



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 442**

51 Int. Cl.:
A61K 31/429 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06838457 .7**
96 Fecha de presentación : **28.11.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1957061**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.08.2008**

54 Título: **Combinación que comprende al menos un aminoácido y un inhibidor de pkr para utilizar en el tratamiento de la pérdida de masa muscular.**

30 Prioridad: **30.11.2005 US 741092 P**
09.03.2006 US 780941 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.08.2011

73 Titular/es: **NESTEC S.A.**
55 avenue Nestlé
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es: **Tisdale, Michael;**
Greenberg, Norman Alan;
Eley, Helen y
Miller, Kevin Burke

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 363 442 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

Combinación que comprende al menos un aminoácido y un inhibidor de pkr para utilizar en el tratamiento de la pérdida de masa muscular

5

Antecedentes de la invención

Campo técnico

10 La invención está relacionada en general con el tratamiento de la pérdida de masa muscular en un mamífero, y más en particular, con la administración de uno o más aminoácidos de cadena ramificada (AACR), piruvato, β -hidroxi- β -metilbutirato o α -cetoisocaproato o cualquier combinación de los mismos en combinación con un inhibidor de proteína quinasa (PKR) dependiente de RNA en el tratamiento de dicha pérdida de masa muscular. La invención además está relacionada con formulaciones nutricionales adecuadas para dicha administración.

15

Antecedentes

20 Los aminoácidos son los bloques de construcción monoméricos de las proteínas, que a su vez comprenden un amplio rango de compuestos biológicos, que incluye enzimas, anticuerpos, hormonas, moléculas de transporte para iones y pequeñas moléculas, colágeno y tejidos musculares. Los aminoácidos se consideran hidrofóbicos o hidrofílicos, basándose en su solubilidad en agua, y más en particular, en las polaridades de sus cadenas laterales. Los aminoácidos con cadenas laterales polares son hidrofílicos, mientras que los aminoácidos que poseen cadenas laterales no polares son hidrofóbicos. Las solubilidades de los aminoácidos, en parte, determinan las estructuras de las proteínas. Los aminoácidos hidrofílicos tienden a cubrir las superficies de las proteínas mientras que los 25 aminoácidos hidrofóbicos tienden a cubrir las porciones interiores insolubles al agua de las proteínas.

De los 20 aminoácidos comunes, nueve se consideran indispensables (esenciales) en humanos, ya que el organismo no puede sintetizarlos. En su lugar, estos nueve aminoácidos deben obtenerse a través de la dieta del individuo. Una deficiencia de uno o más aminoácidos puede provocar un equilibrio de nitrógeno negativo. Un 30 equilibrio de nitrógeno negativo, por ejemplo, es cuando se secreta más nitrógeno que el que se administra. Dicha enfermedad puede conducir a la disrupción de la actividad enzimática y a la pérdida de masa muscular.

Se han identificado una serie de enfermedades musculares degenerativas cuyo tratamiento con suplementos de aminoácidos ha demostrado ser beneficioso. Por ejemplo, la caquexia es una enfermedad de desgaste corporal muy grave que se caracteriza por una marcada pérdida de peso, anorexia, astenia y anemia. la caquexia es una característica común en una serie de enfermedades, como el cáncer, sepsis, fallo cardíaco crónico, artritis reumatoide, y síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Otras enfermedades de desgaste muscular y trastornos son conocidas, incluyendo, por ejemplo, sarcopenia, una pérdida de masa muscular relacionada con la 40 edad.

40

Factor inductor de la proteólisis (PIF)

Se ha encontrado que ciertos tumores pueden inducir caquexia a través de la producción de una glicoproteína de 24 kDa denominada factor inductor de la proteólisis (PIF). Un mecanismo de acción propuesto del PIF es disminuir la 45 síntesis de proteínas; otro mecanismo propuesto de PIF es una activación de la degradación de proteínas; un tercer mecanismo propuesto es una combinación del descenso anteriormente mencionado de la síntesis de proteínas y la activación de la degradación de proteínas. Se ha hipotetizado que el descenso de la síntesis de proteína asociado con PIF es el resultado de la capacidad de PIF de bloquear el proceso de traducción de la síntesis de proteínas. Otro factor, la angiotensina II (Ang II) ha demostrado efectos similares y puede estar involucrada en el desgaste muscular observado en algunos casos de caquexia.

50

Se conoce el papel original de PIF en la ruta de la ubiquitina-proteosoma. El PIF produce un aumento de la liberación del ácido araquidónico, que se metaboliza entonces en prostaglandinas y ácido 15-hidroxiicosatetraenoico (15-HETE). El 15-HETE ha demostrado producir un aumento significativo en la degradación 55 de proteínas y en la unión nuclear del factor de transcripción NF- κ B (un factor nuclear que se une al potenciador del gen de la cadena ligera kappa de la inmunoglobulina en los linfocitos B).

55

Regulación de la síntesis de proteínas mediante el inicio de la traducción

60 Se hipotetiza que el papel de PIF en la inhibición de la síntesis de proteínas se debe a la capacidad teórica de PIF para bloquear la traducción mediante la activación de la proteína quinasa dependiente de RNA (PKR) de factores corriente abajo. La inhibición de la síntesis de proteínas mediante PIF está atenuada mediante insulina a concentraciones fisiológicas y por debajo de estas. Esto sugiere que el PIF puede inhibir la síntesis de proteínas en la etapa de inicio de la traducción, ya que la insulina regula la síntesis de proteínas a través de la activación de los 65 pasos de unión del RNA mensajero (mRNA) en el inicio de la traducción.

65

Existen dos pasos en el inicio de la traducción que están sujetos a la regulación: (1) la unión del RNA de transferencia de metionina iniciador (met-tRNA) a la subunidad ribosomal 40s; y (2) la unión del mRNA al complejo de preinicio 43s.

5 En el primer paso, el met-tRNA se une a la subunidad ribosomal 40s como un complejo ternario con el factor de iniciación 2 eucariota (eIF2) y guanósina trifosfato (GTP). Posteriormente, el GTP unido a eIF2 se hidroliza en guanósina difosfato (GDP) y eIF2 se libera de la subunidad ribosomal en un complejo GDP-eIF2. El eIF2 debe intercambiar entonces el GDP por GTP para participar en otra ronda de iniciación. Esto sucede a través de la acción
10 de otro factor de iniciación eucariota, eIF2B, que media el intercambio de nucleótidos guanina en eIF2. eIF2B está regulado por la fosforilación de eIF2 sobre su subunidad alfa, que la convierte a partir de un sustrato en un inhibidor competitivo de eIF2B.

15 En el segundo paso, la unión del mRNA al complejo de preinicio 43s requiere un grupo de proteínas referidas en conjunto como eIF4F, un complejo de multisubunidades que consta de eIF4A (una helicasa de RNA), eIF4B (que funciona junto con eIF4A para relajar la estructura secundaria en la región 5' no traducida del mRNA), eIF4E (que se une al ápice del m7GTP presente en el extremo 5' del mRNA), y eIF4G (que funciona como armazón de eIF4E, eIF4A y el mRNA). En conjunto, el complejo eIF4F sirve para reconocer, desplegar, y guiar al mRNA en el complejo de preinicio 43s. La disponibilidad de eIF4E para la formación del complejo eIF4F parece estar regulada por el
20 represor traduccional proteína de unión 1 a eIF4E (4E-BP1). El 4E-BP1 compete con eIF4G para unirse a eIF4E y es capaz de secuestrar eIF4E en un complejo inactivo. La unión de 4E-BP1 está regulada a través de la fosforilación mediante la diana de la quinasa de mamífero de rapamicina (mTOR), en la que el aumento de fosforilación provoca un descenso en la afinidad de 4E-BP1 por eIF4E.

25 Se cree que el mTOR se activa por fosforilación e inhibición del complejo de esclerosis tuberosa (TSC)1-TSC2 mediante señalización a través de la ruta de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/serina/treonina quinasa (ruta PI3K/AKT). El mTOR también fosforila la quinasa p70S6, que fosforila la proteína ribosomal S6, que se cree que aumenta la traducción del mRNA con una cadena ininterrumpida de residuos de pirimidina adyacentes a la estructura ápice en 5'. Las proteínas codificadas por dicho RNA incluyen proteínas ribosomales, factores de
30 elongación de la traducción y proteínas de unión a poli-A.

Factores anabólicos involucrados en el inicio de la traducción

35 Muchos estudios han demostrado que los factores anabólicos, como la insulina, factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), y los aminoácidos aumentan la síntesis de proteína y provocan la hipertrofia muscular. Los aminoácidos de cadena ramificada (AACR), en particular la leucina, pueden iniciar las rutas de transducción de señales que modulan el inicio de la traducción. Dichas rutas incluyen a menudo mTOR. Otros estudios han demostrado que los estímulos mitogénicos, como la insulina y AACR, señalan a través del eIF2. Como tal, el agotamiento de aminoácidos resulta en un aumento de la fosforilación del eIF2- α y un descenso en la síntesis de
40 proteínas.

Rutas de señalización involucradas en la síntesis y degradación de proteínas

45 Tal como se ha mencionado anteriormente, PIF se conoce por inducir la degradación de proteínas mediante la ruta del NF- κ B. Por lo tanto, es plausible que la inhibición de la síntesis de proteína mediante PIF suceda mediante un punto de inicio de señalización común, que diverge entonces en dos rutas separadas, una que promueve la degradación de proteínas mediante NF- κ B y la otra inhibiendo la síntesis de proteína a través de mTOR y/o eIF2.

50 AKT es una serina/treonina quinasa, también conocida como proteína quinasa B (PKB). La activación de AKT sucede a través de la unión directa de los productos de lípido inositol del PI3K a su dominio de homología a pleckstrin. La activación de AKT dependiente de PI3K también ocurre a través de la fosforilación de la treonina 308 mediada por la quinasa (PDK1) dependiente de fosfoinositida, que conduce a la autofosforilación de la serina 473. Aunque inicialmente se creyó que opera como componentes de distintas rutas de señalización, varios estudios han demostrado que las rutas de señalización de NF- κ B y AKT convergen. Los estudios han demostrado que la
55 señalización de AKT inhibe la apoptosis en una serie de tipos celulares in vitro, mediado por su capacidad de fosforilar componentes reguladores de la apoptosis, incluyendo I κ K, la quinasa implicada en la de activación de NF- κ B. Así, la activación de AKT estimula la activación de NF- κ B. Aunque esto coloca el AKT corriente arriba de la activación de NF- κ B en la secuencia de eventos de señalización, un estudio describe que AKT puede ser una diana corriente abajo de NF- κ B. En general, esto sugiere que AKT está involucrado en una ruta catabólica. Otros datos, no obstante, sugieren que AKT está también involucrado en procesos anabólicos a través de la activación de mTOR y la posterior fosforilación de la quinasa p70S6 y 4E-BP1, conduciendo a un aumento en la síntesis de proteínas.

60 PKR es una proteína serina/treonina quinasa dependiente de RNA inducida por interferón, responsable de controlar una ruta de defensa antiviral. PKR puede inducirse por varias formas de estrés celular diferente al interferón. Alguna evidencia sugiere que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF) también actúa a través de PKR. Curiosamente, tanto
65

el interferón como el TNF-alfa también se han visto implicados como factores causales de los estados de caquexia. Tras la interacción con estímulos activadores (por ejemplo, insulina, IGF, AACR), el PKR se ha descrito por formar homodímeros y autofosforilar. Como resultado, PKR es capaz de catalizar la fosforilación de sustratos diana, siendo el mejor caracterizado la fosforilación de la Serina 51 en la subunidad eIF2- α . El eIF2 secuestra entonces eIF2B, un componente limitador de la tasa de traducción, lo que resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas. Estudios recientes sugieren que PKR se asocia físicamente con el complejo I κ K y estimula la quinasa (NIK) que induce NF- κ B mientras fosforila a I κ K, lo que resulta en su posterior degradación. Algunos estudios sugieren que NF- κ B se activa por PKR mediante un mecanismo independiente de su actividad quinasa eIF2, mientras que otros estudios indican que la fosforilación de eIF2- α es necesaria para la activación de NF- κ B.

La quinasa residente en el RE (PERK) similar a PKR es otra quinasa que fosforila eIF2- α y activa el NF- κ B. No obstante, es improbable que PIF actúe a través de esta ruta, ya que PERK provoca la liberación de I κ K a partir de NF- κ B, pero no su degradación. Además, el PIF ha demostrado provocar la degradación de I κ K durante la activación de NF- κ B.

Tratamientos conocidos para la pérdida de masa muscular

El tratamiento de enfermedades como la caquexia a menudo incluye un suplemento nutricional, y en particular, un suplemento de aminoácidos, para intentar aumentar la síntesis de proteínas. Los tres AACR son valina, leucina, e isoleucina. Con anterioridad, la leucina se ha demostrado que funciona, no sólo como un bloque de construcción de proteínas, sino como inductor de las rutas de la transducción de señales que modulan el inicio de la traducción. Nuestra nueva investigación más reciente sugiere que los tres AACR poseen la capacidad de reducir la degradación de proteínas y en comparación aumentan la traducción de proteínas.

La caquexia es sólo una de las condiciones, trastornos y enfermedades, para las que el suplemento de aminoácidos se ha demostrado que es beneficioso. El suplemento de aminoácidos también se ha utilizado para tratar la diabetes, hipertensión, niveles altos de colesterol en suero y triglicéridos, enfermedad de Parkinson, insomnio, adicción a drogas y alcohol, dolor, insomnio e hipoglicemia. El suplemento con AACR, en particular, se ha utilizado para tratar trastornos hepáticos, incluyendo función hepática comprometida, incluyendo cirrosis, trastornos de la vesícula biliar, corea y disquinesia, y trastornos renales, incluyendo uremia. El suplemento con AACR también se ha demostrado con éxito en el tratamiento de pacientes en hemodiálisis, lo que resulta en una mejora en la salud general y el humor.

[Hasta la fecha, el tratamiento de la pérdida de masa muscular, incluyendo los tratamientos que implican un suplemento nutricional con aminoácidos, se ha centrado en la promoción del anabolismo muscular. Por ejemplo, la Publicación de la solicitud de Patente U.S. Nº 2004/0122097 de Verlaan et al. describe suplementos nutricionales que contienen leucina y proteína para promover la generación de tejido muscular. Los precursores de leucina, como el piruvato, y los metabolitos, como el β -hidroxi- β -metilbutirato y α -cetoisocaproato, presentan propiedades similares a las de la leucina. Como nota, el β -hidroxi- β -metilbutirato no se produce en humanos en ninguna cantidad clínicamente relevante y por lo tanto debe suplementarse.

Otros han demostrado que la insulina, una hormona anabólica, es capaz de promover la síntesis de proteínas cuando se administra en grandes dosis. Así, las aproximaciones de tratamiento conocidas, mientras proporcionen algún beneficio a los individuos que padecen de pérdida de masa muscular a través de un aumento de la generación de tejido muscular, no afectan la pérdida de masa muscular en sí. Es decir, los métodos conocidos para tratar la pérdida de masa muscular están dirigidos hacia el aumento del anabolismo muscular en lugar de disminuir el catabolismo muscular.

Los aminoácidos que comprenden el músculo esquelético están en un estado constante de flujo en el que nuevos aminoácidos, que provienen de la administración por vía enteral o parenteral o recircularizados, se depositan como proteínas y las proteínas actuales se degradan. La pérdida de masa muscular puede ser resultado de muchos factores incluyendo el descenso de la tasa de síntesis de proteína con una degradación normal, aumento de la degradación con síntesis normal o una exacerbación de ambas síntesis reducida y aumento de la degradación. Como resultado, las terapias cuyo fin es aumentar la síntesis solo abordan la mitad del problema en las enfermedades de desgaste muscular.

De acuerdo con esto, existe una necesidad en la materia de un método para tratar la pérdida de masa muscular que disminuya el catabolismo muscular y, opcionalmente, aumente el anabolismo muscular.

Resumen de la invención

La invención proporciona un producto nutricional para tratar la pérdida de masa muscular en un individuo. En una realización, el producto nutricional incluye al menos uno de los aminoácidos de cadena ramificada (AACR), piruvato β -hidroxi- β -metilbutirato o α -cetoisocaproato o una combinación de los mismos en combinación con un inhibidor de proteína quinasa dependiente de RNA (PKR). La invención proporciona además productos nutricionales para la

administración, incluyendo productos nutricionales administrables por vía oral.

En un primer aspecto, la invención proporciona un producto nutricional que comprende al menos uno de los aminoácidos de cadena ramificada (AACR); piruvato y β -hidroxi- β -metilbutirato o α -cetoisocaproato en combinación con un inhibidor de proteína quinasa dependiente de RNA (PKR) para utilizar como un antagonista del catabolismo de proteínas en el tratamiento de la pérdida de masa muscular en un individuo.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una cantidad efectiva de al menos uno de los siguientes: un aminoácido de cadena ramificada (AACR); un piruvato β -hidroxi- β -metilbutirato o α -cetoisocaproato en combinación con un inhibidor de proteína quinasa dependiente de RNA (PKR) para utilizar como un antagonista del catabolismo de proteínas en el tratamiento de la pérdida de masa muscular en un individuo.

Los aspectos ilustrativos de la presente invención están diseñados para resolver los problemas descritos en este documento y otros problemas no discutidos, que podrá descubrir un experto en la materia.

Breve descripción de las figuras

Estas y otras características de esta invención se entenderán más fácilmente a partir de las siguientes descripciones detalladas de varios aspectos de la invención tomados junto con las figuras acompañantes que describen varias realizaciones de la invención, en que:

FIG. 1 muestra una gráfica de la depresión de la síntesis de proteínas mediante el factor inductor de la proteólisis (PIF) a varias concentraciones.

FIG. 2 muestra una gráfica del efecto de los aminoácidos en la fosforilación de eIF2- α y PIF.

FIG. 3 muestra una gráfica del efecto de la insulina y del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF) en la fosforilación de eIF2- α de PIF.

FIG. 4 muestra la estructura de un inhibidor de proteína quinasa dependiente de RNA (PKR) adecuado para utilizar en la presente invención.

FIG. 5 muestra una gráfica del efecto del inhibidor de PKR de la FIG. 4 en la actividad proteolítica de PIF.

FIG. 6 muestra una gráfica del efecto del inhibidor de PKR de la FIG. 4 en la reversión de la reducción en la síntesis de proteínas mediada por PIF.

FIG. 7 muestra una gráfica del efecto del inhibidor de PKR de la FIG. 4 sobre la actividad proteolítica de la angiotensina II.

FIG. 8 muestra una gráfica del efecto del inhibidor de PKR de la FIG. 4 en la reversión de la reducción en la síntesis de proteínas mediada por angiotensina II.

FIG 9 muestra un mecanismo alternativo de degradación de proteínas provocado por el factor inductor de la proteólisis (PIF) e inhibido por aminoácidos de cadena ramificada, insulina e IGF-1.

FIG 10 muestra otro mecanismo alternativo de degradación de proteínas provocado por el factor inductor de la proteólisis (PIF) a través de la activación de PKR y eIF2 α que está inhibido por aminoácidos de cadena ramificada, insulina e IGF-1.

Se destaca que las figuras de la invención no están a escala. Las figuras pretenden describir sólo los aspectos típicos de la invención, y por lo tanto no deben considerarse como limitantes del alcance de la invención.

Descripción detallada

Tal como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona productos para utilizar en el tratamiento de la pérdida de masa muscular en un individuo. Más en concreto, los productos de la invención reducen el catabolismo muscular, en particular el catabolismo muscular mediado por el factor inductor de la proteólisis (PIF).

Tal como se utiliza aquí, los términos "tratamiento" y "tratar" se refieren al tratamiento profiláctico o preventivo y curativo o tratamiento que modifica la enfermedad, incluyendo el tratamiento de pacientes en riesgo de contraer una enfermedad o sospechosos de haber contraído una enfermedad, así como pacientes que están enfermos o han sido diagnosticados de sufrir una enfermedad o condición médica. Los términos "tratamiento" y "tratar" también se refieren al mantenimiento y/o promoción de la salud en un individuo que no sufre una enfermedad sino que puede ser susceptible de desarrollar una condición no saludable, como un desequilibrio de nitrógeno o la pérdida de masa

muscular. En consecuencia, una "cantidad efectiva" es una cantidad que trata una enfermedad o condición médica en un individuo o, más en general, proporciona un beneficio nutricional, fisiológico o médico al individuo. Un tratamiento puede estar relacionado con el paciente o el médico. Además, mientras que los términos "individuo" y "paciente" a menudo se utilizan para referirse a un humano, la invención no está limitada a ellos. De acuerdo con esto, los términos "individuo" y "paciente" se refieren a cualquier mamífero que sufre de o está en riesgo de sufrir una condición médica, como la pérdida de masa muscular.

Datos experimentales

Para poder determinar la eficacia de los aminoácidos de cadena ramificada (AACR) y otros agentes en la reducción del catabolismo muscular, se expusieron miotubos murinos C2C12 a PIF o angiotensina II en combinación con aminoácidos (incluyendo AACR), insulina, factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), y un inhibidor de PKR. El PIF se extrajo y se purificó a partir de tumores MAC16 tal como se describe en Smith et al., Effect of a Cancer Cachectic Factor on Protein Synthesis/Degradation in Murine C2C12 Myoblasts: Modulation by Eicosapentaenoic Acid, Cancer Research, 59:5507-13 (1999), que se incorpora en este documento por referencia. La degradación de proteínas se determinó utilizando el método descrito por Whitehouse et al., Increased Expression of the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Murine Myotubes by Proteolysis-Inducing Factor (PIF) is Associated with Activation of the Transcription Factor NF- κ B, British Journal of Cancer, 89:1116-22 (2003), que también se incorpora en este documento por referencia.

La FIG. 1 muestra una gráfica de la depresión en la síntesis de proteínas de PIF a concentraciones incrementales, medido en cuentas por minuto (CPM) como porcentaje de un control que no contiene PIF. Se nota una reducción significativa en la síntesis de proteínas, con una depresión máxima de la síntesis de proteína que ocurre a una concentración de PIF de 4,2 nM. La actividad proteolítica medida de PIF puede describirse más específicamente como la actividad de degradación similar a ubiquitina.

La FIG. 2 muestra una gráfica de análisis densitométrico de Western blots de eIF2- α fosforilado en miotubos C2C12 incubados con PIF, leucina, isoleucina, valina, metionina y arginina, tanto sólo como en combinación con PIF. La muestra control se incubó sólo en tampón fosfato salino (PBS). Tal como se puede ver en la FIG. 2, el PIF aumenta la fosforilación de eIF2- α significativamente, en comparación con el control. Cada uno de los aminoácidos reducen la fosforilación de eIF2- α en presencia de PIF, en comparación con PIF sólo. No obstante, los AACR (es decir, leucina, isoleucina y valina) reducen dicha fosforilación en alrededor el nivel del control o por debajo, mientras que los niveles de fosforilación inducidos por metionina y arginina fueron superiores a los del control. De forma sorprendente, a diferencia de los métodos de tratamiento conocidos dirigidos hacia el aumento de la síntesis de proteínas, y en los que la leucina presenta mayor eficacia que otros AACR, estos datos muestran que todos los AACR son más o menos igualmente efectivos en reducir fosforilación de eIF2- α inducida por PIF. De hecho, los niveles de fosforilación que resultan de la incubación de isoleucina y valina no fueron diferentes de los observados con la incubación de leucina.

La FIG. 3 muestra los resultados de experimentos similares que implican la incubación de insulina e IGF-1, sólo y en combinación con PIF. Ambas insulina e IGF-1 reducen significativamente la fosforilación de eIF2- α en presencia de PIF, en comparación con PIF sólo. Así, la capacidad de AACR de disminuir la degradación de proteínas mediadas por PIF puede suplementarse o aumentarse por la adición de insulina y/o IGF-1 o mediante tratamientos que aumentan el nivel de insulina y/o IGF-1.

La FIG. 4 muestra la estructura de un inhibidor de PKR útil en disminuir la degradación de proteínas inducida por PIF y aumentar la síntesis de proteína que se utiliza como control positivo de la inhibición de PKR.

Las FIGS. 5 a 8 muestran los resultados de los experimentos que implican la incubación del inhibidor de PKR en combinación con PIF o angiotensina II.

En la FIG. 5, puede verse que mientras PIF aumenta la degradación de proteína hasta un 87% cuando se incuba sólo, la adición del inhibidor de PKR revierte los niveles de degradación de proteína de vuelta a alrededor de los del control. De forma similar, en la FIG. 6, puede verse que mientras PIF reduce la síntesis de proteína hasta alrededor de un 25% cuando se incuba sólo, la adición del inhibidor de PKR revierte los niveles de síntesis de proteína de vuelta a alrededor de los del control.

Las FIGS. 7 y 8 muestran resultados similares tras la incubación del inhibidor de PKR con angiotensina II.

En la FIG. 7, la angiotensina aumenta la degradación de proteínas hasta alrededor de un 51%, en comparación con el control. La adición del inhibidor de PKR revierte esta tendencia, manteniendo los niveles de degradación de proteína a alrededor de los del control. De forma similar, en la FIG. 8, la angiotensina II reduce la síntesis de proteína en alrededor de un 40% en comparación con el control, mientras que la adición del inhibidor de PKR mantiene los niveles de síntesis de proteína a alrededor de los del control.

El inhibidor de PKR atenúa las acciones de PIF y angiotensina II tanto en la degradación de proteínas como en la síntesis de proteínas. Esto sugiere que ambos PIF y angiotensina II median sus efectos a través de mecanismos similares y a través de un mediador común, probablemente involucrando a PKR. Más específicamente, estos resultados sugieren que PIF activa PKR, que a su vez provoca la fosforilación de eIF2- α , inhibiendo la unión del iniciador metionil-tRNA (met-tRNA) en la subunidad ribosomal40s. Los AACR, insulina e IGF-1 atenúan la fosforilación de eIF2- α provocada por PIF, apoyando así la hipótesis que PIF sobrerregula la fosforilación de eIF2- α para inhibir la síntesis de proteínas. Ya que PKR puede inhibir la síntesis de proteínas y activar NF- κ B, que conduce a la degradación de proteínas, PKR es probablemente un componente temprano en la ruta de señalización de PIF.

Existen también evidencias que PKR está involucrado en la regulación de la fosforilación de 4E-BP1. Así, si PIF señala a través de PKR, es probable que también pueda reducir la síntesis de proteína a través de la activación de la serina/treonina fosfatasa PP2A mediada por PKR, que puede llevar a cabo la defosforilación de 4E-BP1, que a su vez secuestra eIF4E en un complejo inactivo, previniendo la formación del complejo de preinicio 43s.

La FIG. 9 muestra un mecanismo alternativo. Tanto el factor inductor de la proteólisis (PIF) como la angiotensina II (Ang II) disminuyen la síntesis de proteínas en un 40%, y las concentraciones de ambos agentes que son máximamente efectivas en la depresión de la síntesis de proteína son las mismas que aquellas que son máximamente efectivas en la inducción de la degradación de proteínas. Los resultados sugieren que tanto la insulina como el IGF1, al menos parcialmente, atenúan la degradación de proteínas inducida por PIF a través de la inhibición de PKR y/o fosforilación de eIF2 α . El mecanismo de activación mediante PIF y Ang II puede ser a través de PACT (proteína activadora de la proteína quinasa inducida por interferón), un activador de proteína celular de PKR, aunque PIF también es una molécula polianiónica, y así puede activarse directamente. Independientemente, la fosforilación de eIF2 α mediante PIF y Ang II parece ocurrir a través de PKR, ya que un inhibidor de PKR atenúa el efecto inhibidor de ambos agentes sobre la síntesis de proteína. El efecto de ambos PIF y Ang II sobre la traducción de proteínas parece surgir a partir de un aumento de la fosforilación de eIF2 α .

La inhibición de la síntesis de proteína en la apoptosis mediante el factor de necrosis tumoral - α (TNF- α) también está asociado con el aumento de la fosforilación de eIF2 α . Un apoyo adicional al papel de la fosforilación de eIF2 α en la inhibición de la síntesis de proteínas por PIF y Ang II se proporciona en la observación que tanto la insulina como el IGF1, que fueron efectivos en la supresión de la inhibición de la síntesis de proteína, atenuan por completo la inducción de la fosforilación de eIF2 α . Los datos recogidos sugieren que los AACR también trabajan a través del mismo mecanismo para inhibir la ruta de degradación iniciada por PIF. Este estudio proporciona la primera evidencia de una relación entre la depresión de la síntesis de proteína en el músculo esquelético mediante PIF (y Ang II), a través de la activación de PKR, y fosforilación de eIF2 α , y el aumento de la degradación de la proteína miosina miofibrilar, a través de la activación de NF- κ B que resulta en un aumento de la expresión y actividad de la ruta proteolítica ubiquitina-proteasoma. Esto sugiere que los agentes que se dirigen a PKR (por ejemplo, los AACR) pueden ser efectivos en el tratamiento de la atrofia muscular en la caquexia por cáncer.

La FIG. 10 muestra otro mecanismo alternativo. Tal como se ha dicho previamente, ambos factores inductores de la proteólisis (PIF) y la angiotensina II (Ang II) aumentan la degradación de proteínas a través de la fosforilación de PKR y/o eIF2 α . El NF- κ B puede activarse mediante PIF o un mediador corriente abajo de PIF (PKR y/o eIF2 α) que ocurre a través de la liberación de NF- κ B. En este otro mecanismo alternativo, el NF- κ B no es parte de la misma cascada de fosforilación pese a tener la misma diana para promover el marcaje por ubiquitina de las proteínas a degradar.

En conjunto, los datos anteriores apoyan una serie de nuevos aspectos de la presente invención. Primero, los AACR pueden utilizarse para tratar la pérdida de masa muscular en un individuo mediante el antagonismo del catabolismo de proteínas mediado por PIF y/o angiotensina II a través de la inhibición de la activación de PKR y/o eIF2 α . Segundo, cada uno de los AACR es igualmente efectivo en dicha antagonización. Tercero, la coadministración de insulina, IGF-1, y/o un inhibidor de PKR, o el uso de tratamientos para aumentar el nivel de uno o ambos insulina e IGF-1, puede aumentar la eficacia de los tratamientos con AACR mediante el antagonismo adicional del catabolismo de proteínas, aumentando la síntesis de proteínas, o ambos.

Los productos nutricionales de acuerdo con la invención pueden, por lo tanto, incluir los AACR, solos o en combinación con insulina, IGF-1, y/o un inhibidor de PKR. Los AACR pueden administrarse en sus formas libres, como dipéptidos, tripéptidos, polipéptidos, proteínas ricas en AACR, y/o como proteínas manipuladas para enriquecer el contenido de AACR. Los dipéptidos, tripéptidos y polipéptidos pueden incluir dos o más AACR. Cuando no se incluye ningún AACR en un dipéptido, tripéptido, o polipéptido, los aminoácidos preferibles incluyen alanina y glicina, pero los no AACR puede ser cualquier aminoácido dispensable o indispensable (esencial o no esencial). Por ejemplo, los dipéptidos preferibles incluyen, pero no se limitan a, alanil-leucina, alanil-isoleucina, alanil-valina, glicil-leucina, glicil-isoleucina, y glicil-valina.

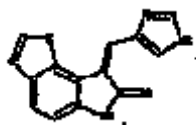
Los productos nutricionales de acuerdo con la invención pueden de forma similar incluir precursores y/o metabolitos de AACR, en particular a precursores y/o metabolitos de leucina, además de o en lugar de AACR. Tales productos

pueden incluir también cualquier número de ingredientes adicionales, que incluye, por ejemplo, una proteína, una fibra, un ácido graso, una vitamina, un mineral, un azúcar, un carbohidrato, un agente aromatizante, un medicamento y un agente terapéutico.

- 5 Los productos nutricionales de la presente invención pueden administrarse por vía oral, a través de una sonda de alimentación, o por vía parenteral. Tales productos pueden utilizarse en el tratamiento de un individuo que padece de cualquier enfermedad de desgaste muscular, trastorno, o condición, o cualquier enfermedad, trastorno, o condición con el que se asocia la pérdida de masa muscular, incluyendo, por ejemplo, caquexia, cáncer, pérdida de peso inducida por un tumor, sepsis, fallo cardíaco crónico, artritis reumatoide, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), sarcopenia, diabetes, hipertensión, niveles altos de colesterol en suero, niveles altos de triglicéridos, enfermedad de Parkinson, insomnio, adicción a drogas, adicción al alcohol, dolor, insomnio, hipoglicemia, función hepática comprometida, incluyendo cirrosis, trastornos de la vesícula biliar, corea, disquinesia, y un trastorno renal, incluyendo uremia.
- 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un producto nutricional que comprende al menos uno de los siguientes: un aminoácido de cadena ramificada (AACR); piruvato, o β -hidroxi- β -metilbutirato o α -cetoisocaproato, en combinación con un inhibidor de proteína quinasa (PKR) dependiente de RNA, para utilizar como un antagonista del catabolismo de las proteínas en el tratamiento de la pérdida de masa muscular en un individuo.
- 10 2. Una cantidad efectiva de al menos uno: de un aminoácido de cadena ramificada (AACR); piruvato o β -hidroxi- β -metilbutirato o α -cetoisocaproato en combinación con un inhibidor de proteína quinasa (PKR) dependiente de RNA, para utilizar como un antagonista del catabolismo de las proteínas en el tratamiento de la pérdida de masa muscular en un individuo.
- 15 3. El producto nutricional para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1 o una cantidad efectiva para utilizar de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende uno o más AACR seleccionados de un grupo que consiste en: leucina, isoleucina y valina.
- 20 4. El producto nutricional para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1 o una cantidad efectiva para utilizar de acuerdo con la reivindicación 2, además para utilizar como promotor en la síntesis de proteínas en el tratamiento de la pérdida de masa muscular.
- 25 5. El producto nutricional para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1 o una cantidad efectiva para utilizar de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el AACR está en forma de al menos uno de: un dipéptido, tripéptido o polipéptido.
- 30 6. El producto nutricional o cantidad efectiva para utilizar de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el dipéptido incluye dos AACR.
- 35 7. El producto nutricional o cantidad efectiva para utilizar de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho tripéptido o polipéptido comprende dos o más AACR.
- 40 8. El producto nutricional o cantidad efectiva para utilizar de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el dipéptido se selecciona a partir de un grupo que consiste en: alanil-leucina, alanil-isoleucina, alanil-valina, glicil-leucina, glicil-isoleucina y glicil-valina.
9. El producto nutricional para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1 o una cantidad efectiva para utilizar de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además al menos uno de: insulina y factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1).
10. El producto nutricional para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1 o una cantidad efectiva para utilizar de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el inhibidor de PKR posee la estructura:



- 45 11. El producto nutricional para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además al menos uno de los siguientes: una proteína, una fibra, un ácido graso, una vitamina, un mineral, un azúcar, un carbohidrato, un agente aromatizante, un medicamento y un agente terapéutico.
- 50 12. La cantidad efectiva para utilizar de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el individuo se trata para elevar el nivel de al menos uno de los siguientes: insulina e IGF-1.
- 55 13. El producto nutricional para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1 o una cantidad efectiva para utilizar de acuerdo con la reivindicación 2, en el que al menos uno de los siguientes está en forma de un producto nutricional administrable por vía oral: el AACR, piruvato β -hidroxi- β -metilbutirato o α -cetoisocaproato.
14. La cantidad efectiva para utilizar de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el producto nutricional administrable por vía oral incluye además al menos uno de los siguientes: una proteína, una fibra, un ácido graso, una vitamina, un mineral, un azúcar, un carbohidrato, un agente aromatizante, un medicamento y un agente terapéutico.
15. El producto nutricional para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el producto nutricional se

administra a través de una sonda de alimentación.

5 **16.** El producto nutricional para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el producto nutricional se administra por vía parenteral.

10 **17.** La cantidad efectiva para utilizar de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el individuo posee al menos uno de los siguientes: caquexia, cáncer, pérdida de peso inducida por un tumor, sepsis, fallo cardíaco crónico, artritis reumatoide, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), sarcopenia, diabetes, hipertensión, niveles altos de colesterol en suero, niveles altos de triglicéridos, enfermedad de Parkinson, insomnio, adicción a drogas, adicción al alcohol, dolor, insomnio, hipoglicemia, función hepática comprometida, incluyendo cirrosis, trastornos de la vesícula biliar, corea, disquinesia y un trastorno renal, incluyendo uremia.

FIG. 1

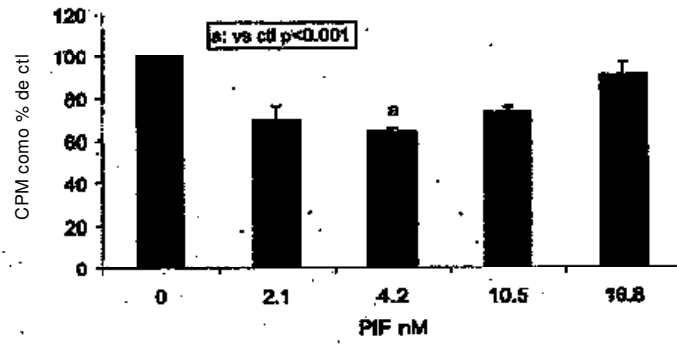


FIG. 2

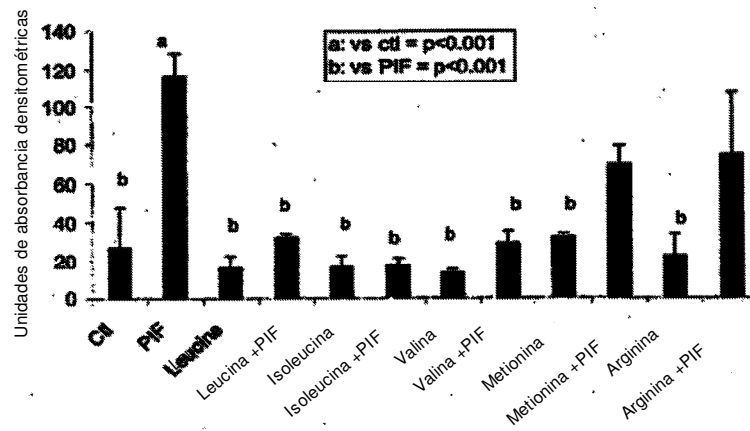


FIG. 3

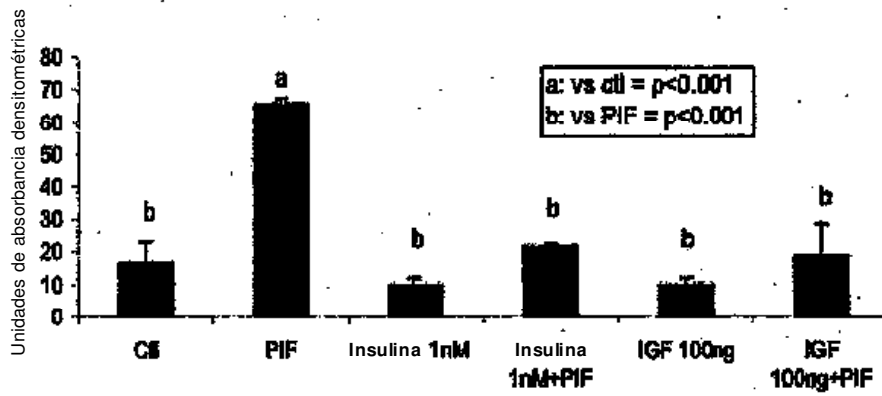


FIG. 4

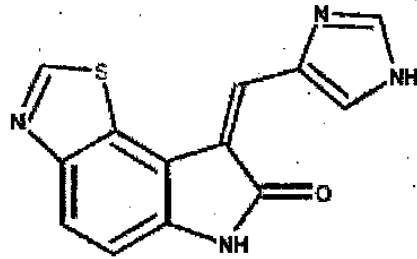


FIG. 5

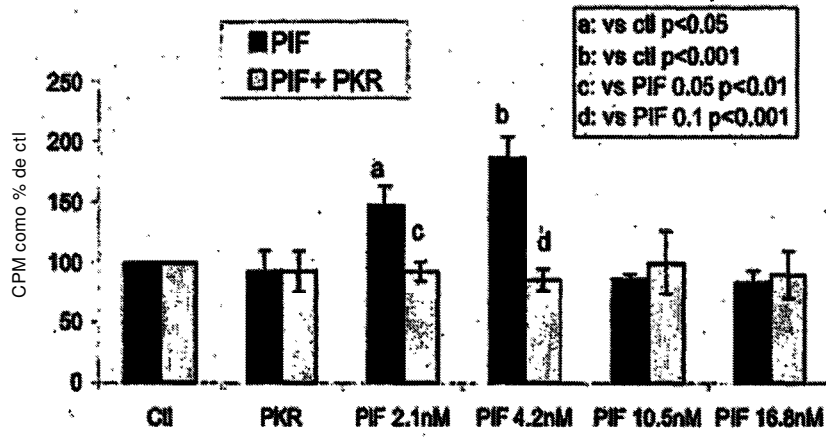


FIG. 6

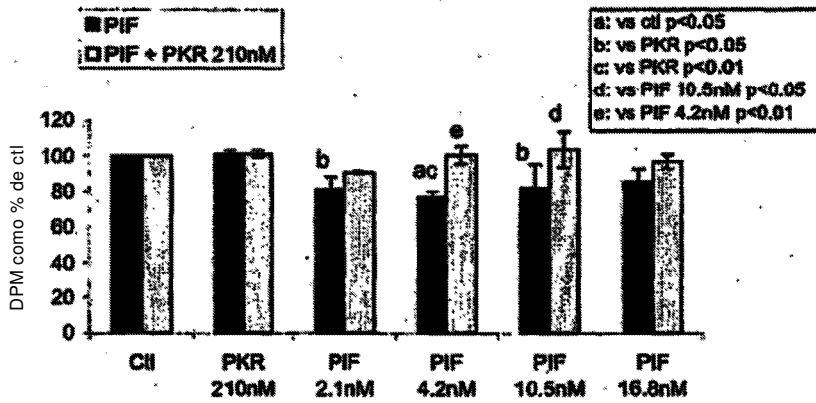


FIG. 7

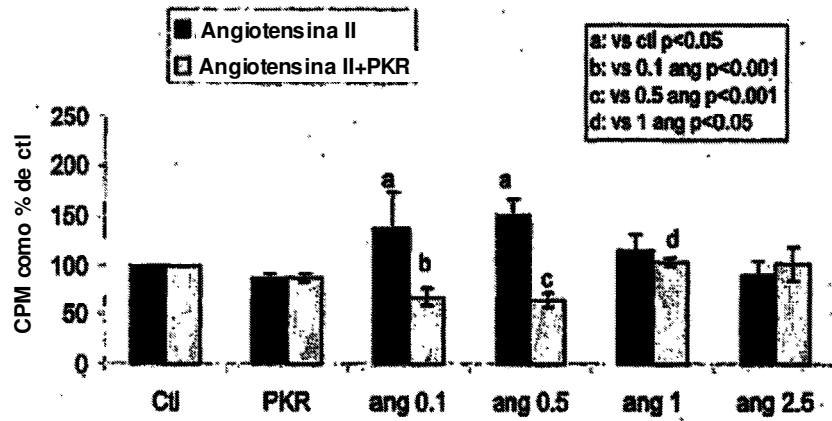
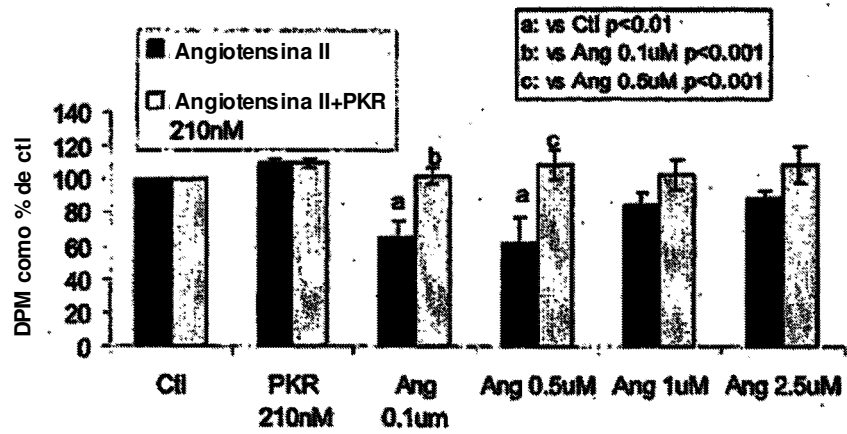


FIG. 8



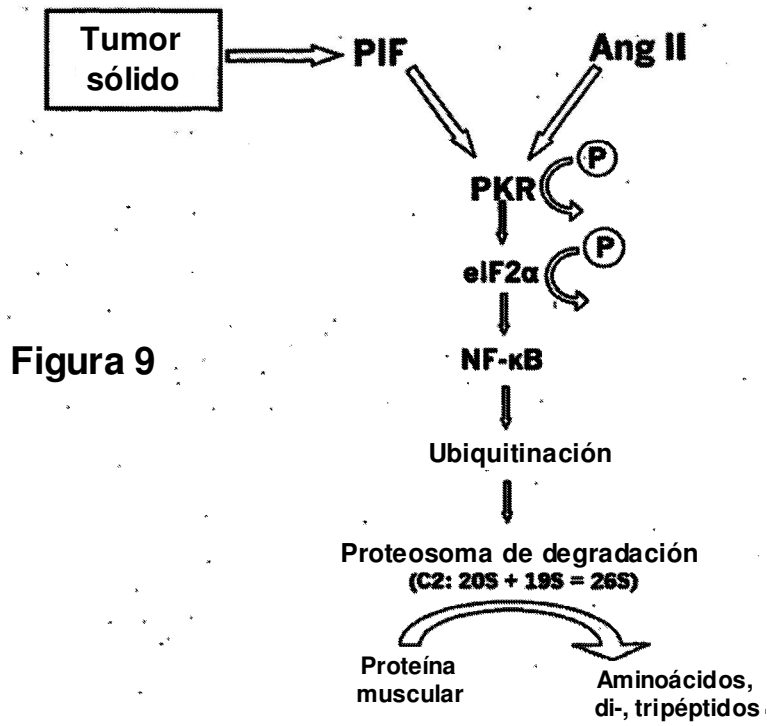
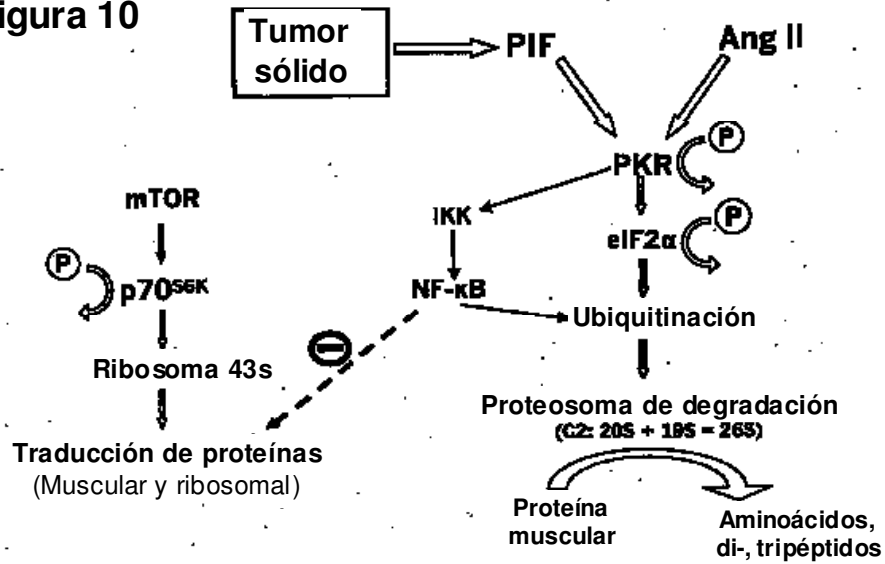


Figura 9

Mecanismos de caquexia del cáncer

Figura 10



Mecanismos de caquexia del cáncer