



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 229**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/167** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 31/18** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**A61P 31/10** (2006.01)

**A61P 11/08** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05763090 .7**

96 Fecha de presentación : **28.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1818052**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.08.2007**

54

Título: **Utilización de formoterol en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la pérdida muscular y/o el síndrome caquético que están asociados con los estados catabólicos de determinadas enfermedades, tales como el cáncer, el sida, las infecciones, la diabetes y otras.**

30

Prioridad: **29.06.2004 ES 200401941**

73

Titular/es: **Acacia Pharma Limited  
Harston Mill  
Harston, Cambridgeshire CB22 7GG, GB**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.04.2010**

72

Inventor/es: **Argilés Huguet, José María;  
López Soriano, Francisco Javier y  
Busquets Rius, Sílvia**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.04.2010**

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 336 229 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

Utilización de formoterol en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la pérdida muscular y/o el síndrome caquético que están asociados con los estados catabólicos de determinadas enfermedades, tales como el cáncer, el sida, las infecciones, las diabetes y otras.

La presente invención se refiere al campo de la medicina humana, y específicamente a una nueva utilización de un compuesto destinado al tratamiento de enfermedades o estados particulares en el ser humano.

10 **Antecedentes de la técnica**

Quizá la manifestación más común de la enfermedad maligna avanzada es el desarrollo de caquexia de cáncer. En efecto, la caquexia se produce en la mayoría de pacientes de cáncer, y es responsable de la muerte de 22% de ellos. Además de en el cáncer, la caquexia se produce asociada a otras enfermedades o estados, tales como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), traumatismo o sepsis. Entre las anormalidades asociadas a la caquexia se incluyen anorexia, pérdida de peso, pérdida y atrofia musculares, anemia y alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, de los lípidos y de las proteínas (ver Argilés J.M. *et al.*, "The metabolic basis of cancer cachexia", *Med. Res. Rev.* 17:477-98, 1997). El grado de caquexia está inversamente correlacionado con el tiempo de supervivencia del paciente y siempre implica un pronóstico pobre. Una de las características más relevantes de la caquexia es la astenia (es decir, la falta de fuerza muscular), que refleja la importante pérdida de masa muscular que tiene lugar en el paciente caquético de cáncer. La astenia también se caracteriza por una debilidad general, así como por fatiga física y mental. Además, la reducción de la masa corporal magra es una de las tendencias principales de la caquexia e implica no sólo el músculo esquelético sino que también afecta a las proteínas cardíacas, resultando en importantes alteraciones del comportamiento cardíaco.

Se han propuesto varias estrategias para tratar la caquexia, aunque sólo algunas han alcanzado un nivel clínico con resultados positivos. Sin embargo, la mayoría de ellas han mostrado problemas derivados de su utilización. Entre los fármacos anticaquéticos más ampliamente utilizados se encuentran varios derivados de la progesterona (por ejemplo el acetato de megestrol y la medroxiprogesterona), que pueden mejorar el apetito y la ganancia de peso, aunque el incremento observado de la masa corporal se debe principalmente a una masa grasa y retención de agua incrementados, sin efectos significativos sobre el índice de Kamofsky (una medida del nivel de actividad para los pacientes de cáncer). El canabinoide dronabinol puede mejorar la caquexia en pacientes tanto de cáncer como de SIDA, aunque muchos de ellos experimentan efectos secundarios, tales como euforia, mareo, somnolencia y confusión. Se ha utilizado la insulina como intensificador del apetito (con el fin de mejorar la anorexia), pero se ha demostrado que está asociada a un incremento del peso tumoral. Los corticoesteroides (por ejemplo la dexametasona o la prednisolona), en el caso de que se utilicen en tratamientos prolongados, aparentemente conducen a un estado de debilidad, delirio, osteoporosis e inmunosupresión, y aparentemente no presentan ningún efecto significativo sobre la reducción de la mortalidad. El clenbuterol es otro compuesto que ha demostrado algún efecto anticaquético, pero su toxicidad en el ser humano y en animales (especialmente sus efectos negativos sobre el corazón) no ha permitido la realización de ensayos clínicos (ver Carbó N. *et al.*, "Comparative effects of beta2-adrenergic agonists on muscle waste associated with tumor growth", *Cancer Lett.* 115:113-8, 1997; Hoffman R.J. *et al.*, "Clenbuterol ingestion causing prolonged tachycardia, hypokalemia, and hypophosphatemia with confirmation by quantitative levels", *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 39:339-44, 2001). La utilización de anticuerpos y receptores solubles de citoquinas es un enfoque prometedor para tratar la caquexia, aunque estos tratamientos son excesivamente caros debido a que requieren un número muy grande de moléculas para bloquear por completo la acción de las citoquinas. La utilización de esteroides anabólicos (por ejemplo la nandrolona y la oximetolona) presenta importantes efectos secundarios adversos, tales como la masculinización, la retención de fluidos y la toxicidad hepática. El sulfato de hidrazina ha sido utilizado como fármaco anticaquético, pero presenta algunos problemas derivados de su toxicidad (ver Argilés J.M. *et al.*, "Cancer cachexia: a therapeutic approach", *Med. Res. Rev.* 21:83-101, 2001).

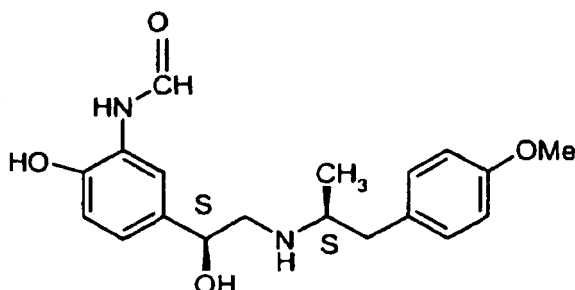
De esta manera, resulta altamente deseable proporcionar nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la caquexia y la pérdida de masa muscular. En particular, resulta deseable disponer de nuevos agentes terapéuticos con una eficiencia anticaquética elevada y consecuencias no tóxicas.

55 **Sumario de la invención**

En el contexto de la presente invención se ha descubierto que el formoterol, utilizado hasta ahora para el tratamiento del broncoespasmo asociado al asma, muestra una potente eficiencia anticaquética con efectos secundarios adversos relativamente reducidos y baja toxicidad.

El formoterol es un compuesto racémico que presenta la fórmula química adjunta (mostrando la estereoquímica relativa de uno de los dos enantiómeros) y es un agonista selectivo para el adrenoceptor  $\beta_2$  altamente potente que combina las ventajas clínicas de un rápido inicio y una duración prolongada de su acción. Este compuesto se utiliza en el ser humano para el tratamiento del broncoespasmo asociado al asma. El formoterol *in vitro* es un potente relajante del músculo liso de las vías respiratorias de eficacia elevada y muy elevada afinidad y selectividad para el adrenoceptor  $\beta_2$ . Además de la relajación del músculo liso de las vías respiratorias, el formoterol inhibe un abanico de procesos inflamatorios agudos en modelos animales, incluyendo la activación e infiltración de eosinófilos en las vías respiratorias, la fuga microvascular y la liberación de mediador inducida por antígeno en los pulmones en el ser humano. Además,

el formoterol relaja el músculo liso bronquial y también proporciona importantes beneficios clínicos en pacientes sintomáticos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). El formoterol, como otros agonistas adrenoceptores  $\beta_2$  de acción prolongada, atenúa la reacción asmática tardía inducida por alérgeno y, bajo determinadas condiciones, presenta más efecto que otros agonistas adrenoceptores  $\beta_2$ , tales como el salbutamol y el salmeterol (ver Linden A. *et al.*, "Salmeterol, formoterol y salbutamol in the isolated guinea pig trachea: differences in maximum relaxant effect and potency but not in functional antagonism", *Thorax* 48:547-53, 1993).



La presente invención se refiere a la utilización del formoterol o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de un solvato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las mismas, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la reducción de la masa muscular y/o del síndrome caquéctico, encontrándose ambos asociados a un estado catabólico en un mamífero, en particular en el ser humano. La expresión "estado catabólico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una situación fisiopatológica en la que se encuentran activadas las rutas catabólicas. Son ejemplos de rutas catabólicas la glucogenolisis hepática, la lipólisis en el tejido adiposo, la proteólisis en el músculo esquelético y la termogénesis. De esta manera, la invención puede utilizarse para el tratamiento de un paciente que sufre de pérdida de masa muscular y/o de síndrome caquéctico, asociados ambos a un estado catabólico en un mamífero, en particular en el ser humano, que comprende la administración de una dosis terapéutica aceptable de formoterol o de sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, conjuntamente con excipientes farmacéuticamente aceptables. En una forma de realización particular, el fumarato de formoterol, sin modificación o en forma de dihidrato, se utiliza para dichas indicaciones terapéuticas.

El formoterol ejerce una acción protectora selectiva potente sobre el corazón y el músculo esquelético mediante el antagonismo de la degradación incrementada de las proteínas que caracteriza la caquexia de cáncer. De esta manera, a la inversa de lo que se observa con otros agonistas  $\beta_2$  que presentan numerosos efectos secundarios y considerable toxicidad en el ser humano, el formoterol es un agente terapéutico conveniente en estados patológicos en los que el hipercatabolismo de las proteínas musculares es una característica crítica, tal como la caquexia de cáncer u otras enfermedades con reducción de la masa muscular.

En las formas de realización particulares de la invención, el formoterol o las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo pueden utilizarse para el tratamiento de la pérdida de masa muscular o del síndrome caquéctico asociado a: cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), sepsis, diabetes, estados de inmovilización, quemaduras severas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, envejecimiento, patologías cardiovasculares, patologías hepáticas, artritis reumatoide, trastornos de la alimentación, acidosis, enfermedades neuromusculares, enfermedad de Alzheimer, hiperadrenocortisolismo, hipertiroidismo, síndrome de Cushing, atrofas y distrofias musculares, colitis ulcerosa, síndrome de fatiga crónica, insuficiencia renal, cirrosis hepática, enfermedad de Crohn y un estado de reducción de la masa muscular debido a ingravidez.

El tratamiento con formoterol presenta un claro efecto protector del músculo esquelético y del corazón en términos de peso de tejido húmedo. Además, el formoterol proporciona una acción trófica significativa sobre los músculos también en no portadores de tumores, particularmente en los gastrocnemios, tibiales, EDL (extensor digital largo) y en el músculo cardíaco, mientras que el sólo no resulta afectado significativamente. Respecto a los tejidos adiposos, el tratamiento de formoterol induce un incremento del peso de tejido adiposo marrón. Además, el tratamiento de formoterol no altera ni el peso de los tumores sólidos ni la cantidad de alimento ingerido.

Dependiendo de las circunstancias, un experto en la materia podrá seleccionar una vía de administración apropiada para el formoterol o las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, tal como la vía oral, nasal, parenteral, subcutánea, tópica, etc. El experto en la materia también podrá seleccionar un sistema de administración adecuado para la vía de administración seleccionada.

Las formas de realización particulares y los dibujos siguientes se proporcionan a título ilustrativo, y no limitativo de la presente invención.

### Descripción de los dibujos

La figura 1 representa la transferencia northern de músculos gastrocnemios procedentes de ratas de control (C), ratas tratadas con formoterol (C+F), ratas portadoras de tumor (hepatoma ascítico Yoshida AH-130) (TB) y ratas

portadoras de tumor tratadas con formoterol (TB+F). La expresión de ARNm de ubiquitina (UB), de subunidad C8 del proteasoma (C8), de m-calpaína (m-cal) y de catepsina B (catB) en músculos gastrocnemios se detectó tras la hibridación con sondas de ADNc. Se utilizó una sonda de ARNr 18S (18S) para la cuantificación total y la corrección de carga. Se sometieron autorradiografías a densitometría de barrido.

La figura 2 representa la apoptosis en músculos tibiales procedentes de ratas de control (C), de ratas tratadas con formoterol (C+F), de ratas portadoras de tumor (hepatoma ascítico Yoshida AH-130) (TB) y de ratas portadoras de tumor tratadas con formoterol (TB+F). Los resultados son medias  $\pm$  SEM para cinco animales en cada grupo. Figuras 2A y 2B: se evaluó la fragmentación del ADN a partir del seguimiento del escalonado de los fragmentos en un gel de agarosa. Se cuantificó el porcentaje de fragmentación del ADN mediante densitometría de barrido. Se utilizaron hígados de ratones tratados con anticuerpo anti-Fas (C+) como control positivo. Figura 2C: se determinó la actividad de caspasa-3 mediante un ensayo colorimétrico; los resultados se expresan en nmoles/hora. Significancia estadística de los resultados (de pruebas t de Student): figura 2A: no tratados frente a F:  $\dagger\dagger p < 0,01$ ; figura 2C: C frente a TB:  $*p < 0,05$ , no tratado frente a F:  $\dagger\dagger\dagger p < 0,001$ .

La figura 3 representa la transferencia northern de músculos gastrocnemios procedentes de ratones de control (C), de ratones tratados con formoterol (C+F), de ratones portadores de tumor (carcinoma pulmonar de Lewis) (TB) y de ratones portadores de tumor tratados con formoterol (TB+F). El procedimiento seguido y las abreviaturas son análogas a las de la figura 1.

### Descripción detallada de las formas de realización particulares

#### *Animales y compuestos bioquímicos*

En los diferentes experimentos se utilizaron ratas Wistar macho (Interfauna, Barcelona, España) que pesaban aproximadamente 110 gramos y ratones C57BI/6 (Criffa, Barcelona, España) de aproximadamente 12 semanas de edad. Los animales se mantuvieron a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  bajo un ciclo regular de luz-oscuridad (luz encendida entre 08:00 y 20:00) y disponían de libre acceso a comida y agua. La dieta (B.K. Universal G.J./S.L., Sant Vicenç dels Horts, Barcelona, España) consistía en 45,5% a 48,5% de carbohidratos (3,5% de glucosa absorbible, 42% a 45% de almidón), 18,5% de proteínas y 3,1% de grasas (el residuo era material no digerible). Se midió diariamente la cantidad de alimento ingerido. Todas las manipulaciones de los animales se realizaron según las directrices de la Comunidad Europea para la utilización de animales de laboratorio. Todos los compuestos bioquímicos eran de grado reactivo y se obtuvieron de Roche S.A. (Barcelona, España) o de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Los compuestos químicos radioactivos se obtuvieron de Amersham Int. (Amersham, Bucks., Reino Unido) y el fumarato de formoterol micronizado, de Industriale Chimica s.r.l. (Saronno, Italia).

#### *Inoculación de tumores y tratamiento*

*Hepatoma ascítico Yoshida AH-130*: es un tumor de rata que crece exponencialmente durante 4 a 5 días y entra en una etapa estacionaria alcanzado el día 7 tras el trasplante. Las ratas se dividieron en dos grupos: controles y huéspedes de tumor. Las últimas recibieron una inoculación intraperitoneal de  $10^8$  células de hepatoma ascítico Yoshida AH-130 obtenidas de tumores exponenciales. Ambos grupos se dividieron adicionalmente en tratadas y no tratadas, recibiendo las primeras la administración de una dosis intraperitoneal (i.p.) diaria de formoterol (2 mg/kg de peso corporal (pc), disuelta en solución fisiológica) y las últimas un volumen correspondiente de solvente. El día 7 después del trasplante de tumores, se pesaron los animales y se anestesiaron con una inyección i.p. de mezcla de quetamina/xilazina (3:1) (Imalgene<sup>®</sup> y Rompun<sup>®</sup>, respectivamente). Se recolectó el tumor de la cavidad peritoneal y se evaluó su volumen y celularidad. Se recogió sangre de la aorta abdominal en tubos heparinizados y se centrifugaron (3.500 xg, 10 minutos,  $4^\circ\text{C}$ ) para obtener el plasma. Se extirparon rápidamente los tejidos, se pesaron y se congelaron en nitrógeno líquido.

En el tratamiento de combinación de formoterol y pentoxifilina, los grupos experimentales fueron los siguientes: ratas de control y ratas portadoras de tumor, dos, cuatro y siete días después de la inoculación de los tumores. Ambos grupos se dividieron adicionalmente en tratadas y no tratadas, recibiendo las primeras la administración de una dosis subcutánea (s.c.) diaria de formoterol (3 mg/kg de peso corporal (pc) y de pentoxifilina (10 mg/kg de peso corporal (pc), disuelta en solución fisiológica), y las últimas con el volumen correspondiente de solvente. Los días dos, cuatro y siete después de la inoculación de los tumores, se sacrificaron los animales.

En el tratamiento con dosis diferentes de formoterol, los grupos experimentales fueron los siguientes: ratas portadoras de tumor sin tratamiento y ratas portadoras de tumor tratadas subcutáneamente con diferentes dosis de formoterol (0,3, 1, 3 y 10 mg/kg de peso corporal). El día siete después de la inoculación de los tumores, se sacrificaron los animales.

En el tratamiento con dosis bajas de formoterol, los grupos experimentales fueron los siguientes: ratas de control y ratas portadoras de tumor, dos, cuatro y siete días después de la inoculación de los tumores. Ambos grupos se dividieron adicionalmente en tratadas y no tratadas, recibiendo las primeras la administración de una dosis subcutánea (s.c.) diaria de formoterol (0,3 mg/kg de peso corporal (pc), disueltos en solución fisiológica) y las últimas el volumen correspondiente de solvente. Los días dos, cuatro y siete después de la inoculación de los tumores, se sacrificaron los animales.

En el tratamiento de la lesión muscular, los grupos experimentales fueron los siguientes: ratas de control, ratas con lesiones musculares provocadas por una inyección aguda de bupivacaína (al 0,5%), ratas con lesiones musculares provocadas por una inyección aguda de bupivacaína (al 0,5%) y que habían sido tratadas con formoterol durante los últimos siete días, ratas con lesiones musculares provocadas por una inyección aguda de bupivacaína (al 0,5%) y que habían sido tratadas con formoterol durante los catorce días. El tratamiento de formoterol fue una dosis subcutánea diaria de formoterol de 0,3 mg/kg de peso corporal disueltos en solución fisiológica.

En todos los experimentos, se extirpó el tumor de la cavidad peritoneal y se evaluó su volumen y celularidad. Se recogió sangre de la aorta abdominal en tubos heparinizados y se centrifugó (3.500 g, 10 minutos, 4°C) para obtener el plasma. Los tejidos se extirparon rápidamente, se pesaron y se congelaron en nitrógeno líquido.

*Carcinoma pulmonar de Lewis*: es un sistema modelo adecuado para estudiar los mecanismos implicados en el establecimiento de la caquexia. Este tumor ha sido descrito como un epidermoide anaplásico de tendencia hemorrágica marcada, que regular, espontánea y consistentemente produce múltiples metástasis pulmonares. Su crecimiento causa en el huésped una rápida y progresiva pérdida de peso corporal y una reducción de la masa de tejido, particularmente del músculo esquelético. Los ratones se dividieron en dos grupos: controles y huéspedes tumorales. Los huéspedes tumorales recibieron una inoculación de  $5 \times 10^5$  células de carcinoma pulmonar de Lewis obtenidas de tumores exponenciales, proporcionada intramuscularmente (muslo izquierdo). El desarrollo de un nódulo en el flanco de la inyección de tamaño creciente hasta 20% del peso del animal se consideró indicativo de la efectividad de la inoculación. Ambos grupos se dividieron adicionalmente en tratadas y no tratadas, recibiendo las primeras la administración, durante los últimos 9 días antes del sacrificio, de una dosis i.p. diaria de formoterol (2 mg/kg p.c., disueltos en solución fisiológica) y las últimas, un volumen correspondiente de solvente. El día 15 después del trasplante tumoral, los animales se pesaron y se anestesiaron con una mezcla de quetamina/xilazina (i.p.) (Imalgene® y Rompun®, respectivamente). Se extirpó el tumor de la pata trasera y se determinó su masa. Se extirparon rápidamente muestras de los tejidos, se pesaron y se congelaron en nitrógeno líquido.

#### *Aislamiento de ARN y análisis de transferencia northern*

Se extrajo el ARN total de músculo EDL utilizando el método de isotiocianato de guanidinio ácido/fenol/cloroformo. Se desnaturalizaron muestras de ARN (20 µg), se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,2% que contenían formaldehído al 6,3% y se transfirieron a membranas Hybond N (Amersham). Se fijó el ARN a la membrana con Genelinker. El ARN en los geles y en los filtros se visualizó con bromuro de etidio y se fotografió mediante transiluminación U.V. para garantizar la integridad del ARN, para comprobar la carga de cantidades equivalentes de ARN y para confirmar que se había producido correctamente la transferencia. El ARN se transfirió en solución salina citrato estándar 20x (SSC, NaCl 0,15 M y citrato sódico 15 mM, pH 7,0). La hibridación se realizó a 65°C durante la noche en el tampón de hibridación (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 M/SDS al 7%/EDTA 1 mM/BSA al 1%/dextrán sulfato al 10%) y se añadieron sondas marcadas desnaturalizadas (10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> cpm/ml). Las sondas marcadas radioactivamente se prepararon mediante el método del cebador aleatorio (Amersham). La sonda ubiquitina utilizada fue un clon de ADNc que contenía 12 pares de la segunda secuencia codificante de ubiquitina más una tercera y una cuarta secuencias codificantes de ubiquitina y 120 pares de bases de la región 3' no traducida del gen UBI de la poliubiquitina de pollo. También se hibridaron las membranas con sondas de ADNc codificantes de C8, C9, enzima conjugante E2, m-calpaína de rata y catepsina B de rata. Los filtros se expusieron a película Hyperfilm-MP (Amersham) a -80°C durante 1 a 4 días y las películas se cuantificaron mediante densitometría de barrido. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante pruebas t de Student.

#### *Determinación de la actividad del proteasoma*

Se determinó la actividad similar a quimotripsina del proteasoma muscular a partir de la evaluación de los cortes en el sustrato fluorogénico específico succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcoumarina (LLVY). Se homogeneizó el músculo gastrocnemio en Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, que contenía EDTA 0,1 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, ATP 5 mM, glicerol al 20% y Triton X-100 al 0,04% (v/v). A continuación, se centrifugaron los homogenados musculares (13.000 g, 15 minutos, 4°C). Se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas utilizando el ensayo BCA (Pierce Chemical Co.). A continuación, se incubaron alícuotas de 40 µg de proteína durante 60 minutos a 37°C en presencia de LLVY 40 µM. El tampón de incubación para la evaluación de la actividad del proteasoma era HEPES 50 mM, pH 8,0, que contenía EGTA 5 mM. Se leyó la fluorescencia con un espectrofluorómetro (longitudes de onda de excitación y de emisión: 380 y 460 nm, respectivamente; espectrofluorofotómetro RF-5001 PC, Shimadzu). La actividad, expresada como nkatales/mg de proteína referidos al reservorio total de proteínas, se calculó mediante la utilización de la amidocoumarina libre como estándar de trabajo. El resultado final es la diferencia entre los nkatales obtenidos en presencia y en ausencia de lactacistina 25 µM, un inhibidor específico del proteasoma.

#### *Ensayos de la apoptosis*

Se llevó a cabo un ensayo de fragmentación del ADN en músculo tibial tal como se ha descrito anteriormente (ver Van Royen M. *et al.*, "DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: a link with cancer cachexia?", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270:533-7, 2000). Se determinó la actividad de caspasa-3 en músculo tibial utilizando el kit de ensayo colorimétrico de caspasa-3 BD ApoAlert™ (BD Biosciences Clontech, USA).

*Análisis de los cambios de movilidad electroforética (EMSA)*

Se aislaron extractos de proteínas nucleares procedentes de músculo tibial tal como se ha informado anteriormente (ver Blough E. *et al.*, "Extraction of nuclear proteins from striated muscle tissue", *Biotechniques* 26:202-4, 1999) y la concentración de proteínas se determinó utilizando el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, USA). Los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia de consenso de NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B), AP-1 (proteína activadora 1) y C/EBP (proteína intensificadora de unión a CCAAT) se marcaron en los extremos utilizando [ $\alpha^{32}$ P]dCTP y enzima Klenow. Los oligonucleótidos de doble cadena marcados en los extremos (30.000 cpm) se incubaron durante 10 minutos en hielo con 150  $\mu$ g de extracto de proteínas nucleares. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l que contenía glicerol al 12%, Hepes 12 mM (pH 7,9), Tris-HCl 4 mM (pH 7,9), EDTA 1 mM (pH 8), ditioneitol (DTT) 1 mM, KCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 40  $\mu$ g/ml de polidI-dC (ácido desoxinosínico-desoxicidílico) e inhibidores de proteasa (PMSF, aprotinina y leupeptina). Al final de la incubación, las muestras mezcladas se sometieron a electroforesis a 4°C a 325 V durante 60 a 80 minutos en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 7% en 0,5x Tris-borato-EDTA. Tras la electroforesis, el gel se secó durante 120 minutos en un secador de gel BioRad y se expuso durante la noche a película sensible a los rayos X (Hyperfilm-MP, Amersham Biosciences) a -80°C con pantallas intensificadoras. Se confirmó la especificidad de las bandas NF- $\kappa$ B, AP-1 y C/EBP mediante reacciones con oligonucleótidos mutantes marcados en los extremos.

*Determinación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real*

La determinación de la expresión génica de Pax-7 y de miogenina se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real en músculo tibial tal como se ha informado anteriormente (ver Edstrom E. *et al.*, "Sarcopenia is not due to lack of regenerative drive in senescent skeletal muscle", *Aging Cell* 4:65-77, 2005).

*Efecto del tratamiento de formoterol en ratas portadoras de hepatoma ascítico Yoshida AH-130*

El número de células tumorales en huéspedes portadores del modelo Yoshida AH-130 no resultó significativamente afectado por el formoterol, así como tampoco la cantidad de alimento ingerido (observado en portadores tumorales). La hipofagia durante el crecimiento tumoral persistió sin cambios en los animales tratados (ver la Tabla 1).

El patrón de los músculos esquelético y cardíaco era bastante diferente. De esta manera, tal como se muestra en la Tabla 1, la implantación del hepatoma ascítico Yoshida AH-130 resultó en una reducción del peso muscular (13% para el gastrocnemio, 16% para el tibial, 11% para el sóleo, 19% para EDL y 11% para el corazón). El tratamiento de formoterol resultó en un incremento en la mayoría de tipos musculares, incluyendo el gastrocnemio (28%), tibial (25%), EDL (32%) y cardíaco (21%) en el grupo de control. En los animales portadores de tumor, el formoterol indujo un incremento del peso en el gastrocnemio (9%), tibial (11%), EDL (16%) y corazón (11%), evitando de esta manera la reducción de la masa muscular. El tratamiento con formoterol presentó, por lo tanto, un efecto protector, en términos de peso de tejido húmedo, para los músculos esqueléticos y para el corazón. Además, el formoterol también proporcionó una acción trófica significativa sobre los músculos en no portadores de tumor, particularmente en los músculos gastrocnemio, tibial, EDL y cardíaco, mientras que el sóleo no resultó significativamente afectado. Respecto a los tejidos adiposos, el crecimiento tumoral causó grandes reducciones de la masa de tejido adiposo blanco (46%). Se observó una situación similar para el tejido adiposo marrón (53%). En el modelo de tumor en la rata, el tratamiento de formoterol se asoció a una tendencia hacia una reducción de la masa de tejido adiposo blanco en animales tanto de control como portadores tumorales, aunque los resultados no alcanzaron la significancia estadística, mientras que indujo un incremento del peso del tejido adiposo marrón (ver la Tabla 1).

La Tabla 1 muestra la cantidad de alimento ingerido, los pesos de tejido y el crecimiento tumoral en ratas portadoras de hepatoma ascítico Yoshida AH-130. La cantidad de alimento ingerido se expresa en gramos y se refiere a la ingestión durante el periodo del experimento antes del sacrificio (7 días después de la inoculación del tumor). Los pesos de tejido se expresan en mg/100 g de peso corporal inicial. La carcasa (cuerpo sin órganos ni tumor) se expresa como g/100 g de peso corporal inicial. El contenido de células tumorales se expresa en millones de células. Los resultados son medias  $\pm$  SEM para el número de animales indicado entre paréntesis. C = control; F = tratados con formoterol; TB = portadores tumorales. Significancia estadística de los resultados (de pruebas t de Student): C frente a TB: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. No tratadas frente a F: †p<0,05, ††p<0,01, †††p<0,001.

ES 2 336 229 T3

TABLA 1

	C(4)	C+F(5)	TB(12)	TB+F(12)
5 Cantidad de alimento ingerido	121±1	135±2††	105±4**	109±5**
peso de músculo:				
-gastrocnemio	673±12	859±38††	585±10***	639±16††***
-tibial	219±7	275±12††	184±4**	204±4††***
10 -sóleo	46±1	55±4	41±1*	40±1***
-EDL	53±2	70±3††	43±1***	50±1†††***
-cardiaco	430±17	520±15††	382±7**	426±17†**
15 peso de tejidos adiposos:				
-blanco (dorsal)	963±103	759±126	516±90*	461±49*
-marrón (interescapular)	260±13	278±21	123±11***	177±11†***
20 peso de la carcasa	92±1	113±11	80±1***	81±1***
contenido de células tumorales	--	--	3886±444(5)	3403±88(5)

25 La degradación acelerada de las proteínas musculares en huéspedes tanto de AH-130 como de carcinoma pulmonar de Lewis se produce básicamente debido a la activación del sistema proteolítico dependiente de ATP-ubiquitina. De esta manera, se investigaron los efectos del formoterol sobre la expresión génica de diferentes sistemas proteolíticos presentes en el músculo esquelético. Se estudio la expresión génica en el músculo gastrocnemio de dos especies de ARNm de poliubiquitina (2,4 kb y 1,2 kb), de la subunidad C8 del proteasoma (ambos implicados en la ruta

30 proteolítica dependiente de ATP-ubiquitina), de la m-calpaína (sistema dependiente del calcio) y de la catepsina B (sistema lisosómico). Tal como se muestra en la Tabla 2, los animales portadores tumorales mostraron una expresión incrementada de los genes poliubiquitina comparado con los animales de control correspondientes: más de 2 veces (2,4 kb) y de 6 veces (1,2 kb) (ver la figura 1). Al recibir los animales portadores tumorales el formoterol, dicha activación resultó suprimida (Tabla 2). Resulta interesante que se encontraron resultados similares para las subunidades C8 y C9

35 del proteasoma y para el enzima conjugante E2, la expresión del cual se incrementó significativamente como resultado del crecimiento tumoral y el tratamiento de formoterol suprimió esta activación de la expresión génica (ver la Tabla 2 y la figura 1). Respecto a otros sistemas proteolíticos, la carga tumoral también resultó en un incremento de la expresión del sistema m-calpaína dependiente del calcio (de 3 veces) pero el tratamiento de formoterol no eliminó esta activación en este modelo tumoral sometido a ensayo (ver la Tabla 2 y la figura 1). Finalmente, el tratamiento de

40 formoterol redujo la expresión de catepsina B lisosómica en las ratas portadoras tumorales (ver la Tabla 2).

La Tabla 2 muestra la expresión génica (ARNm) de diferentes sistemas proteolíticos en músculos gastrocnemios de ratas que portan hepatoma ascítico Yoshida AH-130. Se detectó tras la hibridación con sondas de ADNc. Se llevó a cabo una corrección de carga mediante la preparación de filtros con la sonda de subunidad ribosómica 18S de rata.

45 Las autorradiografías se sometieron a densitometría de barrido. Los símbolos son los utilizados en la Tabla 1.

TABLA 2

	C	C+F	TB	TB+F
50 sistema proteolítico dependiente de ubiquitina:				
-ubiquitina 2,4 kb	100±12(4)	92±12(5)	233±23(3)**	128±19(5)†
-ubiquitina 1,2 kb	52±10(3)	57±12(5)	311±71(3)*	73±15(4)†
55 -subunidad C8 del proteasoma	100±9(4)	62±7(5)†	155±7(5)**	78±9(5)†††
-subunidad C9 del proteasoma	100±5(4)	104±7(5)	126±6(5)*	80±4(5)†††
-enzima conjugante E2 1,8 Kb	100±4(4)	91±3(5)	163±4(5)***	136±5(5)††
60 -enzima conjugante E2, 1,2 kb	100±7(4)	88±6(5)	157±8(5)***	128±5†
dependiente del calcio:				
-m-calpaína	100±13(4)	187±14(5)††	282±33(5)**	212±9(4)
65 lisosómico:				
-catepsina B	100±8(4)	106±6(5)	113±3(5)	65±6(5)†††***

Considerando el incremento de actividad del proteasoma anteriormente descrita en músculo esquelético de ratones portadores tumorales (ver Whitehouse A.S. *et al.*, "Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid", *Cancer Res.* 61:3604-9, 2001), se decidió someter a ensayo si el formoterol también era capaz de revertir su actividad en el músculo esquelético de ratas portadoras tumorales. Se midió la actividad catalítica más dominante (actividad similar a quimotripsina) en músculo gastrocnemio de ratas que portaban el tumor Yoshida AH-130. Los resultados obtenidos muestran una reducción de la actividad del proteasoma en ratas tanto no portadoras (64%) como portadoras tumorales (47%) tratadas con formoterol (ver la Tabla 3).

La Tabla 3 muestra la actividad del proteasoma en homogenados de músculo esquelético procedente de ratas portadoras tumorales. Las actividades, expresadas en nkatales/mg de proteína referida al reservorio total de proteínas, se calcularon mediante la utilización de amidocoumarina libre como el estándar de trabajo. El resultado final es la diferencia entre los nkatales obtenidos en presencia y en ausencia de lactacistina 25  $\mu$ M, un inhibidor específico del proteasoma. Los símbolos son los utilizados en la Tabla 1.

TABLA 3

Grupo experimental	Tratamiento	Actividad del proteasoma
Control	Ninguno	13,3 $\pm$ 2,5(3)
	Formoterol	4,8 $\pm$ 1,4(3)
Tumor	Ninguno	20,3 $\pm$ 4,7(3)
	Formoterol	10,7 $\pm$ 2,4(5)

Otro aspecto que se evaluó fue la apoptosis muscular durante el cáncer. Los resultados presentados en la figura 2 muestran que el crecimiento tumoral se asocia a una tasa incrementada de apoptosis, determinada como fragmentación del ADN (68%) (ver las figuras 2A y 2B) y como activación de la caspasa-3 (59%) (ver la figura 2C). El tratamiento de formoterol eliminó por completo la tasa incrementada de apoptosis muscular (ver las figuras 2A, 2B y 2C).

Los resultados representados en la Tabla 4 muestran que ninguno de los factores transcripcionales estudiados (NF- $\kappa$ B, AP-1 y C/EBP) se encontraba implicado en el desarrollo de la pérdida de masa muscular durante el crecimiento tumoral.

La Tabla 4 muestra actividad ligante de ADN de NF- $\kappa$ B, AP-1 y C/EBP en los músculos tibiales de ratas portadoras del hepatoma ascítico Yoshida AH-130. Se determinó la unión del ADN de NF- $\kappa$ B, AP-1 y C/EBP en extractos nucleares procedentes de músculo tibial. Se sometieron autorradiografías a densitometría de barrido. Los símbolos son los utilizados en la Tabla 1.

TABLA 4

Factor transcripcional	C	C+F	TB	TB+F
NF- $\kappa$ B	100 $\pm$ 7(4)	118 $\pm$ 7(5)	100 $\pm$ 16(4)	93 $\pm$ 13(5)
AP-1	100 $\pm$ 14(4)	85 $\pm$ 8(5)	112 $\pm$ 10(5)	105 $\pm$ 12(4)
C/EBP	100 $\pm$ 20(4)	128 $\pm$ 13(4)	122 $\pm$ 20(4)	107 $\pm$ 13(5)

La expresión génica tanto de UCP2 como de UCP3 se incrementó en el músculo esquelético como consecuencia del crecimiento tumoral. En efecto, en el músculo gastrocnemio, se elevó el contenido de ARNm de UCP2 en un factor de 3, mientras que el de UCP3 se incremento en un factor de 5. Al recibir las ratas portadoras de tumor el formoterol, esta activación se redujo significativamente en el caso de la expresión de UCP2 y se observó una tendencia considerable en el caso de la expresión de UCP3 (ver la Tabla 5).

La Tabla 5 muestra la expresión génica (ARNm) de las proteínas desacoplantes (UCP2 y UCP3) en músculos gastrocnemios procedentes de ratas portadoras de hepatoma ascítico Yoshida AH-130. Se detectó después de la hibridación con sondas de ADNc. Se llevó a cabo una corrección de carga mediante la preparación de filtros con la sonda subunidad ribosómica 18S de rata. Las autorradiografías se sometieron a densitometría de barrido. Los símbolos son los utilizados en la Tabla 1.

TABLA 5

	C	C+F	TB	TB+F
UCP2	100 $\pm$ 14(3)	106 $\pm$ 7(5)	317 $\pm$ 56(4)*	212 $\pm$ 31 (5) (p=0,1)
UCP3	100 $\pm$ 11(4)	84 $\pm$ 18(4)	573 $\pm$ 66(4)***	352 $\pm$ 41(4)†

*Efecto directo del formoterol sobre las incubaciones de músculo*

La disección y el aislamiento de los músculo EDL se llevó a cabo bajo anestesia con una mezcla de quetamina/xilazina. Los músculos aislados se fijaron a un clip de acero inoxidable para mantener el músculo bajo una ligera tensión (de manera que fuese comparable a la longitud en reposo) durante la incubación. Los músculos pueden así mantener concentraciones de ATP y fosfocreatina normales durante un periodo de incubación de 3 horas. Los músculos se incubaron en un baño de agua bajo agitación-termostatizado a 35°C durante 3 horas en 2 ml de solución salina fisiológica de Krebs-Henseleit, pH 7,4, que contenía glucosa 5 mM y HEPES 20 mM. Tras la adición de los músculos a los viales, se inició la incubación a una tasa de agitación de 45 ciclos/minuto. Los viales se gasificaron con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 19:1 durante la totalidad del periodo de incubación. Los músculos se preincubaron durante 60 minutos:30 minutos en tampón de Krebs-Henseleit y durante 30 minutos en medio suplementado que contenía formoterol 10<sup>-4</sup> M, clembuterol 10<sup>-4</sup> M o nada, y después se incubaron durante 120 minutos en medio suplementado fresco.

Se calculó la degradación de las proteínas totales en los músculos aislados como la tasa de tirosina liberada en las últimas dos horas de incubación hacia el medio en presencia de cicloheximida 0,5 mM con el fin de bloquear la reincorporación de la tirosina en las proteínas del tejido. La tirosina se midió fluorimétricamente. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante pruebas t de Student. Tal como puede observarse en la Tabla 6, el formoterol redujo la tasa de degradación de las proteínas (medida como la liberación de tirosina hacia el medio de incubación) en 20%, confirmando de esta manera que la acción de la molécula se basa en una reducción de la tasa proteolítica.

La Tabla 6 representa las tasas proteolíticas en músculos EDL aislados de ratas de control. Se midieron en presencia de cicloheximida (0,5 mM) y se expresan en nmoles/gramos en 2 horas y son medias  $\pm$  SEM para el número de animales indicado entre paréntesis. Significancia estadística de los resultados (de pruebas t de Student): agonista  $\beta_2$  añadido frente a ninguna adición; \*\*\*p<0,001.

TABLA 6

Adiciones al medio de incubación	Tasa proteolítica
Ninguna	225 $\pm$ 8,9(7)
Formoterol	180 $\pm$ 5,6(8)***
Clembuterol	176 $\pm$ 4,4(8)***

Además, la tasa proteolítica también se redujo significativamente (12%) en ratas que habían sido previamente tratadas durante seis días consecutivos con el agonista  $\beta_2$  (ver la Tabla 7).

La Tabla 7 muestra las tasas proteolíticas en músculos EDL aislados de ratas que recibieron formoterol (2 mg/kg peso corporal) durante seis días consecutivos previamente al sacrificio. Las tasas se midieron en presencia de cicloheximida (0,5 mM) y se expresan en nmoles/g en 2 horas. Significancia estadística de los resultados (de pruebas t de Student): ratas tratadas frente a ratas de control, \*p<0,05.

TABLA 7

Tratamiento	Tasa proteolítica
Ninguno	182 $\pm$ 7(12)
Ratas tratadas	159 $\pm$ 5(8)*

Además de los efectos sobre la tasa de degradación de las proteínas en músculos de rata incubados, tanto el formoterol como el clembuterol influyeron sobre la tasa de síntesis de proteínas, que se incrementó en 20% en ambos casos, para el formoterol y el clembuterol (ver la Tabla 8). Se evaluó la tasa de síntesis de proteínas totales en músculos aislados tal como se ha descrito anteriormente (ver García-Martínez C. *et al.*, "Interleukin-6 does not activate protein breakdown in rat skeletal muscle", *Cancer Lett.* 76:1-4, 1994). Estos resultados concuerdan con observaciones similares realizadas en estudios anteriores con agonistas  $\beta_2$  en músculos de rata incubados (ver Rehfeldt C. *et al.*, "The effect of the beta-adrenergic agonist clembuterol on the growth of skeletal muscles of rats", *Arch. Tieremahr* 45:333-44, 1994).

La Tabla 8 representa la tasa de síntesis de proteínas en músculos EDL aislados procedentes de ratas de control. Las tasas sintéticas se expresan en nmoles de [<sup>14</sup>C]fenilalanina incorporada por gramo y 30 minutos. Significancia estadística de los resultados (de pruebas t de Student): adición de agonista  $\beta_2$  frente ninguna adición, \*p<0,05.

TABLA 8

Adiciones al medio de incubación	Tasa de síntesis de proteína
Ninguno	7,82 $\pm$ 0,5(6)
Formoterol	9,36 $\pm$ 0,3(7)*
Clembuterol	9,36 $\pm$ 0,5(9)*

## ES 2 336 229 T3

Se demostró que la combinación de formoterol (3 mg/kg de peso corporal) y pentoxifilina, un inhibidor de la síntesis del factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) (ver Combaret L. *et al.*, "Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing rats", Mol. Biol. Rep. 26:95-101, 1999) (10 mg/kg de peso corporal), provocaba un efecto positivo sobre la ganancia de masa muscular debido a la caquexia (Tabla 9). Este efecto se apreció en los diferentes días del crecimiento tumoral (días 2, 4 y 7 tras la inoculación del tumor).

La Tabla 9 (A, B y C) representa la cantidad de alimento ingerido, los pesos de tejido y el crecimiento tumoral en ratas portadoras de hepatoma ascítico Yoshida AH-130. La cantidad de alimento ingerido se expresa en gramos y se refiere a la ingestión durante el periodo experimental antes del sacrificio (días 2, 4 y 7 después de la inoculación del tumor; Tablas 9A, 9B y 9C, respectivamente). Los pesos de tejido se expresan en mg/100 g de peso corporal inicial. La carcasa (cuerpo sin órganos ni tumor) se expresa en g/100 g de peso corporal inicial. El contenido de células tumorales se expresa en millones de células. Los resultados son medias  $\pm$  SEM para el número de animales indicado entre paréntesis. C = control; F = tratado con formoterol; P = tratado con pentoxifilina; TB = portador tumoral. Significancia estadística de los resultados (de pruebas t de Student): C frente a TB: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; no tratado frente a F: † $p < 0,05$ , †† $p < 0,01$ , ††† $p < 0,001$ .

TABLA 9A

(dos días después de la inoculación del tumor)

Cantidad de	C(4)	C+F+P(5)	TB(5)	TB+F+P(5)
alimento ingerido	35 $\pm$ 1	29 $\pm$ 1†††	32 $\pm$ 1	26 $\pm$ 1†
pesos de músculo:				
-gastrocnemio	484 $\pm$ 13	533 $\pm$ 11†	171 $\pm$ 4	183 $\pm$ 3
-tibial	167 $\pm$ 6	185 $\pm$ 3†	171 $\pm$ 4	183 $\pm$ 3†
-sóleo	39 $\pm$ 2	44 $\pm$ 2	40 $\pm$ 1	43 $\pm$ 1
-EDL	39 $\pm$ 1	43 $\pm$ 1†	40 $\pm$ 1	43 $\pm$ 1†
-cardíaco	410 $\pm$ 17	430 $\pm$ 20	351 $\pm$ 8**	424 $\pm$ 10†††
peso de la carcasa	93 $\pm$ 1	93 $\pm$ 1	93 $\pm$ 1	92 $\pm$ 1

TABLA 9B

(cuatro días después de la inoculación del tumor)

Cantidad de	C(3)	C+F+P(5)	TB(7)	TB+F+P(5)
alimento ingerido	52 $\pm$ 1	60 $\pm$ 3†	61 $\pm$ 3	65 $\pm$ 3
pesos de músculo:				
-gastrocnemio	590 $\pm$ 16	597 $\pm$ 14	517 $\pm$ 9***	594 $\pm$ 11†††
-tibial	195 $\pm$ 3	198 $\pm$ 6	173 $\pm$ 4**	203 $\pm$ 3†††
-sóleo	43 $\pm$ 1	45 $\pm$ 2	41 $\pm$ 1	42 $\pm$ 1
-EDL	46 $\pm$ 1	46 $\pm$ 1	40 $\pm$ 1	46 $\pm$ 1
-cardíaco	402 $\pm$ 9	517 $\pm$ 22 ††	387 $\pm$ 17	430 $\pm$ 9 (p=0,08)**
peso de la carcasa	101 $\pm$ 2	97 $\pm$ 2	96 $\pm$ 2	97 $\pm$ 1
contenido de células tumorales	---	---	1.886 $\pm$ 197	1.059 $\pm$ 435

## ES 2 336 229 T3

TABLA 9C

(siete días después de la inoculación del tumor)

	C(4)	C+F+P(5)	TB(5)	TB+F+P(6)
Cantidad de alimento ingerido	123±1	148±1†††	98±3***	84±1†††***
pesos de músculo:				
-gastrocnemio	651±10	745±15 ††	482±22***	596±20***
-tibial	235±6	247±3	161±5**	188±8†***
-sóleo	51±2	52±2	38±1**	41±2**
-EDL	53±2	60±2	38±1***	44±1†***
-cardíaco	430±29	484±23	330±27*	415±8*
peso de la carcasa	107±8	99±4	89±6	95±1
contenido de células tumorales	---	---	3596±531	3868±810

El tratamiento con diferentes dosis de formoterol (0,3, 1, 3 y 10 mg/kg de peso corporal) fue similar, por lo que el formoterol a dosis muy bajas resulta efectivo contra la caquexia (Tabla 10).

La Tabla 10 muestra la cantidad de alimento ingerido, los pesos de tejido y el crecimiento tumoral en ratas portadoras de hepatoma ascítico Yoshida AH-130. La cantidad de alimento ingerido se expresa en gramos y se refiere a la ingestión diaria media. Todas las demás variables se expresan tal como en la Tabla 9. F = tratadas con formoterol; TB = portador tumoral. Significancia estadística de los resultados (de pruebas t de Student): no tratado frente a F: †p<0,05; ††p<0,01, †††p<0,001.

TABLA 10

	TB (4)	TB+F 0,3 (5)	TB+F 1 (4)	TB+F 3 (5)	TB+F 10 (5)
Cantidad de alimento ingerido	14±1	11±1	8±1†††	9±1†††	10±1†††
pesos de músculo:					
-gastrocnemio	486±7	563±23††	518±34	557±15†††	537±5†††
-tibial	154±3	172±7†	166±6	161±5	159±5
-sóleo	35±1	37±1	33±2	37±2	37±2
-EDL	36±1	41±1††	39±2	38±1	40±1†
-cardíaco	278±6	322±9††	320±13††	341±12†††	351±11†††
peso de la carcasa	78±1	81±2	77±2	80±1	77±1
contenido de células tumorales	3842±251	3294± 272	644±356	3787±424	3675±146

De acuerdo con los últimos resultados, se decidió estudiar el efecto del formoterol a dosis bajas (0,3 mg/kg de peso corporal) sobre la caquexia de cáncer en diferentes días del crecimiento tumoral (días 2, 4 y 7 tras la inoculación del tumor) y se confirmó que este agonista selectivo para el adrenoceptor  $\beta_2$  también resulta efectivo a dosis bajas (Tablas 11A, B y C).

## ES 2 336 229 T3

La Tabla 11 (A, B y C) muestra la cantidad de alimento ingerido, los pesos de tejido y el crecimiento tumoral en ratas portadoras de hepatoma ascítico Yoshida AH-130. Todas las demás variables se expresan tal como en la Tabla 9.

TABLA 11A

(dos días después de la inoculación del tumor)

	C(5)	C+F(5)	TB(7)	TB+F(7)
Cantidad de alimento ingerido	38±1	34±1†††	36±1*	35±1
pesos de músculo:				
-gastrocnemio	540±12	563±18	523±9	539±8†
-tibial	177±3	186±5	179±5	182±4
-sóleo	41±2	45±2	39±2	40±1*
-EDL	45±3	50±2	44±1	49±1†
-cardiaco	366±11	426±6††	377±11	403±10(p=0,1)
peso de la carcasa	90±1	92±1	89±1	88±1

TABLA 11B

(cuatro días después de la inoculación del tumor)

	C(5)	C+F(5)	TB(7)	TB+F(7)
Cantidad de alimento ingerido	75±1	71±1 ††	69±2 *	65±1 **
pesos de músculo:				
-gastrocnemio	583±9	629±9††	553±6*	598±16††
-tibial	191±3	210±5†	181±4	199±4†
-sóleo	44±1	43±2	41±1	43±1 *
-EDL	48±1	52±1†	46±1	51±2†
-cardiaco	396±7	431±5††	369±6*	417±18†
peso de la carcasa	102±1	106±1††	94±1***	97±1***
contenido de células tumorales	--	--	1346±224	1065±95

TABLA 11C

(siete días después de la inoculación del tumor)

	C(5)	C+F(5)	TB(6)	TB+F(7)
Cantidad de alimento ingerido	133±1	131±2	106±1***	108±1***
pesos de músculo:				
-gastrocnemio	718±10	759±16†	505±17***	611±18††***
-tibial	236±6	266±5†††	171±5***	200±9†***
-sóleo	52±2	52±2	41±3**	44±1**
-EDL	59±2	60±2	42±2***	51±2†*
-cardiaco	449±6	504±10††	372±19**	403±9***
peso de la carcasa	118±1	124±2†	88±3***	94±3 (p=0,1)***
contenido de células tumorales	--	--	3386±163	2871±271

La regeneración muscular es un proceso que implica la activación de células satélite, que son células musculares precursoras situadas contiguamente a las fibras de músculo esquelético. Se dañó el músculo mediante la inyección de bupivacaína intramuscular (al 0,5%). Este compuesto, tras el daño muscular estimula la regeneración del músculo. Además, se analizó el efecto de dos tratamientos de formoterol (0,3 mg/kg de peso corporal): 7 ó 14 días de tratamiento. La Tabla 12 representa el efecto anabólico de los tratamientos de formoterol sobre el músculo tibial dañado previamente con bupivacaína.

La Tabla 12 representa el peso de músculos tibiales inyectados previamente con bupivacaína y tratados después con formoterol durante 7 ó 14 días. Los pesos de músculo se expresan en mg/100 g de peso corporal inicial. Los resultados son medias  $\pm$  SEM para el número de animales indicado entre paréntesis. C = control; F = tratado con formoterol; B = tratado con bupivacaína; d7 = 7 días de tratamiento; d14 = 14 días de tratamiento. Significancia estadística de los resultados (de pruebas t de Student): C frente a tratados: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , bupivacaína frente a formoterol: † $p < 0,05$ .

TABLA 12

	C(4)	C+B(4)	C+B+F d7(3)	C+B+F d14(4)
músculos tibiales	249 $\pm$ 4	265 $\pm$ 4*	297 $\pm$ 13*†	304 $\pm$ 10†

El tratamiento de formoterol indujo una mayor recuperación del peso muscular en comparación con la recuperación debida al inductor de daño y la posterior estimulación de la regeneración muscular (bupivacaína). Por este motivo, se estudió la expresión génica de algunos marcadores de regeneración muscular: los genes se expresan durante la activación de células satélite tales como Pax-7 (marcador de activación temprana) y la miogenina (marcador de activación final). Se detallan los resultados en la Tabla 13.

La Tabla 13 muestra la expresión génica de dos marcadores de activación de células satélite: Pax-7 y miogenina. Los resultados son medias  $\pm$  SEM para el número de animales que se indica entre paréntesis. C = control; F = tratado con formoterol; B = tratado con bupivacaína; d7 = 7 días de tratamiento; d14 = 14 días de tratamiento. Significancia estadística de los resultados (de pruebas t de Student): C frente a tratado: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Bupivacaína frente a formoterol: † $p < 0,05$ .

TABLA 13

	C(3)	C+B(3)	C+B+F d7(3)	C+B+F d14(3)
-Pax-7	100 $\pm$ 11	105 $\pm$ 11†	147 $\pm$ 10	203 $\pm$ 4††
-Miogenina	100 $\pm$ 36	142 $\pm$ 77	131 $\pm$ 49	190 $\pm$ 58

#### *Efecto del tratamiento de formoterol en ratones portadores de carcinoma pulmonar de Lewis*

El tratamiento de formoterol no alteró ni el peso del tumor sólido procedente de huéspedes portadores del modelo de carcinoma pulmonar de Lewis, ni la cantidad de alimento ingerido (controles y portadores tumorales). La hipofagia producida durante el crecimiento de los tumores persistió sin cambios en los animales tratados (Tabla 14).

En el modelo de carcinoma pulmonar de Lewis, la carga tumoral indujo una reducción más grande de los pesos musculares (13% para los gastrocnemios, 21% para los tibiales y 18% para los sóleos) (Tabla 14). El tratamiento de formoterol incrementó los pesos musculares de los gastrocnemios (19%), tibiales (13%) y sóleos (28%) significativamente en los animales no portadores de tumor. Resulta interesante que el tratamiento con formoterol presentó un efecto protector significativo de los pesos de músculo esquelético: gastrocnemios (11%), tibiales (11%) y sóleo (56%), y del músculo cardíaco (24%) en animales portadores tumorales. Respecto a los tejidos adiposos, el crecimiento tumoral provocó grandes reducciones de la masa de tejido adiposo blanco en el modelo de carcinoma pulmonar de Lewis (76%). Se observó una situación similar para el tejido adiposo marrón (39%). En el modelo de carcinoma pulmonar de Lewis, el formoterol no alteró la masa de tejido adiposo blanco ni en los animales de control ni en los portadores tumorales, aunque indujo un incremento de la masa de tejido adiposo marrón tanto en los controles como en los portadores tumorales (Tabla 14).

La Tabla 14 muestra la cantidad de alimento ingerido, los pesos de tejido y el crecimiento tumoral de ratones portadores de carcinoma pulmonar de Lewis. La cantidad de alimento ingerido se expresa en gramos y se refiere a la ingestión durante el periodo experimental previo al sacrificio, que tuvo lugar 15 días después de la inoculación del tumor. Los pesos de tejido se expresan en mg/100 de peso corporal inicial. La carcasa (cuerpo sin órganos ni tumores)

## ES 2 336 229 T3

se expresa en gramos/100 gramos de peso corporal inicial. El peso tumoral se expresa en gramos. Los símbolos son los utilizados en la Tabla 1.

TABLA 14

	C(7)	C+F(6)	TB(8)	TB+F(7)
Cantidad de alimento ingerido	46±1	53±4	51±3	53±2
pesos de músculo:				
-gastrocnemio	563±4	669±13†††	492±9***	548±13†††***
-tibial	192±2	217±4†††	152±3***	169±3†††***
-sóleo	28±1	36±1†††	23±2*	36±2†††
-EDL	40±1	42±2	35±2	40±2
-cardiaco	432±15	462±31	401±17	496±40†
pesos de tejidos adiposos:				
-blanco (dorsal)	238±18	217±25	58±12***	68±9***
-marrón (interescapular)	208±12	249±6†	127±5***	153±13†††***
peso de la carcasa	80±1	87±1†††	69±1***	73±2***
peso de tumor	--	--	4,26±0,3	4,58±0,3

Tal como se muestra en la Tabla 15, los ratones portadores tumorales mostraron una expresión incrementada de los genes de poliubiquitina comparado con los animales de control correspondientes: más de 2 veces (2,4 kb) y 3 veces (1,2 kb) (figura 3). Al recibir los ratones portadores tumorales el formoterol, se suprimió dicha activación (Tabla 15). Resulta interesante que se encontraron resultados similares para las subunidades C8 y C9 del proteasoma, la expresiones de las cuales se incrementó significativamente como resultado del crecimiento tumoral, suprimiendo el tratamiento de formoterol esta activación de la expresión génica (Tabla 15 y figura 3). Respecto a otros sistemas proteolíticos, la carga tumoral también resultó en un incremento de la expresión del sistema m-calpaína dependiente del calcio (2 veces), pero el tratamiento de formoterol no eliminó esta activación en el modelo de carcinoma pulmonar de Lewis (Tabla 15 y figura 3). Finalmente, el ligero incremento del contenido de ARNm de catepsina B lisosómica observado en los ratones portadores de carcinoma pulmonar de Lewis fue revertido por el tratamiento de formoterol (Tabla 15 y figura 3).

La Tabla 15 muestra la expresión génica (ARNm) de los diferentes sistemas proteolíticos en músculos gastrocnemios procedentes de ratones portadores de carcinoma pulmonar de Lewis. Se realizaron las mediciones tras la hibridación con sondas de ADNc. Se llevó a cabo una corrección de carga a partir de filtros con la sonda de subunidad ribosómica 18S de rata. Las autorradiografías se sometieron a densitometría de barrido. Los símbolos son los utilizados en la Tabla 1.

TABLA 15

Sistema proteolítico	C	C+F	TB	TB+F
dependiente de ubiquitina:				
-ubiquitina 2,4 kb	100±9 (5)	50±9 (5)††	227±59 (4)*	90±21 (6)††
-ubiquitina 1,2 kb	36±3(5)	25±5(5)	113±14(4)***	27±5(6)†††
-subunidad C8 del proteasoma	100±8 (5)	116±9 (5)	177±11(5)***	129±12(6)†
-subunidad C9 del proteasoma	100±10(5)	114±7(4)	145±3(5)**	101±12(5)††
dependiente del calcio:	100±21(5)	136±20(5)	222±27(5)***	254±33(7)*
-m-calpaína lisosómico:				
-catepsina B	100±14(5)	137±6(3)	157±11(5)*	161±1(7)

Se incrementó la expresión génica tanto de UCP2 como de UCP3 en el músculo gastrocnemio como consecuencia del crecimiento de los tumores pulmonares de Lewis. En el músculo gastrocnemio, el contenido de ARNm de UCP2 se encontraba elevado en un factor de 3, mientras que el de UCP3 se había incrementado en un factor de 2 (sin alcanzar la significancia). Al recibir los ratones portadores tumorales el formoterol, esta activación resultó eliminada en la expresión de ambos genes (Tabla 16).

## ES 2 336 229 T3

La Tabla 16 muestra la expresión génica (ARNm) de las proteínas desacoplantes (UCP2 y UCP3) en músculos gastrocnemios procedentes de ratones portadores de carcinoma pulmonar de Lewis. Se realizaron las mediciones tras la hibridación con sondas de ADNc. Se llevó a cabo una corrección de carga a partir de filtros con la sonda de subunidad ribosómica 18S de rata. Las autorradiografías se sometieron a densitometría de barrido. Los símbolos son los utilizados en la Tabla 1.

TABLA 16

	C	C+F	TB	TB+F	
10					
	UCP2	100±25 (4)	102±17 (6)	310±37 (5)**	175±21 (7)†
	UCP3	100±11 (3)	94±10 (5)	174±28	102±13 (6)†
15			(4)(p=0,08)		

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

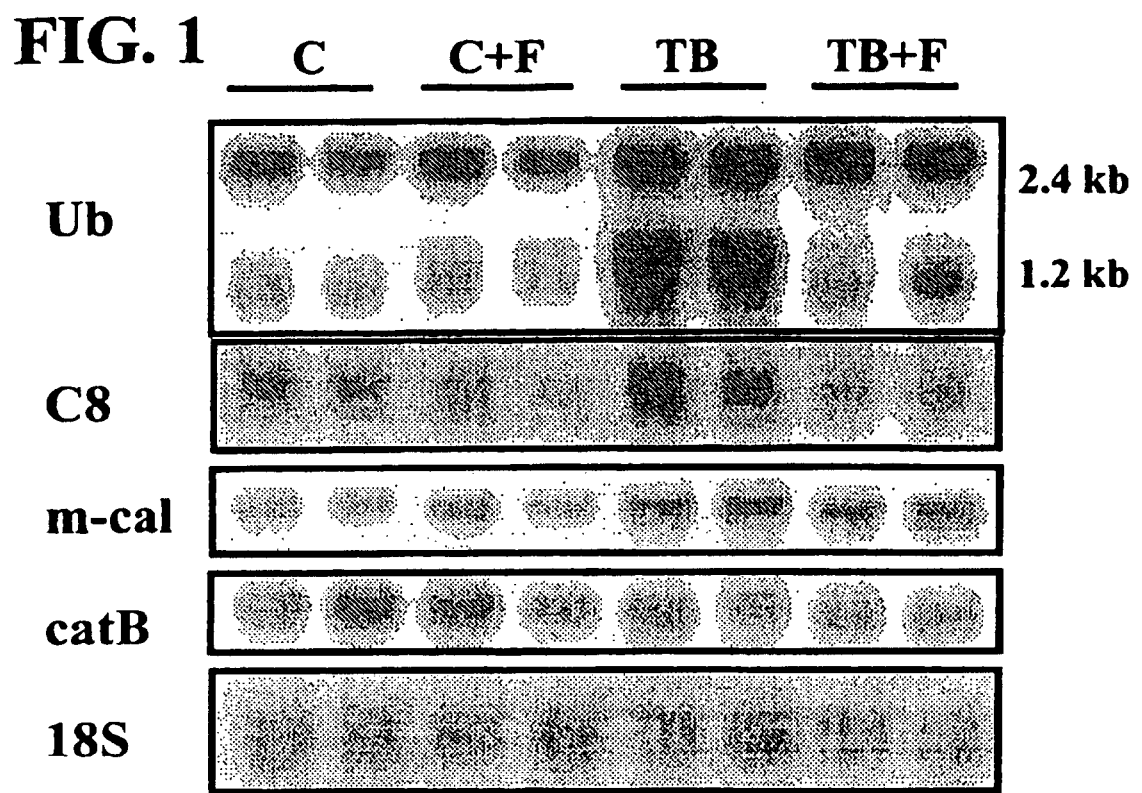
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Utilización de formoterol o de una sal farmacéuticamente aceptable, o de un solvato farmacéuticamente aceptable de cualquiera, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la pérdida muscular y/o del síndrome caquético, encontrándose asociados cualquiera o ambos a un estado catabólico en un mamífero.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el estado catabólico es la enfermedad de Crohn, el cáncer o el SIDA.
3. Utilización según la reivindicación 1, en la que el estado catabólico es la sepsis, la diabetes o un estado de inmovilización.
- 15 4. Utilización según la reivindicación 1, en la que el estado catabólico es una quemadura severa o se debe a la ingravidez o al envejecimiento.
- 20 5. Utilización según la reivindicación 1, en la que el estado catabólico es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, una patología cardiovascular o una patología hepática.
6. Utilización según la reivindicación 1, en la que el estado catabólico es la artritis reumatoide, un trastorno de alimentación o la acidosis.
- 25 7. Utilización según la reivindicación 1, en la que el estado catabólico es una enfermedad neuromuscular, la enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Cushing.
8. Utilización según la reivindicación 1, en la que el estado catabólico es el hipertiroidismo, el hiperadrenocortisolismo o una atrofia y/o distrofia muscular.
- 30 9. Utilización según la reivindicación 1, en la que el estado catabólico es la colitis ulcerosa, el síndrome de fatiga crónica, la insuficiencia renal o la cirrosis hepática.
10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la utilización es de fumarato de formoterol o de dihidrato de fumarato de formoterol.
- 35 11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el mamífero es un ser humano.
12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el medicamento está destinado a la administración por vía oral.
- 40 13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el medicamento está destinado a la administración por vía nasal.
14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el medicamento está destinado a la administración por vía parenteral.
- 45 15. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el medicamento está destinado a la administración por la vía subcutánea.
- 50 16. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el medicamento está destinado a la administración por la vía tópica.

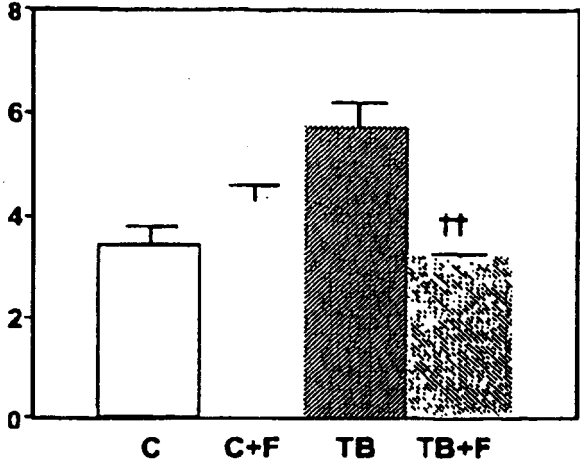
55

60

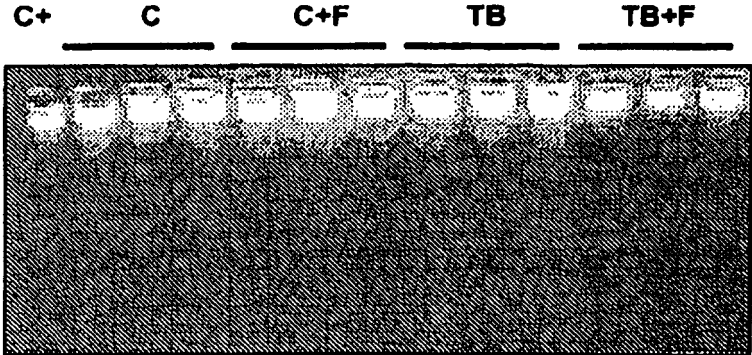
65



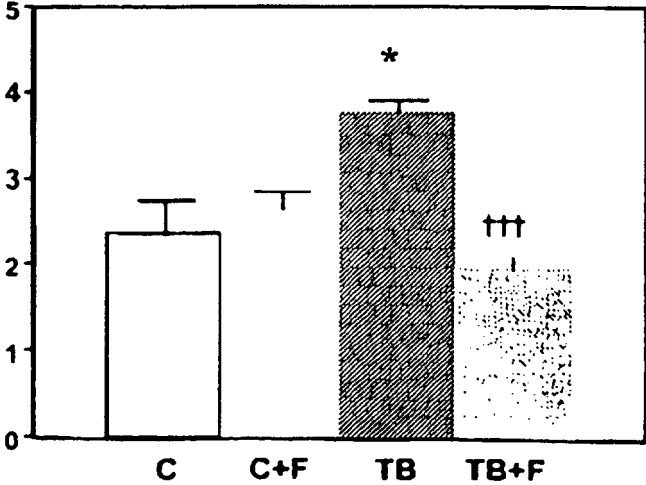
**FIG. 2A**



**FIG. 2B**



**FIG. 2C**



**FIG. 3**

