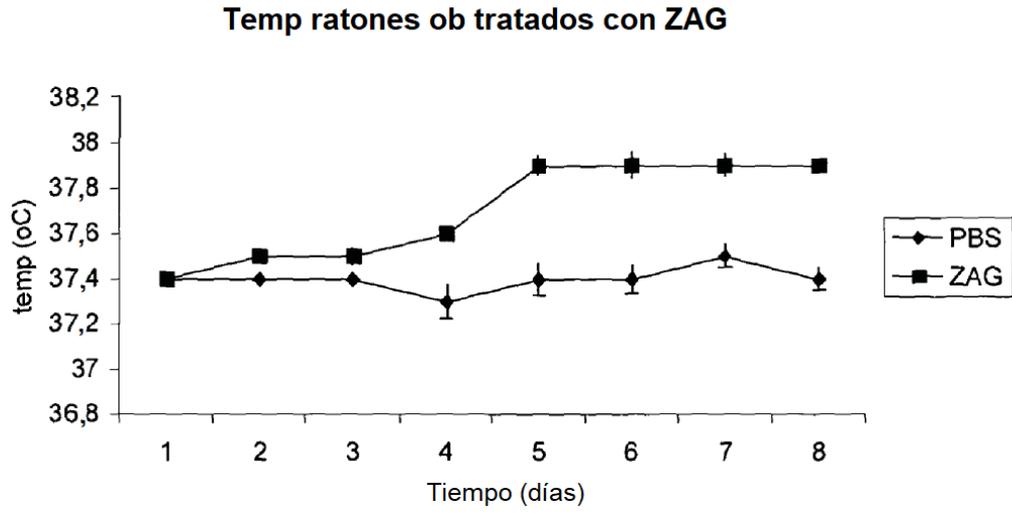


FIG. 32

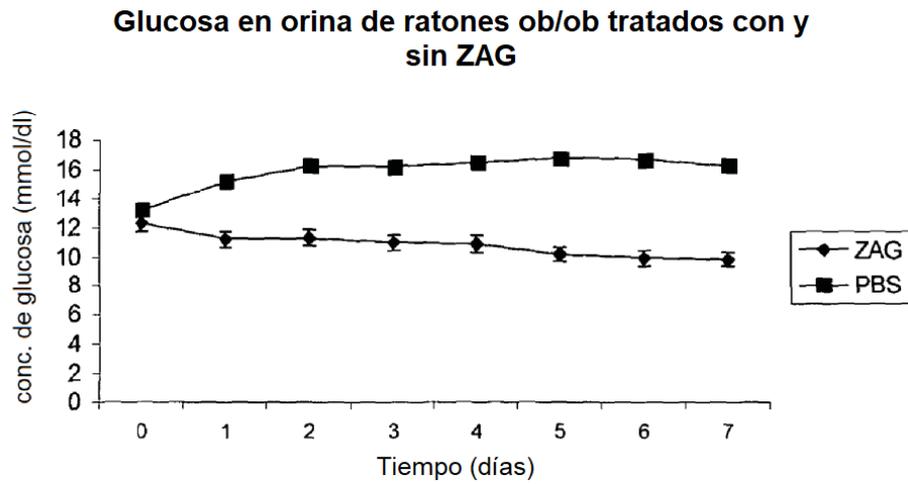


FIG. 33

Transferencia de Western de ZAG de ratón en muestras de plasma dosificadas p.o.



FIG. 34

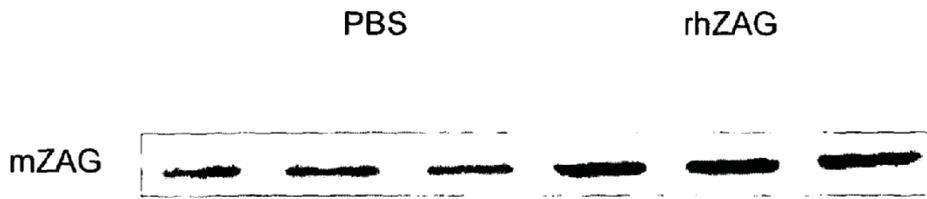


FIG. 35

Cambio de peso en ratones ob/ob tratados con y sin ZAG po (50 ug diariamente) en ausencia o presencia de propranolol

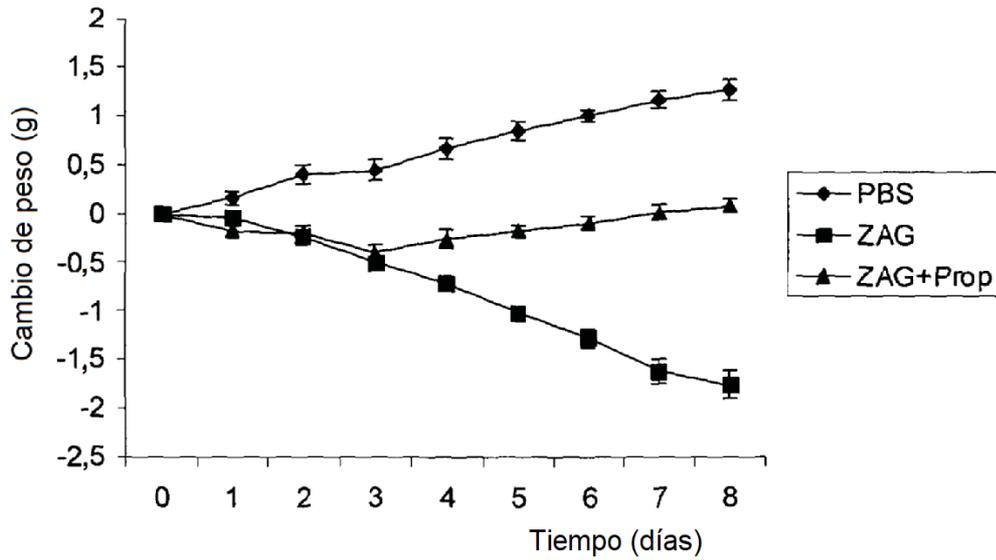


FIG. 36

Temperatura en ratones ob/ob tratados con ZAG po
(50 ug diariamente) con y sin propranolol

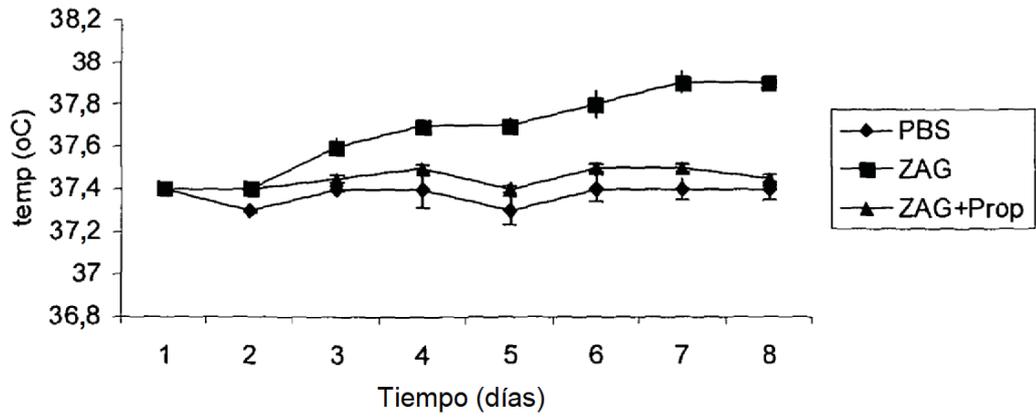


FIG. 37



FIG. 38



FIG. 39

Ensayo de tolerancia a la glucosa en ratones ob/ob tratados con y sin ZAG con y sin propranolol

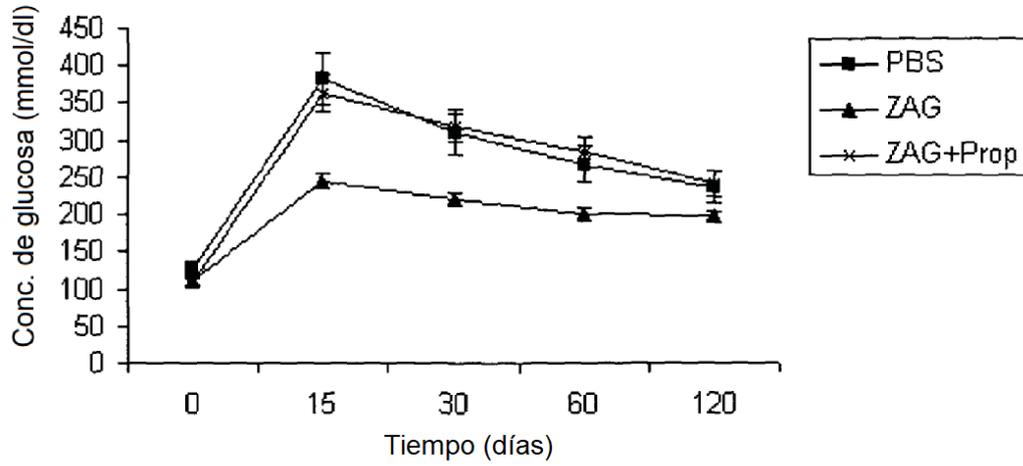


FIG. 40

Transferencia de western de ZAG de ratón en muestras de plasma dosificadas p.o.

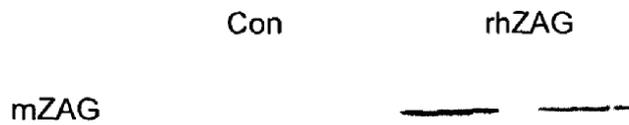


FIG. 41

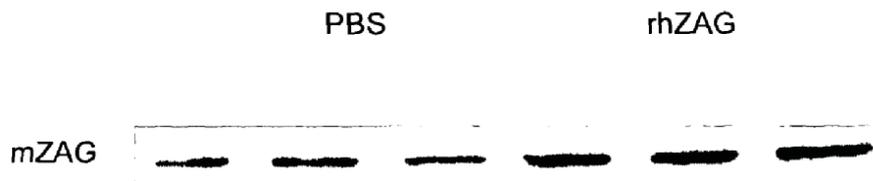


FIG. 42

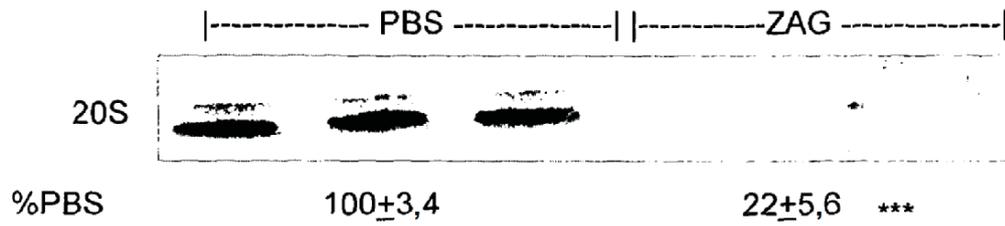


FIG. 43

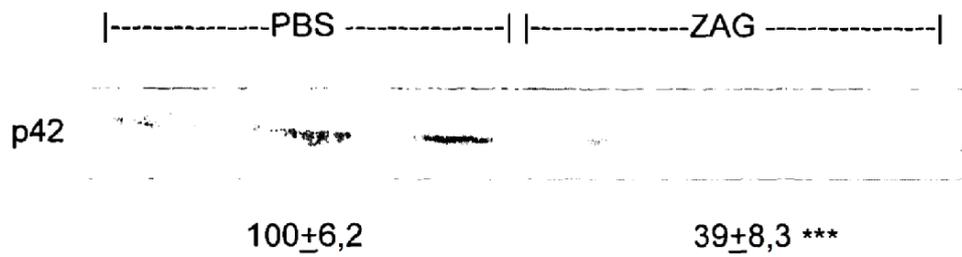


FIG. 44

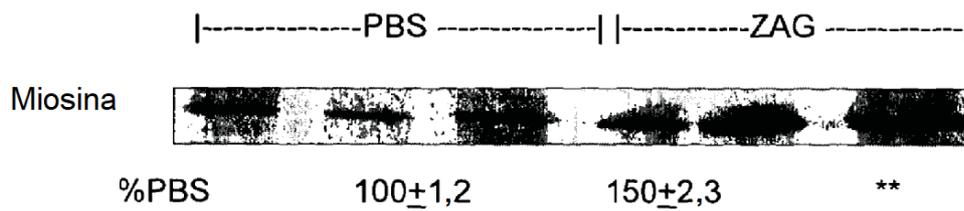


FIG. 45

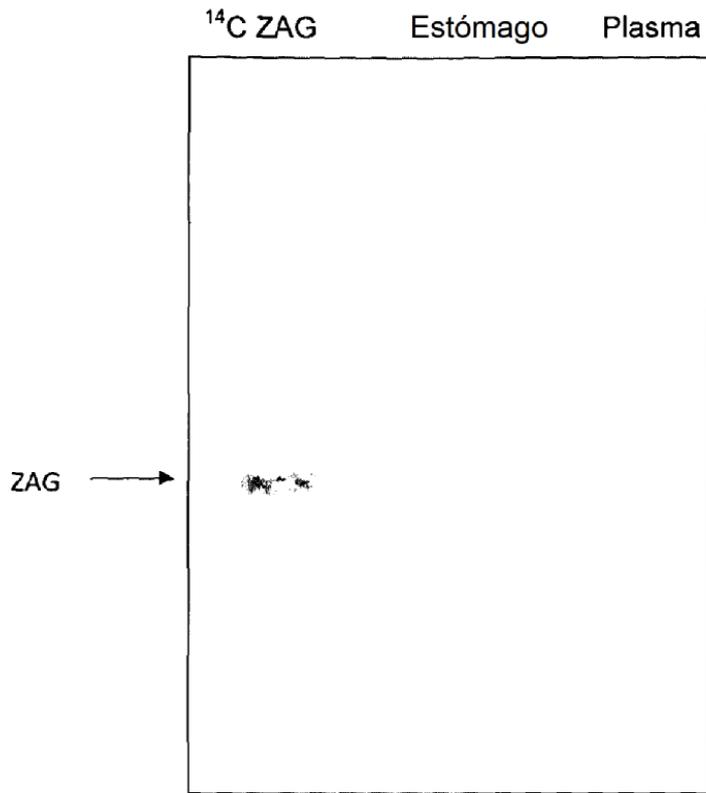


FIG. 46

Cambio de peso en ratones ob/ob tratados con y sin ZAG po 50 ug (p.o./sondaje gástrico)

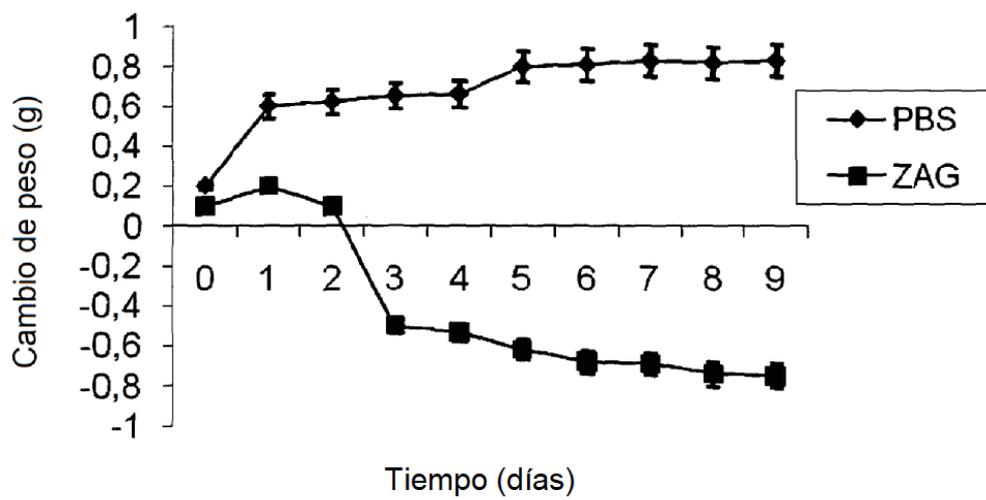


FIG. 47

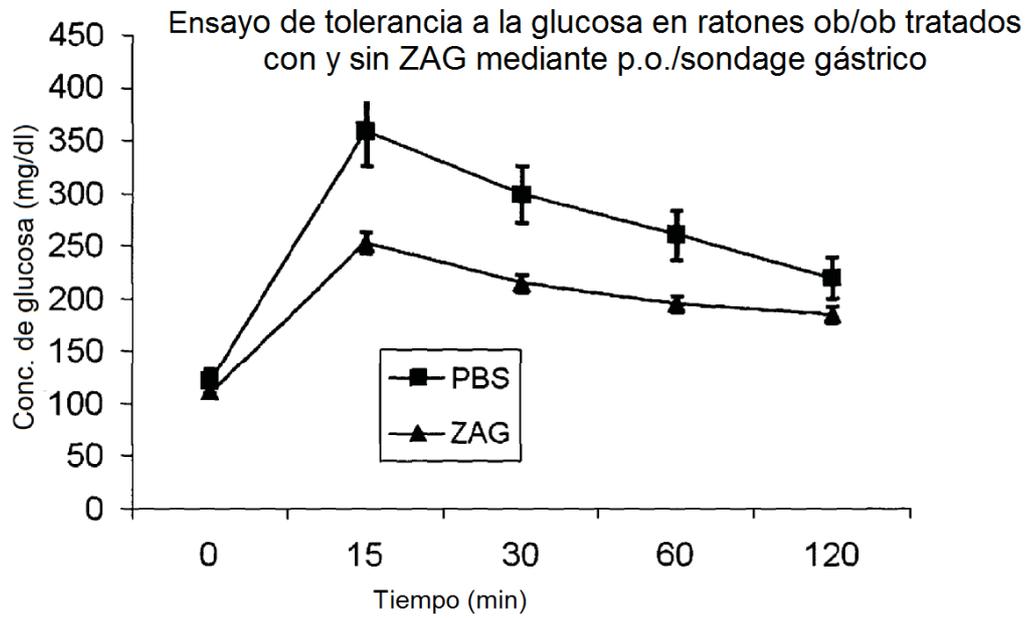


FIG. 48



FIG. 49

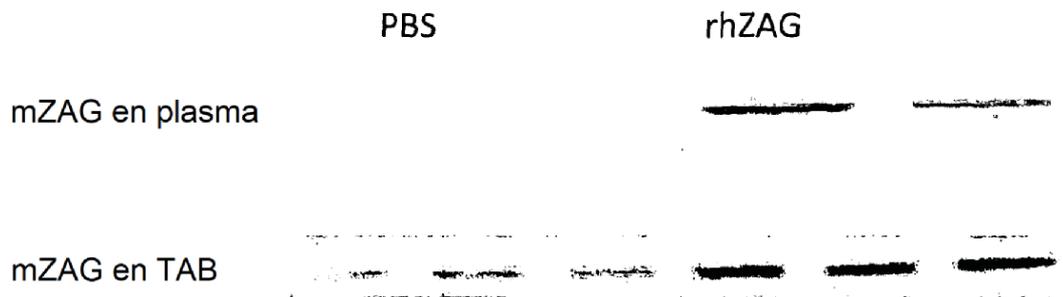


FIG. 50

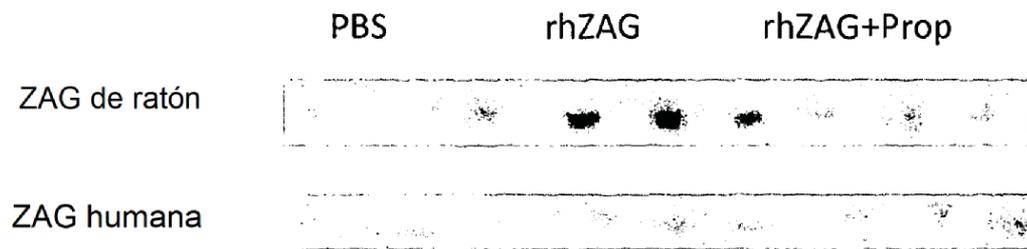


FIG. 51

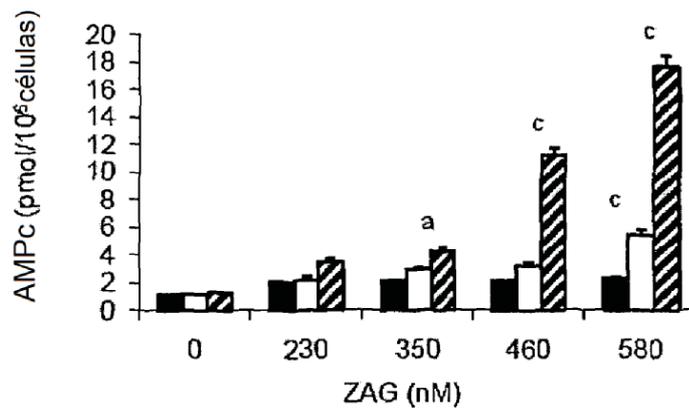


FIG. 52A

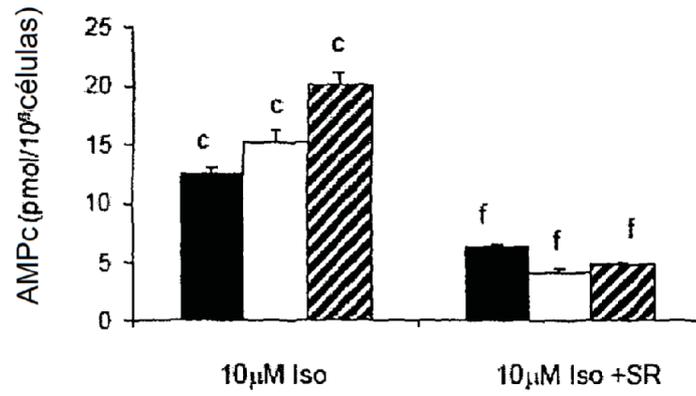


FIG. 52B

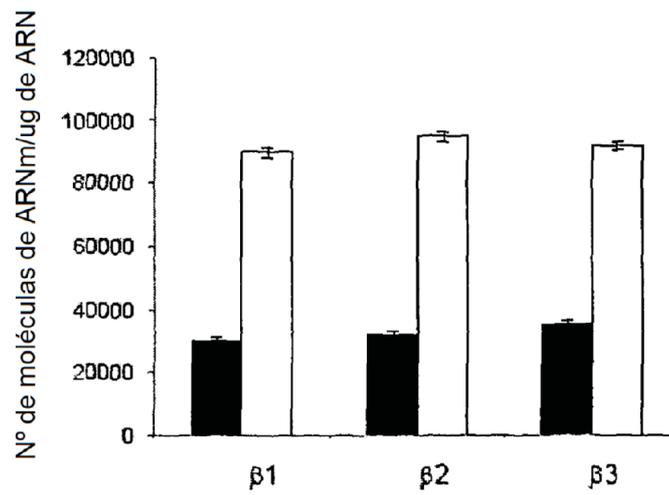


FIG. 52C

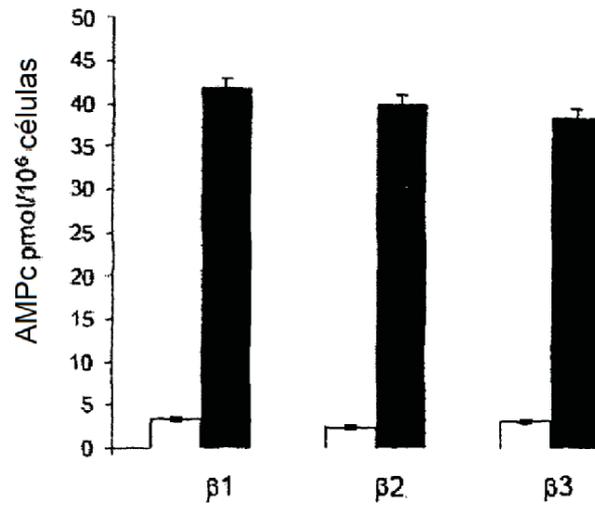


FIG. 52D

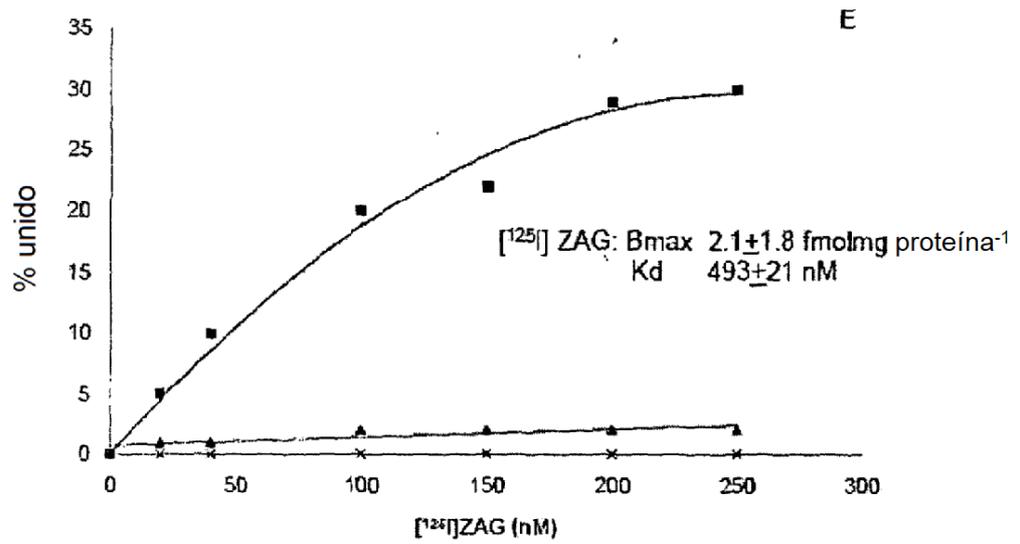


FIG. 52E

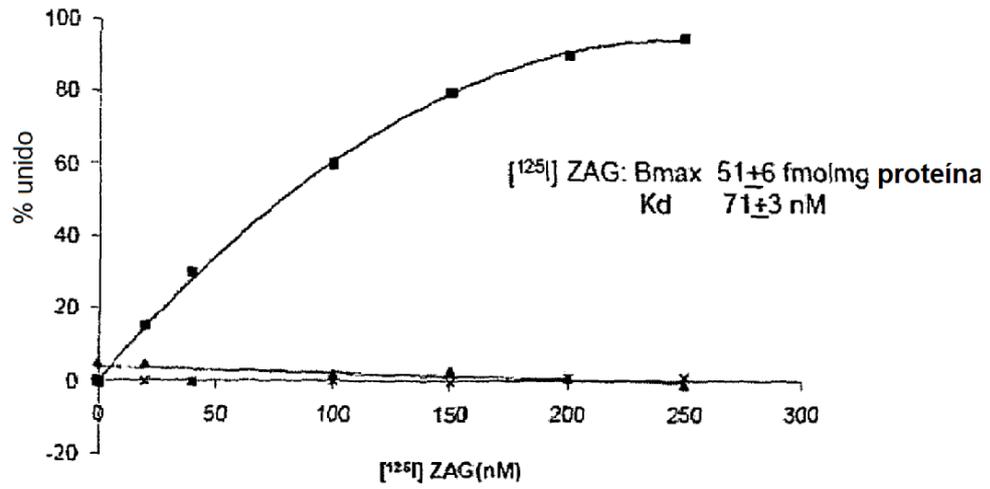


FIG. 52F

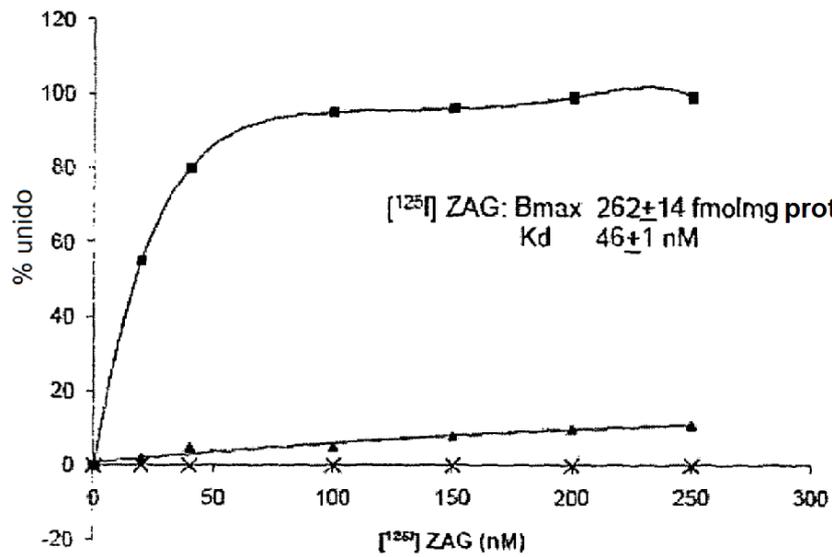


FIG. 52G

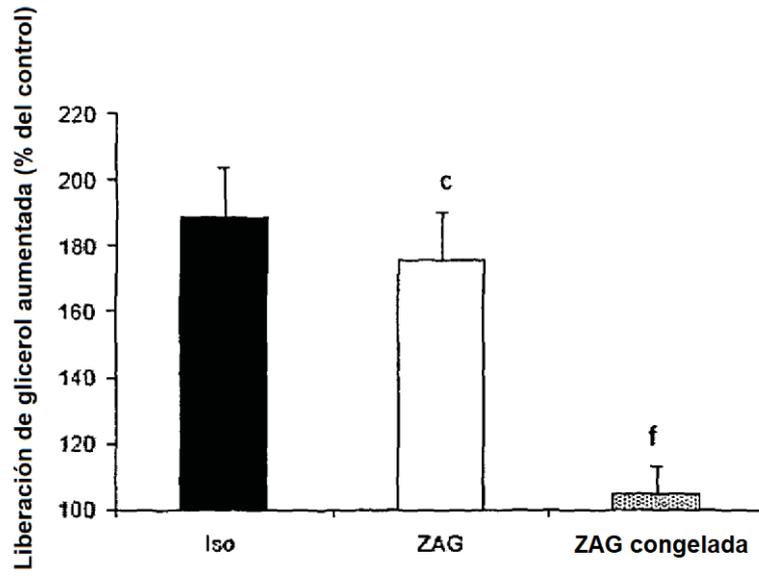


FIG. 52H

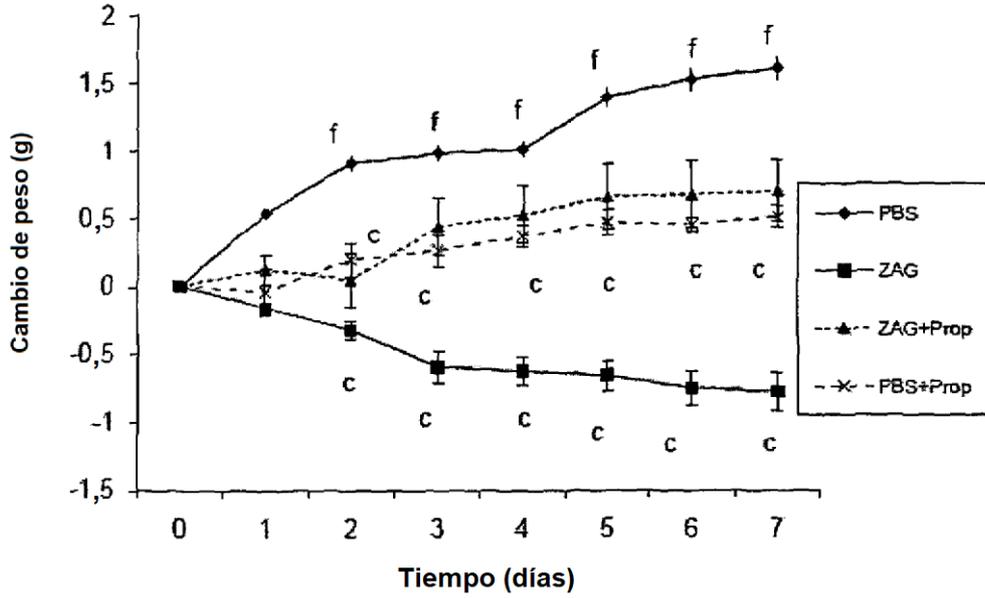


FIG. 53A

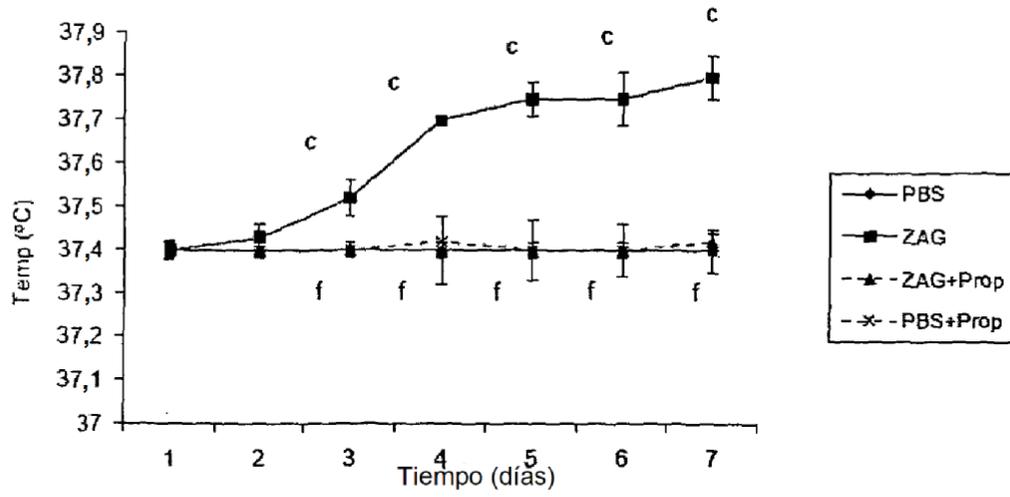


FIG. 53B

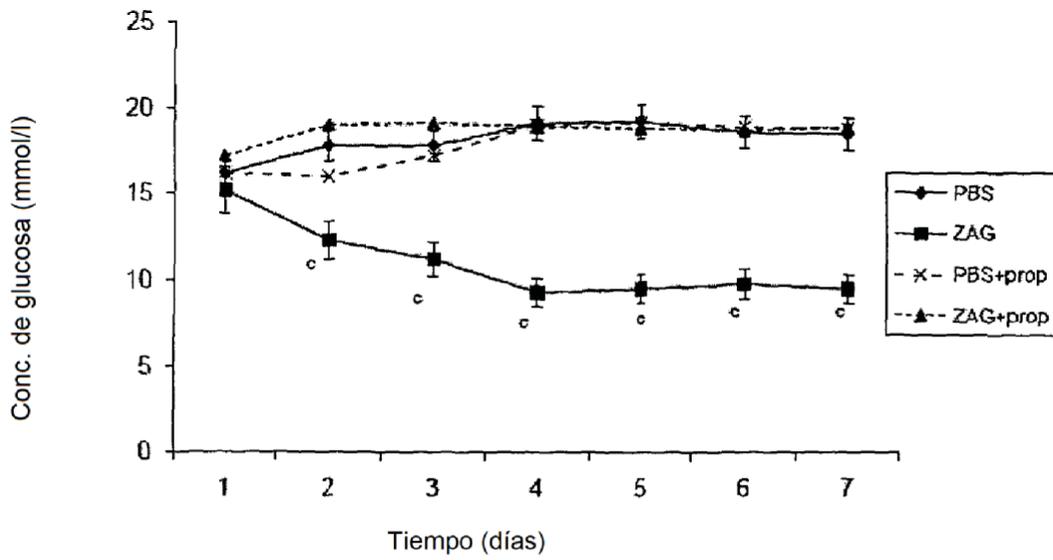


FIG. 53C

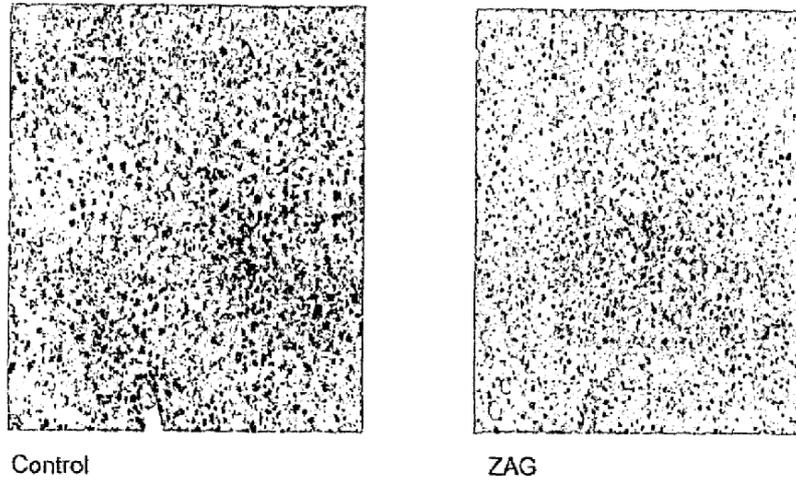


FIG. 53D

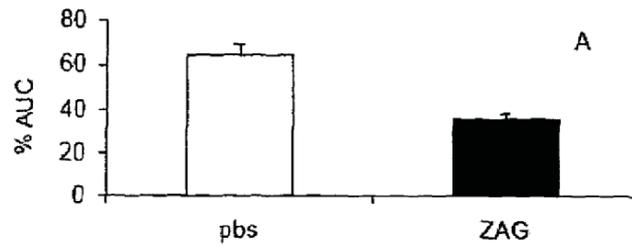


FIG. 54A

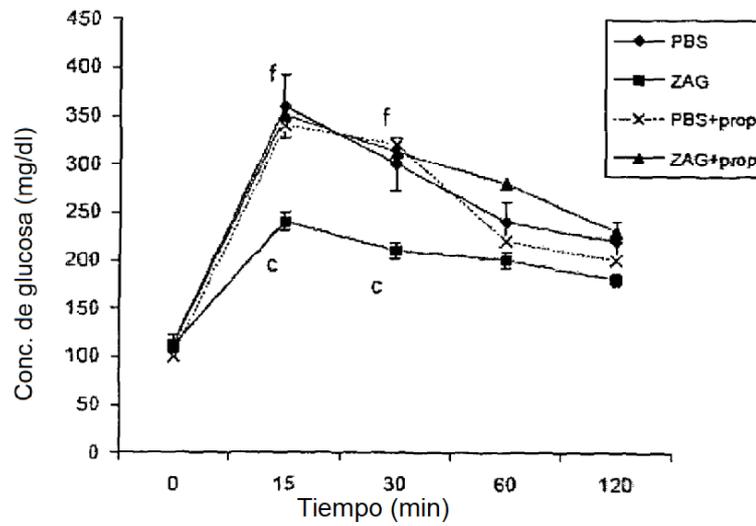


FIG. 54A (CONT.)

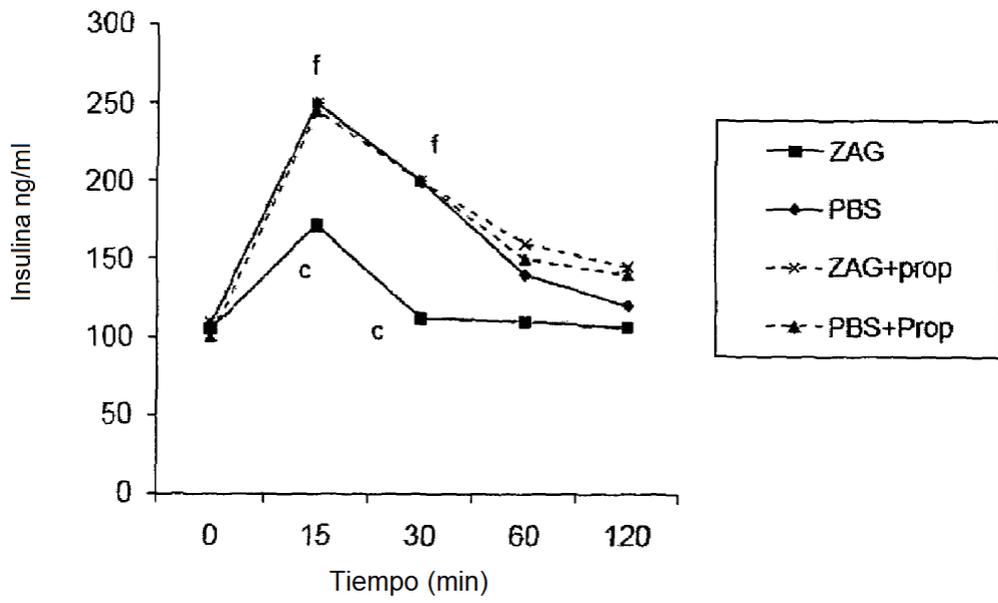


FIG. 54B

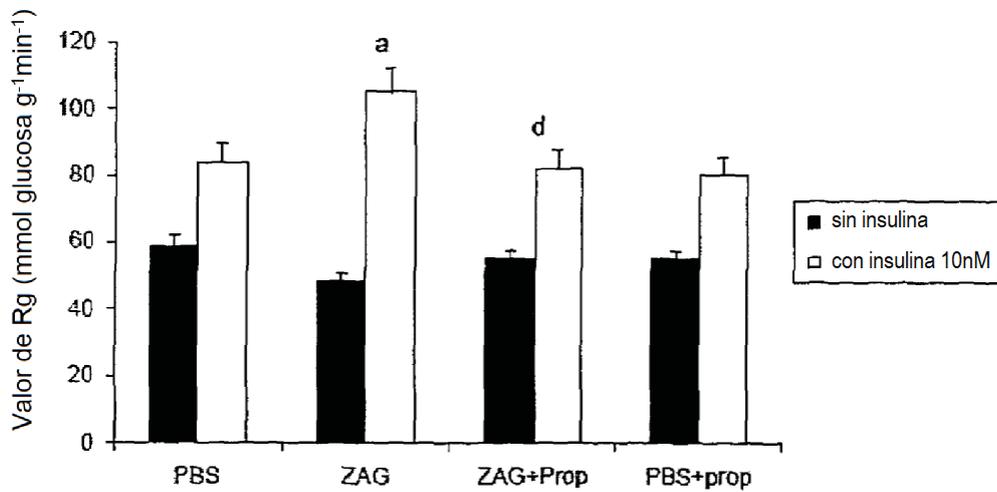


FIG. 54C

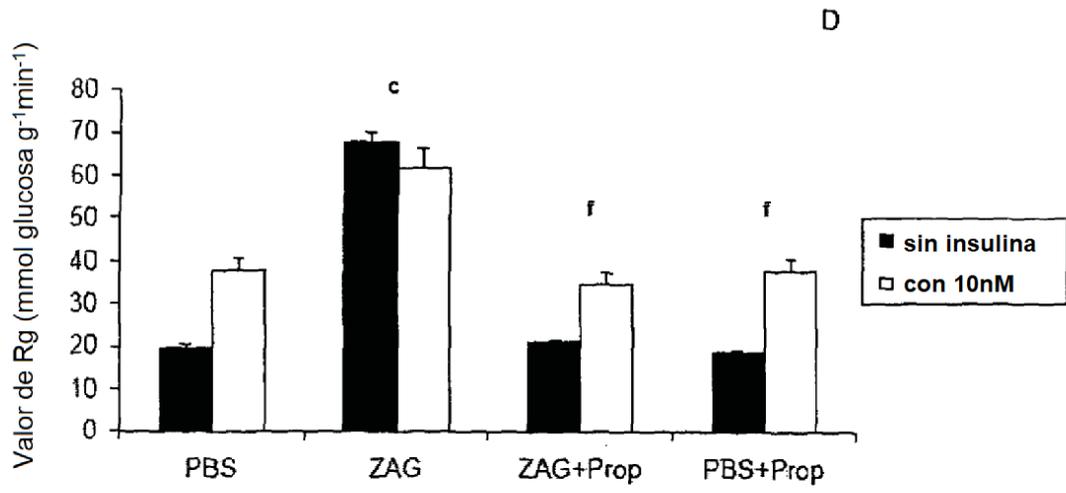


FIG. 54D

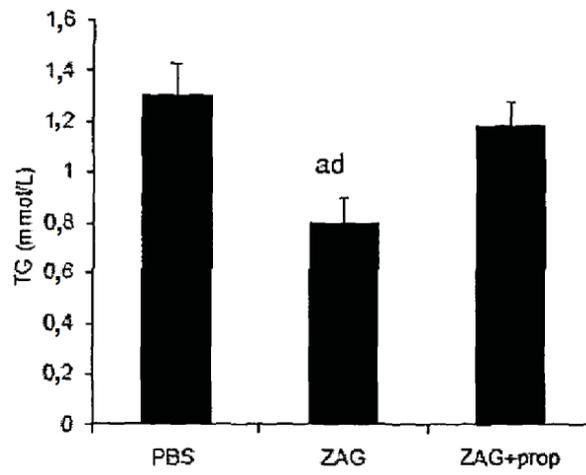


FIG. 54E

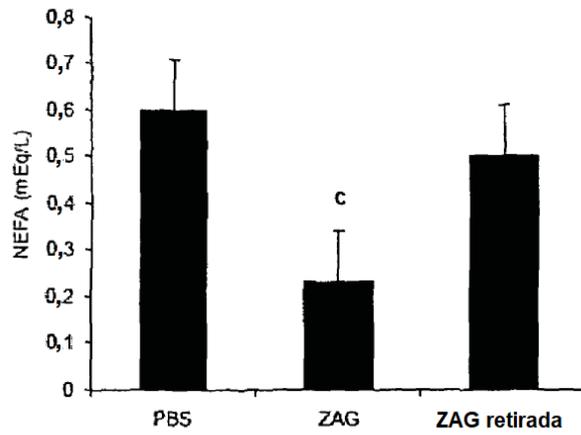


FIG. 54F

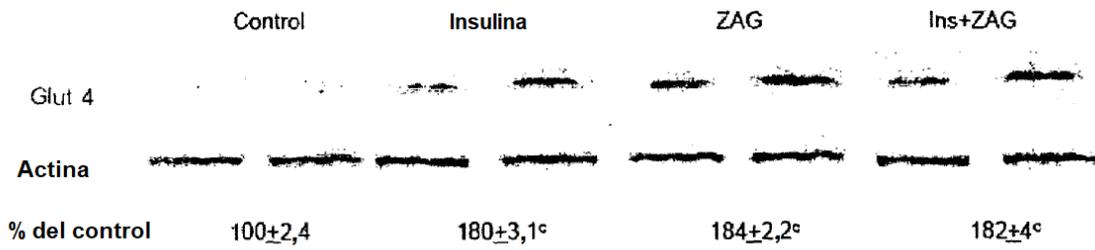


FIG. 54G

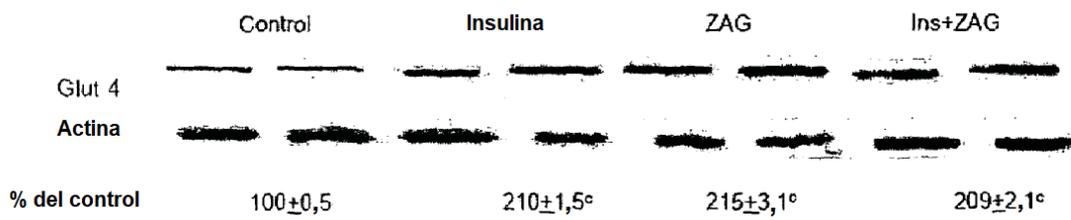


FIG. 54H

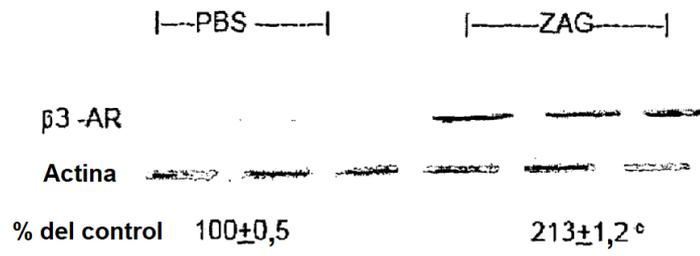


FIG. 55A

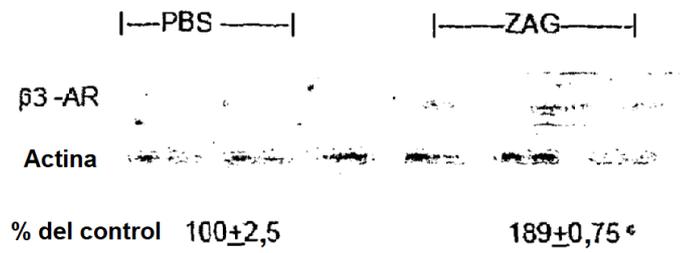


FIG. 55B

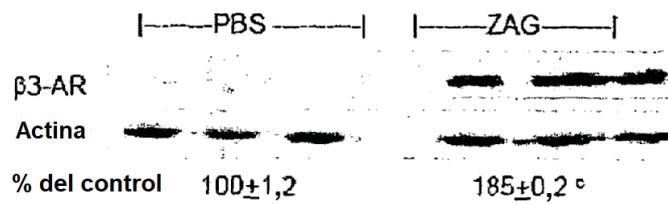


FIG. 55C

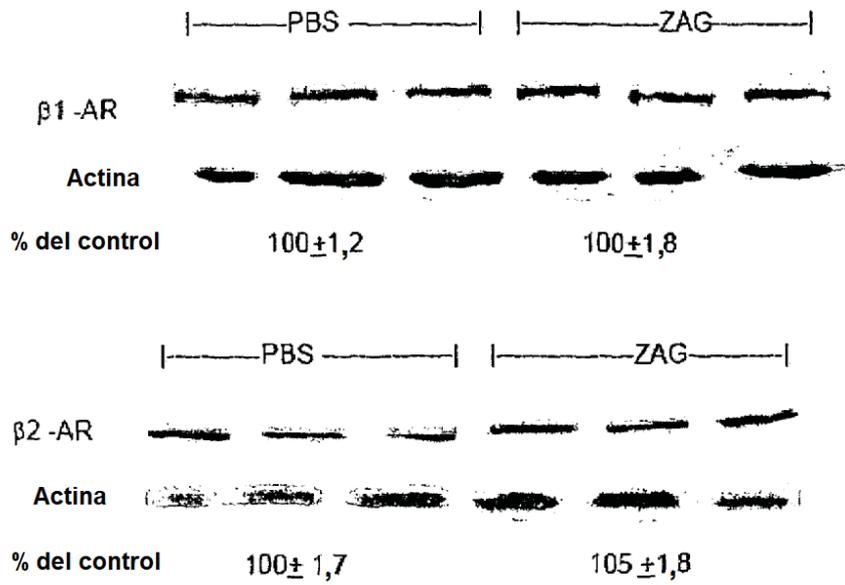


FIG. 56A

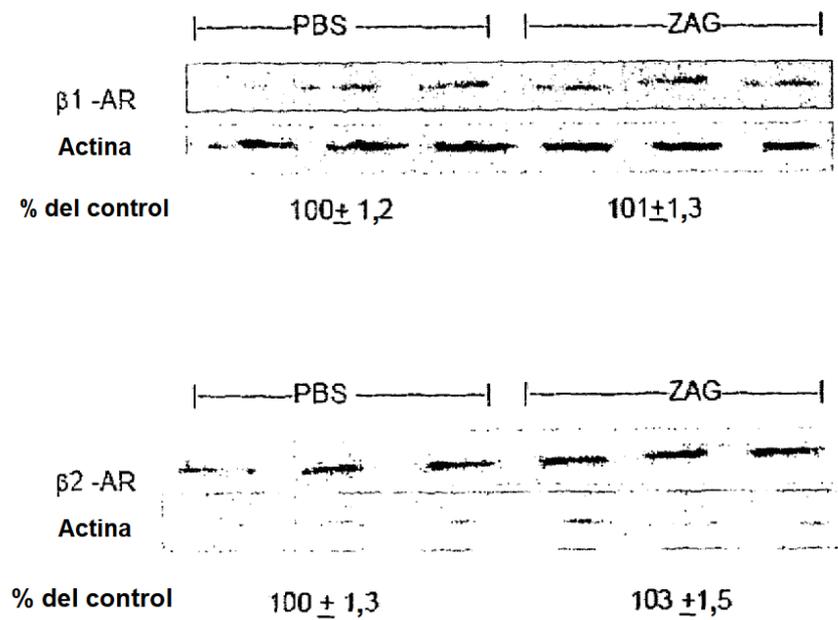


FIG. 56B

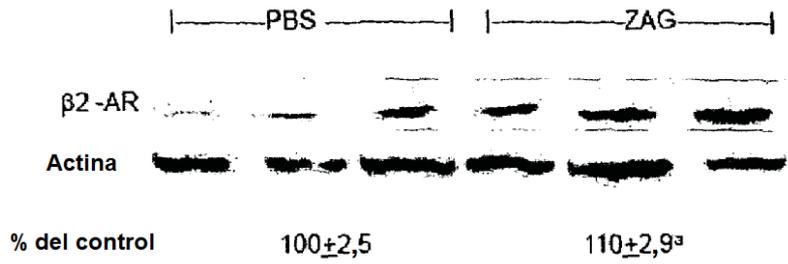
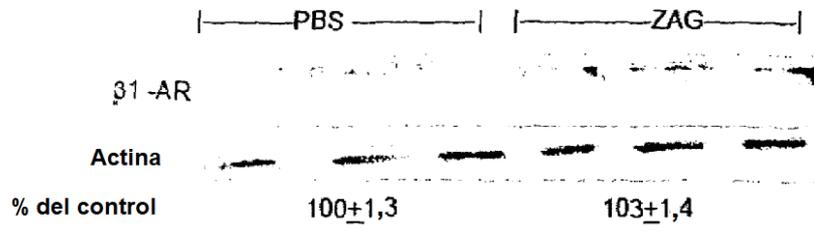


FIG. 56C

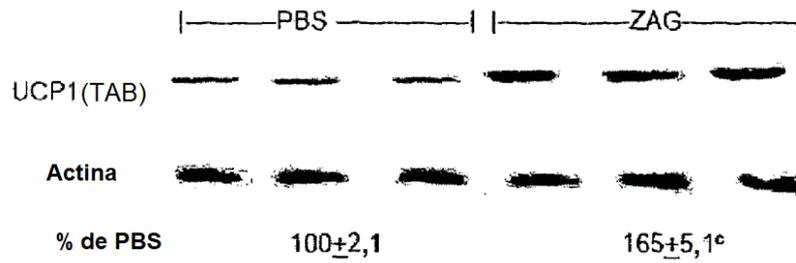


FIG. 57A

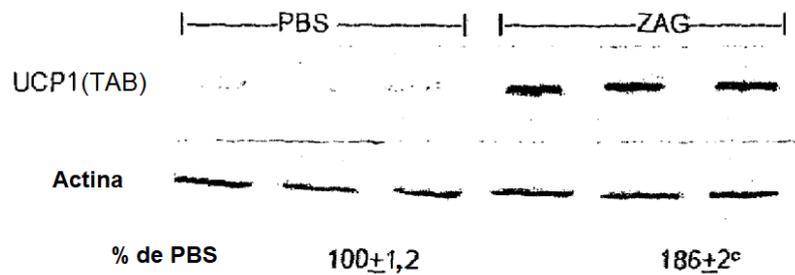


FIG. 57B

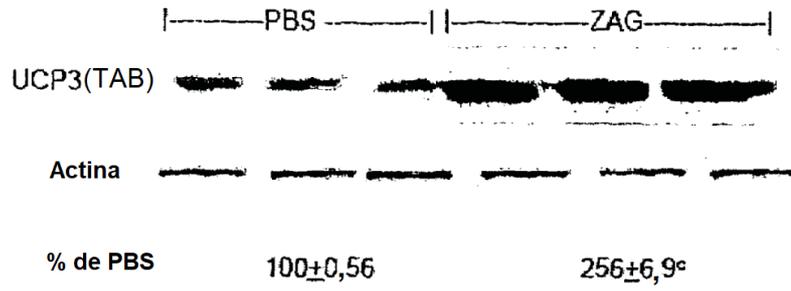


FIG. 57C

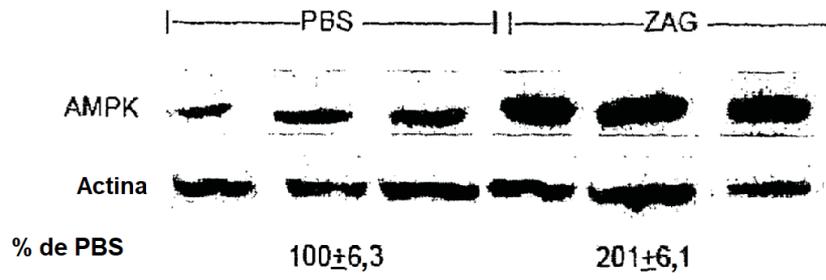


FIG. 57D