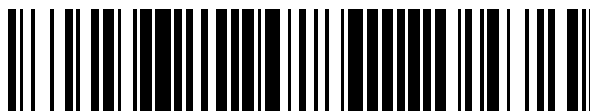


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 097**

51 Int. Cl.:

A61K 38/56 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04779693 .3**

96 Fecha de presentación: **30.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1663262**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Composiciones que incluyen el inhibidor de Bowman-Birk para el tratamiento de la atrofia muscular y músculo degenerativo**

30 Prioridad:
01.08.2003 US 491695 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2012

73 Titular/es:
**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA
CENTER FOR TECHNOLOGY TRANSFER 3160
CHESTNUT STREET, SUITE 200
PHILADELPHIA, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:
**SWEENEY, H., Lee;
MORRIS, Carl, A. y
KENNEDY, Ann, R.**

74 Agente/Representante:
Lazcano Gainza, Jesús

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).

ES 2 383 097 T3

DESCRIPCIÓN

Ámbito de la invención

La presente invención proporciona composiciones que incluyen el Inhibidor de Bowman-Birk (BBI) o un derivado del mismo para su uso en el tratamiento y/o prevención de la atrofia del músculo esquelético y enfermedades generativas del músculo esquelético. Por ejemplo, las composiciones que incluyen BBI o uno de sus derivados pueden administrarse a un sujeto para prevenir o tratar la atrofia por desuso durante periodos de reposo en cama/inactividad o evitar la atrofia muscular durante vuelos espaciales. Además, la mejora funcional del músculo esquelético tras el tratamiento con una composición que incluye BBI o uno de sus derivados es indicativa de dichas composiciones, siendo útil a la hora de aliviar los síntomas y/o reduciendo la progresión de las enfermedades degenerativas del músculo esquelético incluyendo, pero no limitándose a, la distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia del músculo espinal y lesión de la médula espinal.

Antecedentes de la invención

La atrofia del músculo esquelético, la pérdida de masa muscular, está asociada con la eliminación de la señalización inducida por carga o bien durante el desuso o en condiciones de microgravedad. Esta atrofia está mediada por la reducción/inhibición de vías de señalización de crecimiento y un aumento en las vías asociado con la degradación de proteínas (Goldberg, A.L. J Biol Chem 1969 244: 3223-3229; Jaspers, S.R. y Tischler, M.E. J Appl Physiol 1984 57: 1472-1479; Loughna et al. J Appl Physiol 1986 61:173-179). Esta rápida pérdida de fuerza y de masa muscular, especialmente en la población anciana, representa un serio problema de salud.

Como la primera respuesta a la eliminación de la carga parecen ser cambios en o bien la degradación o la síntesis de la proteína, una posible estrategia de tratamiento para reducir la atrofia muscular sería restaurar la señalización normal de cualquiera de estos procesos. La investigación sobre la señalización de las vías de crecimiento ha mostrado cambios significativos en los niveles y actividades de proteínas de señalización claves después de la descarga (Gordon et al. J Appl Physiol 2001 90: 1174-1183; Hornberger et al. 2001 Am J Physiol Cell Physiol 281: C179-187; Hunter et al. 2002 Faseb J 16: 529-538; Mitchell, P.O. and Pavlath, G.K. Am J Physiol Cell Physiol 2001 281: C1706-1715). La sobreexpresión de una proteína de señalización activa, Akt, generó una significativa hipertrofia muscular e inhibió la atrofia muscular asociada con la denervación (Bonide et al. Nat Cell Biol 2001 3: 1014-1019). Sin embargo, el aumento de IGF-1, un potente activador de la hipertrofia muscular (Barton-Davis et al. Proc Natl Acad Sci USA 1998 95: 15603-15607) no inhibió la pérdida en la masa muscular asociada con la suspensión de las extremidades traseras (Criswell et al. Am J Physiol 1998 275: E373-379). Esto es indicativo de los mecanismos desconocidos que bloquean la cascada de IGF-I iniciada de las vías de crecimiento durante el desuso.

En lugar de centrarse en las vías de crecimiento, otro método terapéutico potencial para contrarrestar la atrofia por desuso sería evitar la activación incrementada de la degradación de proteína. La pérdida de la proteína muscular, más especialmente la degradación de la proteína miofibrilar, se considera que sucede primeramente a través de la activación de una vía ubiquitina-proteasoma (Taillandier et al. Biochem J 1996 316: 65-72; Loughna et al. J Clin Invest 1997 100: 197-203; Ikemoto et al. Faseb J 2001 15: 1279-1281) y provoca disminuciones en la capacidad generadora de fuerza del músculo. Sin embargo, otras dos vías proteolíticas, la vía dependiente de Ca^{2+} (a través de calpaínas) y la vía lisosomal (a través de catepsinas B+L), se han asociado con la atrofia muscular y se han implicado en la proteólisis inicial de las proteínas miofibrilares (Tidball, J.G. and Spencer, M.J. J Physiol (Lond) 2002 545: 819-828; Tischler et al. Metabolism 1990 39: 756-763), aunque la función de estas vías en la pérdida de la proteína muscular aún no está clara (Ikemoto et al. Faseb J 2001 15: 1279-1281). Sin embargo, las ratas alimentadas con una dieta de aislado de proteína de soja del 20% resultaron tener una actividad de calpastatina significativamente más elevada en el músculo gastronemio que las ratas alimentadas con una dieta de caseína (Nikawa et al. Nutrition 2002 18: 490-495, 2002). Por ello, se aconsejan las dietas con proteína de soja para evitar la degradación de proteína inducida por el ejercicio en el músculo esquelético, la posible inhibición de la proteólisis mediada por calpaína (Nikawa et al. Nutrition 2002 18: 490-495, 2002.). También se han sugerido los estudios que investigan el efecto del aislado de la proteína de soja en la atrofia muscular causado por la suspensión hipocinesia para indicar que el asilado de proteína de soja produce una reducción en la proteólisis de la proteína miofibrilar en los músculos esqueléticos a través de actividades reductoras de calpaína y proteosoma, en consecuencia, para mejorar la atrofia muscular (Tada, O. y Yokogoshi, H. J Nutritional Science Vitaminology (Tokyo) 48:115-119,2002).

De manera alternativa, trabajos recientes han sugerido que las cascadas de proteasa de serina pueden proporcionar un mecanismo para la iniciación de la degradación proteica conduciendo a la atrofia muscular (Sangorin et al. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2002 131: 713-723; Stevenson et al. J Physiol (Lond): 2003 2003.044701).

Sin embargo, hasta la fecha, no hay tratamientos farmacológicos orales conocidos para la atrofia por desuso y la estimulación eléctrica para mantener el tono muscular sigue siendo el método primario utilizado para inhibir la pérdida de músculo durante largos periodos de inactividad.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad degenerativa que conduce a la atrofia y a la debilitación muscular progresiva. La enfermedad resulta de mutaciones en el gen que codifica la proteína distrofina del citoesqueleto. La distrofina se asocia con un gran complejo de proteínas ligadas a la membrana, junto el complejo de

distrofina-glicoproteína (DGC), que se considera necesaria para la estabilidad normal de la membrana celular del músculo. La pérdida de distrofina y el DGC asociado, resulta en la integridad estructural comprometida de la membrana del plasma muscular que produce ciclos dañinos de necrosis muscular y regeneración.

5 Para evitar la DMD, será posiblemente necesario sustituir terapéuticamente o bien la propia distrofina o cualquier otra proteína capaz de restaurar la función adecuada del músculo. Sin embargo, otras terapias pueden mejorar enormemente la calidad de vida y reducir la gravedad de la enfermedad, mientras se superan las dificultades de sustitución de la proteína.

10 Se sugiere que la pérdida de la integridad de la membrana de los músculos en pacientes con DMD resulta en un influjo aumentado de calcio extracelular, conduciendo a una activación de las vías de degradación de la proteína y la estimulación de procesos inflamatorios. Por ello, se han realizado varios intentos para reducir la activación de la vía de la degradación de la proteína y/o inhibir la estimulación de la respuesta inflamatoria.

15 Por ejemplo, se ha mostrado una correlación entre la proteasa dependiente de calcio o la actividad de calpaína y el músculo distrófico y la necrosis muscular. La sobreexpresión del transgen de calpastatina, un inhibidor endógeno específico de calpaínas ha demostrado reducir la patología distrófica en ratones mdx, un modelo murino de la distrofia muscular Duchenne (Spencer, M.J. and Mellgren, R.L. Human Molecular Genetics 2002 11(21):2645-55). La administración de la leupina inhibidora de calpaína también se ha correlacionado con la retención del tamaño de miofibra en el modelo murino mdx. (Badalamente, M.A. and Stracher, A. Muscle & Nerve 2000 23(1):106-11).

20 Una proteasa similar a la tripsina, como la distripsina también ha resultado ser notablemente activada en la fracción microsomal del músculo inmediatamente antes del comienzo de signos clínicos en ratones mdx. El mesilato de camostatato, un inhibidor de bajo peso molecular de proteasas similares a la tripsina, incluyendo la distripsina, se ha sugerido como un fármaco candidato para la distrofia muscular de Duchenne (Sawada et al. Biological & Pharmaceutical Bulletin 2003 26(7):1025-7). La inyecciones directas de un estabilizador de mastocitos, cromolina, han demostrado incrementar la fuerza en los ratones mdx ejercitados (Granchelli et al., Res. Commun. in Mol. Pathol. and Pharm. 1996 91 (3): 287-96).

25 Además, el complemento dietario con extracto de té verde, un antioxidante, se mostró que reducía la necrosis y reducir el estrés oxidativo en miotubos C2C12 para ratones mdx y ratones cultivados, respectivamente. (Buetler et al. American J. of Clin. Nutrition 2002 75(4):749-53).

30 Base de datos BIOSIS [Online] Biosciences Information Service, Philadelphia, PA, US; March 2003 (2003-03), Morris, Cari A et al: Número de acceso a la base de datos PREV200300401641, muestra los efectos del Inhibidor de Bowman-Birk sobre la atrofia por desuso utilizando ratones no cargados por las extremidades traseras.

Base de datos MEDLINE [Online] US National Library of Medicine (NLM), Bethesda, MD, US; February 1986 (1986-02), Tsuji S et al: Número de acceso a la base de datos NLM3711932 muestra los efectos del dipéptido inhibidor de la proteasa bestatina en la distrofia muscular murina.

35 Base de datos MEDLINE [Online] US National Library of Medicine (NLM), Bethesda, MD, US; Julio 1992 (1992-07), Satoyoshi E: Número de acceso a la base de datos NLM1450492 muestra los efectos de los inhibidores de la proteasa bestatina y loxistatina en modelos murinos y hámster y la falta de un efecto en los ensayos sobre humanos.

Hoffman P et al. Trends in Pharmacological Sciences, GB, vol. 22, no. 9,1 Septiembre 2001 (2001-09-01), páginas 465-470, comenta la psicología y los acercamientos terapéuticos potenciales para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

40 Actualmente, el único tratamiento establecido para la distrofia muscular, sin embargo, es el uso de esteroides como prednisona y deflazacort. Estos tratamientos reducen la pérdida de músculo solo ligeramente y producen efectos colaterales significativos.

Resumen de la invención

45 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una composición que incluye el Inhibidor de Bowman-Birk o uno de sus derivados en la fabricación de un medicamento para administrarlo a un sujeto que sufra de una enfermedad o trastorno muscular esquelético degenerativo para mejorar la función muscular esquelética en dicho sujeto o para aliviar los síntomas o reducir la progresión de la enfermedad en dicho sujeto.

50 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para su utilización en el tratamiento de una enfermedad o trastorno del músculo esquelético, la composición incluye el Inhibidor de Bowman-Birk o uno de sus derivados.

El tratamiento de una enfermedad o trastorno degenerativos del músculo esquelético puede mejorar la función del músculo esquelético.

Preferentemente, el medicamento/composición se formula por medio de una administración oral.

Preferentemente, el medicamento/composición se formula para la administración como un complemento de la dieta.

Preferentemente, la composición incluye el Concentrado del Inhibidor de Bowman-Birk.

Preferentemente, la función del músculo esquelético mejorada incluye la fuerza incrementada del músculo o una masa muscular incrementada.

- 5 Preferentemente, la enfermedad o trastorno degenerativos del músculo esquelético es la distrofia muscular, la esclerosis lateral amiotrófica, la atrofia del músculo espinal o lesión de la médula espinal.

En este documento se describe un método para el tratamiento o prevención de la atrofia del músculo esquelético en un sujeto que incluye la administración al mismo de una composición que incluya un inhibidor de Bowman-Birk o uno de sus derivados.

- 10 En este documento se describe un método para el tratamiento o prevención de la atrofia del músculo esquelético en un sujeto que incluye la administración al sujeto de una composición que incluya un inhibidor de Bowman-Birk o uno de sus derivados. En este documento se describe un método para el tratamiento o prevención de la atrofia del músculo esquelético en un sujeto que incluye administrar al sujeto una composición que incluya un inhibidor de Bowman-Birk o uno de sus derivados.

- 15 En el presente documento también se describe un método para aliviar los síntomas o reducir la progresión de la enfermedad en un sujeto que sufra una enfermedad o trastorno degenerativo del músculo esquelético, incluyendo, pero no limitándose a, la distrofia muscular, la esclerosis lateral amiotrófica, atrofia del músculo espinal y la lesión en la médula espinal, que incluye administrar al sujeto una composición que incluya un Inhibidor de Bowman-Birk o uno de sus derivados.

20 Descripción detallada de la invención

- Aunque se ha conseguido el progreso que identifica los elementos clave asociados con los cambios en el músculo esquelético en la señalización de crecimiento (Bodine et al. Nat Cell Biol 2001 3: 1014-1019; Hunter et al. Faseb J 2002 16: 529-538; Mitchell, P.O. and Pavlath, G.K. Am J Physiol Cell Physiol 2001 281: C1706-1715), la apoptosis (Alien et al. Am J Physiol 1997 273:C579-587; Alien et al. Muscle Nerve 1999 22:1350-1360), y la degradación de la proteína (Taillandier et al. Biochem J 1996 316: 65-72; Solomon, V, and Goldberg, A.L. J Biol Chem 1996 271: 26690-26697; Ikemoto et al. Faseb J 2001 15:1279-1281), ha habido un acceso limitado a la hora de atenuar la respuesta global a la atrofia, principalmente la pérdida de fuerza y masa muscular. La disección de estas vías no ha definido completamente todos los elementos exigidos para mantener la masa muscular ni ha identificado si un "cuadro de atrofia" común está activado por distintas perturbaciones (como la denervación, el hambre, la descarga, la inmovilización, la caquexia y los vuelos espaciales) en vuelos espaciales para producir la respuesta atrofica. Además, las manipulaciones genéticas que han resultado exitosas a la hora de mantener la masa muscular ya no se traducen en estrategias terapéuticas.

- Aunque aún se desconocen los detalles específicos, está emergiendo un patrón que sugiere que descargar los "sensores de carga" del músculo activa inmediatamente los factores pro-apoptóticos dentro del músculo para reducir el número de dominios mionucleares (Alien et al. J Appl Physiol 1997 83:1857-1861; Alien et al. Muscle Nerve 1999 22:1350-1360). La reducción en la síntesis de la proteína procede a continuación debido al número reducido de núcleos (Alien et al. J Appl Physiol 1997 83: 1857-1861; Alien et al. Muscle Nerve 1999 22: 1350-1360) y velocidades reducidas de traslación (Bodine et al. Nat Cell Biol 2001 3:1014-1019; Hornberger et al. Am J Physiol Cell Physiol 281: C179-187,2001). Al mismo tiempo, la activación proteasas conocidas y desconocidas inician el proceso de eliminar las proteínas en exceso de las células del músculo. Por tanto, se cree que la terapia contra la pérdida de masa muscular funcional exige centrarse en cada una de estas tres vías; apoptosis, síntesis de crecimiento/proteína y degradación de la proteína.

- El Inhibidor de Bowman-Birk (BBI) es un inhibidor de la proteasa dietética bien caracterizado, con un peso molecular de aproximadamente 8000 Da y la capacidad para inhibir la actividad de numerosas proteasas, como la quimotripsina, tripsina, catpsina G, elastasa y quimasa (Birk Y. Int J Pept Protein Res 1985 25: 113-131; Larionova et al. Biokhimiya 1993 58:1437-1444; Ware et al. Archives of Biochemistry and Biophysics 1997 344:133138). BBI está siendo evaluado como un agente anticancerígeno en ensayos sobre humanos en la forma de un extracto de soja, el Concentrado del Inhibidor de Bowman-Birk (BBIC) (revisado en (Kennedy AR. Pharmacology Therapy 1998 78: 167-209). No se han observado efectos adversos después de la inhibición de la actividad de la proteasa asociada con las dosis de BBI evaluado en estudios en animales (revisado en Kennedy AR. Pharmacology Therapy 1998 78: 167-209; Kennedy AR. Overview: Anticarcinogenic activity of protease inhibitors. In: Protease Inhibitors as Cancer Chemo preventive Agents, editado por Troll W and Kennedy AR. New York: New York: Plenum Publishing Corp., 1993, p. 9-64). En su lugar, los animales mantenidos con BBIC dietético del 1.0% durante toda su vida no tuvieron anomalías de crecimiento y demostraron tener una significativa ampliación de su vida (Kennedy et al. Nutr Cancer 1993 19:281.-302). La pérdida de peso se redujo en animales con leucemia mantenidos con una dieta de BBIC, sugiriendo que el BBI/BBIC puede reducir la atrofia muscular que se produce durante la caquexia por cáncer (Kennedy AR. Overview: Anticarcinogenic activity of protease inhibitors. In: Protease Inhibitors as Cancer Chemo preventive Agents, editado por Troll W and Kennedy AR. New York: New York: Plenum Publishing Corp., 1993, p. 9-64). BBI ha demostrado inhibir la actividad proteolítica en el pulmón, riñón y tejido del hígado después de las inyecciones intraperitoneales en ratones (Oreffo et al. Toxicología 69:

165-176,1991). Aproximadamente el 50% del BBI consumido es capaz de alcanzar el colon de una manera activa y sube al torrente sanguíneo para su distribución por todo el cuerpo (Billings et al. Cancer Lett 1992 62: 191-197; Yavelow et al. Proc Natl Acad Sci U S A 1985 82: 5395-5399). Por tanto, el BBI ha demostrado ser capaz de introducirse en tejidos y mantener una función inhibidora significativa.

5 Ahora se ha encontrado que el BBI bloquea la pérdida de la masa funcional del músculo esquelético durante los periodos de desuso. Tal y como aquí se muestra, la adición del Concentrado del Inhibidor de Bowman-Birk (BBIC) en la dieta demostró atenuar de forma significativa la atrofia del músculo esquelético después de periodos de descarga por las extremidades traseras. Los resultados son indicativos de una composición que incluye BBI o uno de sus derivados demostrando una terapia útil para reducir la atrofia del músculo esquelético que surge del desuso. Además, ahora se ha
10 demostrado que la administración del BBIC produce una mejora funcional de los músculos distróficos en ratones mdx, indicando, por tanto, la utilidad adicional de las composiciones que incluyen BBI en el tratamiento de trastornos degenerativos del músculo, incluyendo, pero no limitándose a, la distrofia muscular, la esclerosis lateral amiotrófica, la atrofia del músculo espinal y lesiones en la médula espinal.

15 La habilidad de una composición que incluye el BBI para inhibir la progresión de la atrofia muscular asociada con el desuso quedó demostrada en ratones mediante la medición de un número de parámetros fisiológicos conocidos para cambiar durante la descarga del músculo. Los resultados obtenidos en animales suspendidos y no suspendidos con tratamiento de BBIC se compararon frente a aquéllos alimentados con aBBIC (BBIC autoclave para elimina la actividad inhibidora) o de manera habitual. Para cada experimento, los ratones alimentados con uno de estos tres tipos de alimentos fueron sometidos a la descarga de las extremidades traseras o utilizadas como controles no suspendidos.

20 En los experimentos iniciales, se utilizaron ratones de tres meses para demostrar la capacidad de la alimentación alimentos complementados con BBIC para reducir la cantidad de atrofia muscular asociada con la descarga de las extremidades traseras. Para este experimento, a los ratones que se les dio una alimentación con BBIC o aBBIC fueron suspendidos durante 14 días. Después de la suspensión, se diseccionaron los músculos y se midió la fuerza. La fuerza tetánica fue superior en los animales alimentados con BBIC que en los animales alimentados con aBBIC (130.7 ± 22.0 mN Vs. 96.9 ± 12.4 mN, respectivamente ($n=2$ para cada grupo). La fuerza específica media, medida en la tensión por gramo de peso muscular, también fue más alta en los animales alimentados con BBIC (19.2 ± 4.0 kN/g) que en los
25 animales tratados con aBBIC (16.7 ± 2.8 kN/g). Sin embargo, el peso muscular de los ratones alimentados con BBIC (6.8 ± 0.6 mg; $n = 4$) fue significativamente mayor ($p<0.05$) que el peso muscular de los ratones alimentados con aBBIC (5.8 ± 0.4 mg; $n = 4$). La atrofia porcentual de los ratones alimentados con aBBIC fue de $45.3 \pm 3.1\%$, mientras que el
30 peso muscular de los ratones alimentados con BBIC sólo disminuyó en un $33.3 \pm 2.9\%$.

Como se observó un incremento en el peso muscular de los ratones alimentados con BBIC, se realizó un estudio más amplio utilizando ratones de seis meses.

35 En estos experimentos, los pesos corporales de los ratones suspendidos y no suspendidos se midieron antes de y después del periodo experimental. Los ratones no suspendidos en cada grupo mostraron ligeros aumentos en el peso corporal, que variaban de ~2-5% durante 14 días. El peso corporal de los animales suspendidos BBIC (BBIC+HS) y aBBIC (aBBIC+HS) durante 14 días de suspensión de las extremidades traseras cayó una media de $10.0 \pm 7.6\%$ y $11.6 \pm 5.1\%$, respectivamente. Los animales suspendidos con una alimentación controlada (Ctrl+HS) perdieron $5.0 \pm 2.3\%$ a lo largo de 14 días de suspensión. Esta horquilla de disminución de la masa corporal se ha publicado anteriormente en distintos estudios (ver referencias en D.B. and Booth, F.W. J Appl Physiol 1990 68:1-12) y se ha sugerido que se debe a
40 la reducción en la ingesta total de alimentos y una reducción en el aumento de peso por gramo de alimento ingerido (Morey ER. Bioscience 29: 168-172, 1979).

Como los alimentos contenían la composición de BBI activa, la ingesta de alimentos se midió para los animales con los alimentos complementados con BBIC y aBBIC. La cantidad de alimentos consumidos fue similar a los ratones no suspendidos alimentados con BBIC (3.1 ± 0.6 gramos/día), no suspendidos alimentados con aBBIC (3.2 ± 0.2 gramos/día) y los aBBIC+HS (3.1 ± 0.4 gramos/día).
45

Sin embargo, aunque no es estadísticamente significativo, el BBIC+HS hacía una media de 0.5 gramos de alimento por día menos (2.7 ± 0.5 gramos/día) que los tres otros grupos.

50 Para determinar si BBIC fue capaz de atenuar la pérdida muscular durante la atrofia por desuso, los animales con una alimentación controlada o complementada con BBIC fueron suspendidos durante 3, 7 o 14 días. Los suplementos dietéticos con BBIC resultó que atenuaba la pérdida de masa muscular en cada punto de tiempo con importantes reducciones en la pérdida muscular observada después de 7 días y 14 días ($p<0.05$). Después de 7 descarga en extremidades posteriores, la masa muscular de los animales BBIC+HS fue de 8.6 ± 0.4 mg ($n = 4$), en comparación con 7.2 ± 0.3 mg ($n = 4$) para los animales Ctrl + HS. Después de la suspensión 14 días, el promedio de peso del músculo
55 soleo de animales BBIC+HS, 7.8 ± 0.2 mg ($n = 7$), fue significativamente superior que el de los animales aBBIC+HS (7.1 ± 0.2 mg ($n = 6$; $p = 0.02$)) y Ctrl+HS (6.4 ± 0.4 mg ($n = 6$; $p < 0.01$)). Los pesos musculares de los ratones aBBIC+HS fueron superiores a los de los ratones Ctrl+HS, pero no se determinó ninguna diferencia significativa. Los pesos musculares de los animales no suspendidos fueron los mismos. Los pesos musculares para los grupos no suspendidos alimentados con aBBIC y los no suspendidos alimentados con BBIC fueron 10.5 ± 0.6 mg ($n=6$), 10.9 ± 0.4 mg ($n=6$), y 10.6 ± 0.5 mg ($n=6$) respectivamente. La suma de BBIC no produce ninguna hipertrofia observable en el músculo no

suspendido. Los pesos musculares de los animales Ctrl+HS y aBBIC+HS disminuyó en $39 \pm 5\%$ y $35 \pm 3\%$, cuando se compararon con los ratones no suspendidos alimentados con aBBIC y no suspendidos alimentados con control respectivamente. La atrofia porcentual de los animales BBIC+HS se limitó a $26 \pm 4\%$, atenuando la pérdida de masa en 25-30% comparados con los otros grupos experimentales.

5 También se determinaron las diferencias en los pesos musculares individuales relativos al peso corporal de los ratones individuales. El peso muscular se dividió por el peso corporal del mismo ratón y el resultado medio para todos los ratones en el mismo grupo.

10 El ratio peso muscular/peso corporal descendió de 0.0323 ± 0.020 mg/gramos a 0.289 ± 0.005 mg/gramo para los ratones alimentados con BBIC y de 0.341 ± 0.038 mg/gramos a 0.274 ± 0.006 para los ratones alimentados con aBBIC. El ratio peso muscular de ratones alimentados con control/peso corporal descendió de 0.327 ± 0.016 mg/gramos a 0.256 ± 0.011 mg/gramos. Por tanto, la atrofia muscular en los animales alimentados con BBIC ($11 \pm 1\%$) se redujo en aproximadamente un 45-50% cuando se comparó con animales alimentados con aBBIC ($20 \pm 3\%$) y animales alimentados con control ($22 \pm 2\%$).

15 El promedio de fibras por músculo fue similar para todos los grupos, sugiriendo que la suspensión por las extremidades traseras no induce la eliminación de fibras musculares individuales. Por ello, el área de las fibras musculares individuales se midió en secciones transversales. Un simple método para determinar si existe cualquier cambio en el tamaño de la fibra sirve para cuantificar el número de fibras en un campo de alta potencia (objetivo de 40X). El tamaño incrementado de la fibra reduce el número de fibras el campo de visión, es decir, cuanto más pequeñas sean las fibras musculares, mayor será el número de fibras. Utilizando este método, el número medio de fibras para animales BBIC+HS fue de 61.0 ± 5.6 ($n = 5$) fibras por campo de alta potencia, mientras que el grupo aBBIC+HS hacía una media de 76.5 ± 2.5 ($n = 4$), representando una diferencia significativa entre los dos grupos ($p < 0.05$). Ambos grupos no suspendidos fueron similares, con una media de 40.0 ± 1.5 ($n = 4$) y 41.0 ± 1.0 ($n = 5$) para ratones no suspendidos alimentados con BBIC y ratones alimentados con aBBIC, respectivamente. La suspensión de las extremidades traseras redujo el tamaño de las fibras musculares tanto en los animales BBIC como los aBBIC, como se esperaba.

25 Las secciones transversales del músculo teñido con laminina se analizaron para medir directamente el área de la fibra. El área de la fibra media fue significativamente elevado después del tratamiento con BBIC ($p < 0.01$) en comparación con las secciones aBBIC + HS. El área de la fibra de los músculos BBIC+HS fue $668 \pm 11 \mu\text{m}^2$ (promedio $\pm$ SE; $n = 458$), mientras que los músculos aBBIC+HS disminuyeron en el área fibrosa a $596 \pm 10 \mu\text{m}^2$ (promedio $\pm$ SE; $n = 353$). El área media de la fibra fue de $657 \mu\text{m}^2$ para los músculos BBIC suspendidos frente a los $569 \mu\text{m}^2$ para los músculos aBBIC suspendidos. El área de la fibra del grupo no suspendido alimentado con BBIC ($957 \pm 211 \mu\text{m}^2$; medio = $943 \mu\text{m}^2$; $n = 71$) fue similar al grupo no suspendido alimentado con aBBIC ($890 \pm 250 \mu\text{m}^2$; medio = $864 \mu\text{m}^2$; $n = 89$).

Por tanto, la administración de BBIC mejora la atrofia muscular asociada con 14 días de suspensión de las extremidades traseras mediante la reducción del tamaño de la fibra, por tanto, manteniendo la masa global del músculo.

35 Para determinar si el músculo permaneció funcional, las mediciones contráctiles de los músculos soleos tanto de los animales suspendidos como de los no suspendidos se realizó en todos los grupos alimentados. La fuerza tetánica total producida por los músculos BBIC+HS (144.1 ± 4.3 mN; $n = 7$) fue significativamente mayor que el Ctrl+HS (120.9 ± 7.9 mN; $n = 6$), mientras que la tensión producida por los músculos aBBIC (129.7 ± 5.4 mN; $n = 6$) no fue diferente ($p = 0.06$). Los valores de fuerza por gramo son equivalentes para todos los grupos, con los músculos Ctrl+HS, BBIC+HS, y los músculos aBBIC+HS produciendo 18.9 ± 1.9 , 18.0 ± 0.7 , y 18.5 ± 1.3 mN/gramo músculo, respectivamente. Los resultados indican que BBIC está manteniendo la masa muscular funcional y permitiendo una producción de fuerza generalmente mayor por el músculo.

45 Los cambios en el músculo observados en los ratones se correlacionaron con la ingesta de BBIC. Más concretamente, la cantidad de alimentos consumidos a lo largo del periodo experimental de 14 días se determinó frente a los pesos musculares de los ratones individuales. Los resultados indican una correlación positiva entre la cantidad de alimentos BBIC consumidos por día y el peso muscular. El efecto de BBIC en los pesos musculares como una función de la ingesta alimenticia por día se calculó para ser significativamente diferente a cero ($p < 0.05$), mientras no se determinó un efecto significativo en la ingesta de aBBIC ($p = 0.7$). Una nueva evaluación de animales alimentados con BBIC para el subconjunto que consumía > 3.0 gramos/día de alimentos mostraron una fuerte reducción en la cantidad de atrofia con la masa del músculo soleo con una media de 8.2 ± 0.2 mg ($n = 3$). Un análisis similar en los ratones alimentados con aBBIC no indicó dicho cambio con la masa del músculo soleo con una media de 7.2 ± 0.2 mg ($n = 4$). Además, no hubo una diferencia significativa ($p = 0.4$) en el ratio músculo/peso muscular entre los animales no suspendidos alimentados con BBIC y los BBIC+HS que consumieron más de 3.0 gramos por día. Esto indicaba que el consumo incrementado de BBIC redujo el grado de atrofia muscular a niveles insignificantes. Mientras que los pesos musculares absolutos fueron significativamente más bajos en los animales BBIC+HS que en los ratones no suspendidos alimentados con BBIC, la atrofia porcentual, en términos de ratio músculo/peso corporal, se redujo de $19.4 \pm 1.8\%$ en los ratones alimentados con aBBIC a $7.2 \pm 0.6\%$ ($n = 3$) en los ratones alimentados con BBIC. Estos resultados indicaron que la cantidad de alimentos, o más concretamente, la cantidad de BBIC, consumidos, es importante a la hora de reducir la cantidad de atrofia muscular asociada con la descarga de las extremidades traseras.

- En experimentos adicionales, se insertaron bombas osmóticas para la liberación directa de BBIC o aBBIC a ratones de seis meses de edad. Cada animal tenía una bomba osmótica Alzet (Alza, Palo Alto, CA) que contenía o bien BBIC (10% w/v) o BBIC autoclave (10% w/v) insertada quirúrgicamente en la parte anterior de la espalda, directamente bajo la piel. Las bombas liberan la solución constantemente a lo largo de un periodo de dos semanas a una velocidad de 0.5 μ l/hr.
- De nuevo, los pesos musculares de los ratones tratados con BBIC (8.1 ± 0.1 mg, 22% atrofia; $n = 4$), fueron superiores a los pesos musculares de los pesos musculares de los aBBIC (7.4 ± 0.7 mg, 31% atrofia; $n = 4$), aunque la diferencia observada entre los grupos de tratamiento no fue significativa para fines estadísticos. El mantenimiento de la masa muscular por BBIC una vez más resultó en aproximadamente una mejora del 30% en el peso muscular después de la suspensión durante 14 días.
- Los experimentos también se realizaron en ratones mdx, un modelo murino para la distrofia muscular de Duchenne.
- En estos experimentos, el tratamiento de ratones mdx masculinos con una composición que incluye BBI, específicamente suplementados con alimentos con BBIC 1.0%, se inició a las cuatro semanas de edad y continuó durante 12 semanas. Los pesos de los animales fueron monitorizados y registrados cada semana. No se observó ninguna diferencia en los incrementos de peso corporal entre los ratones mdx controlados y los que se tuvieron un complemento alimenticio con BBIC 1.0%. Además, como control adicional, los ratones de tipo salvaje C57BL/6 tuvieron un complemento alimenticio con BBIC al 1% para determinar si el BBIC indujo algún cambio en el tamaño o función del músculo no distrófico. Después de seis semanas de alimentación con BBIC 1.0% no hubo cambios ni en la masa muscular ni en la fuerza cuando se comparó con los animales en los ratones silvestres C57BL/6 que no recibían la dieta complementada con BBIC.
- El diafragma de ratones mdx muestra una fibrosis considerable a los 4 meses de edad que puede observarse utilizando la tinción rutinaria de hematoxilina-eosina (H & E). Una mayor diferenciación del tejido fibrotico de las células musculares pueden conseguirse utilizando el método tricómico que tiñe de rojo el tejido muscular y tiñe de azul oscuro el tejido fibrótico y el conectivo. Se descubrió que la alimentación con BBIC al 1.0% mejoraba notablemente la apariencia de los diafragmas de los ratones mdx teñidos utilizando H&E y el método tricómico tal y como se comparó para controlar los ratones mdx.
- Además, las fibras musculares del ratón mdx se someten a pronunciados ciclos de degeneración/regeneración que comenzó aproximadamente a las 4 semanas de edad. La regeneración de las fibras musculares exige la activación y la fusión de células satélite que aparecen en el centro de las fibras regeneradoras. Además, una medición de las fibras musculares regeneradoras es la presencia de fibras musculares nucleadas centrales (CNF) con una proporción incrementada de CNFs que representan la regeneración incrementada. Las secciones musculares se tiñeron con laminina para destacar las fibras musculares y los núcleos se tiñeron con la tinción nuclear 4,6-diamino-2-fenilindol. Para cada músculo, el número de CNFs se determinó como una proporción del número de fibras totales con un total de 2-4 músculos utilizados para cada medición. Una reducción significativa en la proporción de CNFS en los músculos tibialis anterior se observó siguiendo el tratamiento BBIC ($p < 0.05$, $n = 3$ para control, $n = 4$ para los alimentados con BBIC). Las reducciones significativas en los ratones tratados con BBIC se observaron en el EDL y los músculos del diafragma ($p = 0.064$ y $p = 0.058$, respectivamente). Sin embargo, como una muestra de mayor tamaño para el tibial anterior produjo resultados significativos, se prevé que de igual forma el aumento del número de animales va a producir una diferencia significativa tanto en la EDL y músculos del diafragma (actualmente, se utilizó un colorante azul de Evan para determinar la integridad de la membrana de los ratones mdx no tratados y los BBIC tratados. Veinticuatro horas antes del sacrificio, a los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal el colorante azul de Evan. Los músculos se seccionaron, se fijaron y se observaron bajo un microscopio fluorescente para determinar el grado del daño en la membrana. Se observaron zonas incrementadas de infiltración en los músculos cuádriceps de un animal mdx no tratado. Los músculos del diafragma de ambos grupos parecieron tener una ingesta limitada de EBD.
- Cuando se comparó con los animales no distróficos, los músculos EDL de los ratones mdx habían incrementado la masa y la zona transversal. Sin embargo, el incremento en la masa no se correlacionó con una mejora en la fuerza por zona transversal (fuerza específica), en su lugar hay un descenso significativo en la fuerza específica de los músculos mdx. El complemento con BBIC al 1.0% incrementó de forma significativa la masa muscular, la fuerza absoluta, y la zona transversal, mientras se mantenía la fuerza específica ($p < 0.05$; $n > 5$ para cada medición). Estos resultados indican que la mejora en la fuerza se obtiene a través de la alimentación BBIC. Aunque la fuerza específica es inalterable, la masa muscular incrementada y la fuerza absoluta proporcionan al animal una capacidad mayor para realizar las tareas diarias. La masa muscular incrementada no se debe simplemente a un incremento global en el peso corporal, ya que hay un incremento significativo en el ratio peso muscular/peso corporal.
- Por ello, tal y como se demostró en cada uno de los ensayos descritos anteriormente, hay mejoras significativas en múltiples mediciones funcionales y morfológicas del músculo esquelético después de doce semanas de consumo de BBIC por ratones de este modelo murino para la distrofia muscular de Duchenne.
- En consecuencia, la presente invención proporciona una composición que incluye un Inhibidor de Bowman-Birk (BBI) o uno de sus derivados para utilizarlo en el tratamiento y/o prevención de la atrofia del músculo esquelético. En una realización, la composición administrada incluye el Concentrado del Inhibidor de Bowman Birk. Aunque diversas vías de administración han demostrado ser eficaces para composiciones que comprenden BBI o un derivado del mismo, la vía oral puede ser más idónea, ya que es menos invasiva para un sujeto que recibe el tratamiento. Por ejemplo, se espera

- que la capacidad de prevenir la pérdida de músculo funcional a través del complemento dietético simple con una composición que comprende BBI o un derivado del mismo conduzca a una mejora en la calidad de vida para la población anciana, recuperación de la velocidad para reposo prolongado en cama o inmovilización de un miembro, e incluso puede proporcionar a los astronautas una mayor capacidad para soportar los viajes espaciales.
- 5 Como también se ha demostrado aquí, la administración de una composición que comprende BBI mejoró la función del músculo esquelético, como se determina por una mayor fortaleza y aumento de la masa muscular, en un modelo murino para un trastorno degenerativo del músculo esquelético. Así, la presente invención también proporciona métodos para la utilización de una composición que comprende el Inhibidor de Bowman-Birk (BBI) o un derivado del mismo para mejorar la función del músculo esquelético.
- 10 En una realización de este método, la composición administrada incluye el Concentrado del Inhibidor de Bowman Birk. Aunque diversas vías de administración han demostrado ser eficaces para composiciones que comprenden BBI o un derivado del mismo, la vía oral puede ser más idónea, ya que es menos invasiva para un sujeto que recibe el tratamiento
- 15 Además, la presente invención proporciona medios para aliviar los síntomas y/o retardar la progresión de enfermedades o trastornos degenerativos del músculo esquelético. Como se ha demostrado en este documento, el tratamiento con una composición que comprende BBI produjo una mejora significativa en la función del músculo esquelético en un modelo murino para la enfermedad degenerativa del músculo esquelético: la distrofia muscular de Duchenne. Estos resultados son indicativos del tratamiento con una composición que comprende BBI o uno de sus derivados que resulta útil en el alivio de los síntomas o retarda la progresión de cualquier trastorno degenerativo del músculo esquelético en donde la degeneración del músculo se refiere a cambios en la síntesis de proteínas y / o la degradación de proteínas. En una
- 20 realización de este método, la composición administrada incluye el Concentrado del Inhibidor de Bowman Birk. Aunque diversas vías de administración han demostrado ser eficaces para composiciones que comprenden BBI o un derivado del mismo, la vía oral puede ser más idónea, ya que es menos invasiva para un sujeto que recibe el tratamiento.
- 25 Para los fines de la presente invención, por "aliviar síntomas" se entiende que cualquier mialgia, miositis, miotonía y/o pérdida de la fuerza muscular asociada con la degeneración del músculo esquelético se reduce mediante el tratamiento con una composición que comprende BBI o un derivado del mismo.
- Por la frase "desaceleración de la progresión" se entiende que el desgaste muscular y/o la pérdida de la fuerza muscular asociada con la degeneración del músculo esquelético que ocurre menos rápidamente tras el tratamiento con una composición que comprende BBI o un derivado del mismo.
- 30 Por "BBI o derivado del mismo" se entiende que incluye cualquier Inhibidor de Bowman Birk o producto del Inhibidor de Bowman Birk, incluyendo, pero no limitándose a, BBI preparado mediante métodos conocidos en la materia, concentrados de BBI preparados de acuerdo con los métodos conocidos en la materia, pero no limitándose a los que se muestran en la Patente de EE.UU. 5.217.717 y cualesquiera compuestos derivados sintéticamente que imitan las actividades biológicas, y en particular, la actividad inhibidora de proteasa de serina, del BBI. Por "sintético" se entiende
- 35 que incluye medios recombinantes y químicos para la producción de compuestos. Las composiciones que comprenden BBI o un derivado del mismo se administran en una cantidad eficaz, ya sea como un suplemento dietético profiláctico o farmacéutico.
- El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad que previene la atrofia del músculo esquelético y/o mejora la función del músculo esquelético, determinado por el aumento de la fuerza y/o la masa muscular, y/o alivia los síntomas o retarda la progresión de un trastorno muscular degenerativo. Tal cantidad puede determinarse por los expertos en la materia de acuerdo con métodos conocidos.
- 40 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar por vía parenteral, rectal, tópica, transdérmica o por vía oral, preferiblemente por vía oral. Ejemplos de formulaciones farmacéuticas o profilácticas de suplementos dietéticos incluyen, pero no se limitan a, jarabes, suspensiones, emulsiones, tabletas, cápsulas, pastillas y enjuagues bucales.
- 45 En una realización de la invención, la composición se administra como una formulación líquida que comprende una suspensión o solución de la composición en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable. Vehículos líquidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, etanol, glicerina, disolventes no acuosos tales como polietilenglicoles, aceites o agua con un agente de suspensión, conservantes, aromas o colorantes, o cualquier combinación adecuada de los mismos.
- 50 Otra formulación líquida de una composición que comprende BBI o un derivado del mismo útil en la presente invención es una solución colutoria estable que proporciona tiempo adicional de contacto con las mucosas, es agradable, fácil de administrar y adecuado para la producción en masa a bajo coste. Un sustituto de la saliva proporciona la solución con la viscosidad necesaria para aumentar el tiempo de contacto de las mucosas y la biodisponibilidad, y se ha mostrado para proporcionar una liberación sostenida de muchos compuestos. En una formulación, el producto de Concentrado de BBI (BBIC), un sustituto de la saliva como sorbitol, carboximetilcelulosa, o metilparabeno y agua están incluidos.
- 55

En otra realización, una composición en forma de comprimido se prepara usando cualquier vehículo farmacéutico adecuado utilizado rutinariamente para preparar formulaciones sólidas. Ejemplos de tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, almidón, lactosa, sacarosa y celulosa.

5 Las composiciones en forma de cápsulas se pueden preparar también usando un procedimiento de rutina de encapsulación. Por ejemplo, pellets, gránulos o polvo que contienen una composición que comprende BBI o un derivado del mismo se pueden preparar usando vehículos estándar y luego se envasan en una cápsula de gelatina dura. Alternativamente, una dispersión o suspensión puede prepararse usando cualquier vehículo farmacéutico adecuado (s) y la dispersión o suspensión se introduce en una cápsula de gelatina blanda. Los vehículos farmacéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, gomas acuosas, celulosas, silicatos y aceites.

10 En otra realización, una composición para la administración parenteral se formula como una solución o suspensión. Esta solución o suspensión, generalmente, incluye la composición de la presente invención en un vehículo acuoso estéril o aceite parenteralmente aceptable. Ejemplos de aceites parenteralmente aceptables incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, lecitina, aceites de cacahuete y aceite de sésamo.

15 Alternativamente, la solución puede liofilizarse y a continuación reconstituirse con un disolvente adecuado justo antes de la administración a un sujeto.

Por "sujeto", como se usa aquí se entiende que incluye, pero no se limitan a, cualquier mamífero, incluyendo seres humanos.

Los siguientes ejemplos no limitativos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención.

EJEMPLOS

20 Ejemplo 1: Preparación del Concentrado Inhibidor de Bowman-Birk (BBIC)

BBIC se purificó de acuerdo con los procedimientos descritos por Kennedy et al. (Nutr Cancer 1993 19: 281-302) y Yavelow et al. Proc Natl Acad Sci U S A 1985 82: 5395-5399). Este procedimiento de purificación mantiene la actividad del inhibidor de la quimotripsina, pero reduce el nivel de actividad inhibidora de tripsina, a la vez que los altos niveles de actividad inhibidora de tripsina han demostrado que causan una respuesta de retroalimentación pancreática potencialmente perjudicial en ratas (Kennedy et al. Nutr Cancer 1993 19: 281 -302; Kennedy, A.R. Pharmacology Therapy 1998 78: 167-209). El BBIC lo preparó Central Soya Co. Inc. (Ft. Wayne, IN). El BBIC purificado se utilizó entonces para producir pellets de alimentos para consumo oral para ratones. La dieta utilizada fue la Dieta para Roedores AIN-93G (Bio-Serv, Frenchtown, Nueva Jersey) con los suplementos alimenticios del BBIC al 1.0% o BBIC autoclave al 1.0% (aBBIC) en donde la actividad inhibidora de la proteasa se ha destruido por medio de autoclave. El grupo animal que recibe el aBBIC al 1,0%, sin actividad del inhibidor de quimotripsina, representa un control de la dieta isocalórica para el grupo que recibió BBIC al 1,0%. La comida de ratón estándar, así como el alimento suplementado con BBIC y aBBIC se proporcionaron *ad libitum*. Los cambios fisiológicos observados de los ratones alimentados con BBIC se compararon con los que recibieron la comida estándar para ratones o alimentos suplementados con aBBIC.

Ejemplo 2: Animales

35 Los experimentos en este estudio fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee (Comité Institucional para el Uso y Cuidado Animal) de la Universidad de Pensilvania. Los ratones varones C57/B16 de tres y seis meses de edad fueron utilizados para este estudio y fueron asignados aleatoriamente a uno de los grupos experimentales. Más específicamente, los animales fueron separados aleatoriamente en uno de tres grupos de alimentación; aBBIC BBIC, o de control. Los animales se cambiaron a las dietas experimentales, que contiene 1,0% BBIC, 1,0% aBBIC o sin complemento 5-7 días adicionales antes del comienzo del período experimental. De cada uno de los tres grupos de alimentación, la mitad se colocaron en jaulas individuales para utilizarlos como controles no suspendidos, mientras que los otros se suspendieron por las extremidades traseras en jaulas individuales de suspensión. Por lo tanto, los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los seis grupos: 1.) Con control, no suspendido; 2) con control, suspendidos por las extremidades traseras (Ctrl + HS), 3) No suspendidos alimentados con BBIC; 4) BBIC, suspendidos por las extremidades traseras (BBIC + HS), 5) no suspendido, alimentados con aBBIC-;... y 45 6) aBBIC, suspendidos por las extremidades traseras (aBBIC + HS).

Ejemplo 3: Suspensión de las extremidades traseras

50 A los animales se les suspendió utilizando una técnica modificada de suspensión por la cola de descrito originalmente para las ratas por Morey, ER (1979 Bioscience 29: 168-172) y adaptada aquí para ratones. En estos experimentos, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilazina y se midió el peso corporal. Las colas se limpiaron y se unieron a una cadena de acero inoxidable utilizando una tira de cinta adhesiva (Piel Trac (Zimmer, Warsaw IN)). Los animales fueron suspendidos al unir la cadena a un soporte que se ejecuta en un riel en la parte superior de la jaula que permitió a los ratones moverse libremente alrededor de la jaula evitando al mismo tiempo que las extremidades posteriores tocaran el suelo o las paredes.

55

Ejemplo 4: Mediciones mecánicas del músculo

Después de un periodo de suspensión de 3 -, 7 - o 14-días, tanto los ratones de control suspendidos y no suspendidos fueron anestesiados, se midió su peso corporal y se extrajeron el músculo soleo y el gastrocnemio. Un músculo soleo fue disecado y preparado para las mediciones de fuerza muscular mecánica, de conformidad con los procedimientos descritos por *Barton-Davis et al. J Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 1998 95: 15603-15607). La longitud de reposo (Lo) se estableció mediante el ajuste de la longitud del músculo hasta que se obtuvo la tensión de contracción máxima. La fuerza tetánica máxima se midió mediante la estimulación de los músculos soleos con un pulso de 100 Hz, 500 ms a la tensión supramáxima. Después de las mediciones de la tensión, el músculo se borró, se pesó y luego rápidamente se congeló en isopentano de fusión y se almacenó a -80 ° C para un posterior análisis histológico. El otro músculo soleo que se utilizará para análisis bioquímico, sin ninguna estimulación ex vivo, se pesó y se congeló inmediatamente y se almacenó en nitrógeno líquido. Los músculos gemelos se congelaron también para los análisis bioquímicos.

Ejemplo 5: Análisis estadísticos

La significación estadística se determinó mediante la aplicación de los datos en bruto tanto si era un ensayo en t o un ANOVA de un solo sentido. Los datos se muestran como media $\pm$ SEM a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 6: Determinación del tamaño de la fibra

Las secciones congeladas (10 μ m) se lavaron en PBS y se bloquearon en BSA al 5% en PBS durante 1 hora. Las secciones se incubaron luego en BSA/PBS al 5% que contenía un anticuerpo primario contra laminina (NeoMarkers, Fremont, CA) a una dilución de 1:250. Se utilizó un anticuerpo IgG conjugado con rodamina como un anticuerpo secundario (Jackson Laboratories Immunoresearch) para visualizar la tinción. Las diapositivas fueron montadas con Vectashield (Vector Labs, Burlingame VT) para retardar el fotoblanqueo. Se realizó una microscopía en un microscopio DMR de Leitz. (Leica) y la adquisición y análisis de imágenes se realizó con un sistema de cámara digital MicroMAX (Princeton Instruments, Inc.) y software de imagen (OpenLab, Signal Analytics!).

Ejemplo 7: Experimentos en ratones mdx

Se asignaron al azar ratones mdx de sexo masculino de cuatro semanas de edad a bien un grupo de control, un grupo con complemento alimenticio sin BBIC añadido o un grupo alimentado con BBIC, suministrado con los alimentos suplementados con BBIC al 1%. Todos los alimentos se proporcionaron *ad libitum*. Tras el período experimental de alimentación de 12 semanas los ratones fueron anestesiados, se midió el peso corporal y se extrajeron los músculos. Un músculo extensor digitálico se disecó y se preparó para mediciones de fuerza muscular mecánica, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4. La longitud de reposo (Lo) se estableció mediante el ajuste de la longitud del músculo hasta obtener la tensión de contracción máxima. La fuerza tetánica máxima se midió mediante la estimulación de los músculos con un pulso de 120 Hz, 500 ms a la tensión supramáxima. Después de las mediciones de la tensión, el músculo se borró, se pesó y luego rápidamente se congeló en isopentano de fusión y se almacenó a -80 ° C para el análisis histológico posterior. Los otros músculos se pesaron y se congelaron inmediatamente, bien para el análisis histológico o bioquímico.

Para cada animal, los músculos extensor digitálico largo, el diafragma, los gemelos, el cuádriceps se seccionaron en un criostato y las diapositivas se prepararon para la evaluación histológica estándar utilizando la tinción con hematoxilina-eosina y tricrómica. A varios animales de ambos grupos de control y BBIC se les inyectó un colorante de azul de Evan para observar posibles cambios en la integridad de la membrana. En particular, la noche antes de su sacrificio, a los ratones se les inyectó 0,2 ml de 0,2% de colorante azul de Evan en PBS. El daño de membrana se evaluó mediante la visualización de la fluorescencia azul de Evan en las fibras del diafragma y los músculos del cuádriceps.

La microscopía se realizó en un microscopio Leitz DMR (Leica) y la adquisición de imágenes y análisis se completó con un sistema de cámara digital MicroMAX (Princeton Instruments, Inc.) y software de imagen (OpenLab, Improvision Inc. de Waltham, MA).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una composición que comprende el Inhibidor de Bowman-Birk o un derivado del mismo en la fabricación de un medicamento para su administración a un sujeto que sufre una enfermedad o trastorno degenerativos del músculo esquelético para mejorar la función del músculo esquelético en dicho sujeto o para aliviar los síntomas o retardar la progresión de la enfermedad en dicho sujeto.
2. Utilización según la reivindicación 1, donde se formula el medicamento para administración oral.
3. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en la que se formula el medicamento para la administración como un suplemento dietético.
- 10 4. Utilización de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en donde la composición comprende el concentrado del Inhibidor de Bowman-Birk.
5. Utilización de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en donde la función mejorada del músculo esquelético incluye una fuerza muscular incrementada o aumento de masa muscular.
- 15 6. Utilización de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde la enfermedad o trastorno degenerativo del músculo esquelético es la distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica, la atrofia muscular espinal o lesión de la médula espinal.
7. Una composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno degenerativos del músculo esquelético, la composición que comprende el Inhibidor del Bowman-Birk o un derivado del mismo.
8. Una composición para su uso según la reivindicación 7 en donde se formula la composición para administración oral.
- 20 9. Una composición para su uso según la reivindicación 7 o la reivindicación 8 en donde la composición se formula para administración como un suplemento dietético.
10. Una composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 7 a 9 donde la composición comprende el Concentrado del Inhibidor de Bowman-Birk.
11. Una composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 7 a 10 en donde el tratamiento mejora la función del músculo esquelético que comprende la fuerza muscular o aumento de masa muscular.
- 25 12. Una composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 7 a 11 en el que la enfermedad o trastorno degenerativos del músculo esquelético o de la enfermedad es la distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica, la atrofia muscular espinal o lesión de la médula espinal.