

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 834**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2008** **E 08702669 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013** **EP 2114409**

54 Título: **Composición y método para tratar o prevenir la fibrosis del músculo esquelético**

30 Prioridad:

21.01.2007 US 885896 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2014

73 Titular/es:

**AGRICULTURAL RESEARCH ORGANIZATION
(50.0%)**

**Ministry of Agriculture Volcani Center P.O. Box 6
50250 Bet Dagan, IL y
HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES AND
DEVELOPMENT COMPANY LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PINES, MARK y
NAGLER, ARNON**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 447 834 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición y método para tratar o prevenir la fibrosis del músculo esquelético

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 **[0001]** La presente invención hace referencia a un método para tratar la fibrosis y más en particular a un tratamiento, prevención o mejora de la fibrosis del músculo esquelético mediante el uso de halofuginona o de compuestos relacionados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 **[0002]** La fibrosis muscular es un fenómeno que suele ocurrir en un músculo enfermo o dañado. Se caracteriza por el crecimiento excesivo de tejido fibroso, que normalmente es resultado del intento que realiza el cuerpo para recuperarse de una lesión. La fibrosis perjudica la función muscular y provoca debilidad. La cantidad de pérdida de función muscular generalmente aumenta con el alcance de la fibrosis. La fibrosis es normalmente progresiva y puede contribuir a la inhabilidad del paciente para llevar a cabo tareas ordinarias para llevar una vida independiente como sujetar objetos o andar. La fibrosis suele ocurrir como resultado de una distrofia muscular, así como debido a otras afecciones, como una atrofia por denervación, una degradación de tejido muscular, provocada por una pérdida de contacto neural con un músculo. Para algunos tipos de distrofia muscular, como la de Duchenne, la fibrosis puede resultar en muerte a medida que los músculos del diafragma se ven afectados (el diafragma es un músculo esquelético que es involuntario y no voluntario).

- 20 **[0003]** Las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de trastornos genéticos caracterizados por la pérdida progresiva de la fuerza e integridad del músculo. Un músculo distrófico muestra variación en el tamaño de la fibra muscular, la infiltración de tejido conjuntivo y adiposo, y en los núcleos situados centralmente. Las membranas de las fibras son frágiles y sufren un daño considerable, lo que lleva a la necrosis y pérdida del músculo.

[0004] Las víctimas de distrofias musculares, particularmente distrofia muscular de Becker (BMD) y distrofia muscular de Duchenne (DMD), sufren frecuentemente una fibrosis de músculo esquelético a medida que la enfermedad progresa.

- 25 **[0005]** La forma más común de distrofia muscular es la DMD ligada al cromosoma X recesivo, una manifestación de alelo altamente penetrante que afecta a 1 de cada 3.500 machos nacidos vivos; aproximadamente un tercio de los casos ocurre como una mutación *de novo* en el bebé (Emery AE. (1991) Neuromusc. Disord. 1:19-29).

- 30 **[0006]** Normalmente la enfermedad se diagnostica a los 4-5 años y al llegar a los 8-10 años, el deterioro de la afección en el paciente hace necesario el uso de una silla de ruedas. A mitad de la adolescencia, aparecen otros síntomas neurológicos y cardiológicos. La progresión de la degeneración del músculo y el empeoramiento de los síntomas clínicos, llevan a la muerte al final de la adolescencia o hacia los veinte años, normalmente como consecuencia de complicaciones cardio-pulmonares debido a la fibrosis del diafragma.

- 35 **[0007]** Las principales causas de muerte en víctimas de la DMD, fallo respiratorio y cardíaco, son consecuencia de la debilidad en los músculos del diafragma y del miocardio que son los más afectados por la fibrosis (Finsterer, (2003) Cardiology 99:1-19). La fibrosis se caracteriza por un aumento en los constituyentes de la matriz extracelular (MEC) especialmente el colágeno tipo I. Tanto en la DMD como en la distrofia muscular congénita (CMD), se observó un aumento de los colágenos tipo I y III en el músculo esquelético (Hantai et al. (1985) ConnectTissue Res. 13:273-81 y Dunace, et al. (1980) Nature 284:470-472) provocando la fibrosis, que guarda relación con la destrucción del músculo (Zhao, et al. (2003) J. Patho. 201:149-59). La implicación cardíaca en la DMD se caracteriza patológicamente por la degeneración y la fibrosis del miocardio, probablemente debido a una actividad del miofibroblasto, centrándose alrededor de la pared posterolateral del ventrículo izquierdo.

- 45 **[0008]** La BMD es una afección menos grave que la DMD, caracterizada por una lenta debilitación progresiva muscular de las piernas y la pelvis, de nuevo por culpa de la fibrosis de los músculos (pese a que los músculos esqueléticos se ven mucho más afectados por la BMD). La progresión de la fibrosis suele provocar una mayor pérdida de movilidad y una esperanza de vida reducida. En algún momento, el paciente puede volverse demasiado débil para andar y necesita una silla de ruedas.

- 50 **[0009]** Tanto la BMD como la DMD se asocian a defectos en el gen de la distrofina, el gen responsable de la producción de proteína de la distrofina, que es una parte vital del complejo distrofina-glicoproteico. La DMD se caracteriza por la ausencia casi de la proteína de la distrofina en músculos esqueléticos, mientras que los resultados de la BMD a partir de diferentes mutaciones en el mismo gen, resultan en una distrofina reducida o

dañada. La presencia de distrofina protege los músculos de aquellos con BMD de una degeneración tan mala o tan rápida como la de las víctimas de DMD.

[0010] El complejo distrofina-glicoproteico conecta el citoesqueleto de actina de miofibrillas a la matriz extracelular (ECM) y es por lo tanto integral con la estructura contráctil del músculo (Yue Y, et al. (2003) Circulation, 108:1626 y Michele et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:15457-60). La etapa preliminar del DMD se caracteriza por la presencia de grupos focales de miofibrillas necróticas, hipertrofia muscular y niveles anormalmente altos de creatina quinasa (CK) muscular. En la fase patológica, ciclos repetidos de degeneración agotan la capacidad regenerativa de las células progenitoras (células satélite) y mecanismos fibrosos provocan el reemplazo progresivo del tejido muscular con tejido conjuntivo colagenoso (Rafael et al., 1997). Estos procesos llevan a la contracción de la articulación, pérdida de movilidad y muerte por fallo respiratorio o cardíaco (Wells, et al. (2002) Neuromuscle Discord. 12 Suppl 1:S11-22).

[0011] La solución perfecta para los pacientes DMD y BMD sería situar una copia normal del gen de distrofina en las células musculares, y así restaurar la suficiente expresión proteínica como para mejorar la estructura y la función (Khurana, et al. (2003) Nat Rev Drug Discov. 2:379-90). A 3,0 MB el gen de distrofina es amplio, y una terapia exitosa requeriría una transferencia masiva y sostenida de gen (Hffman, et al. (1987) Cell 51:919-28 and Skuk, et al. (2002) Curr. Opin. Neurol. 15:563-9 and Thioudellet, et al. (2002) Neuromuscul Disord. 12 Suppl 1:S49-51). La fibrosis muscular es un obstáculo mayor en la terapia génica ya que dificulta la administración de gen.

[0012] Una alternativa a reemplazar el gen defectuoso consiste en modular su expresión al emplear oligonucleótidos antisentido que alteran la estabilidad del ARN, o en hacer un empalme genético (Lu QI, et al. (2003) Nat. Med. 9(8):1009-14 y Rando TA. (2002) Am. J. Phy. Med. Rehabil. 81(11Suppl):S175-86), provocando así la producción de una proteína funcional. El trasplante de las células precursoras (transferencia de mioblasto) también se ha estudiado como un método para restaurar la proteína de distrofina del músculo distrófico (Law PK et al. (1997) Transplant Proc. 29(4):2234-7). Esta técnica está limitada por las dificultades asociadas al tratamiento de grandes volúmenes de músculo con efecto duradero. Un enfoque alternativo consiste en una regulación por aumento de la expresión de una proteína endógena que afecta alguna sustitución funcional (Krag TO, et al. (2001) Acta Physiol Scand. 171: 349-58). Sin embargo, todos estos tratamientos no son efectivos a no ser que la progresión de la afección fibrosa subyacente pueda detenerse o al menos mejorarse de alguna manera.

[0013] El rol crucial del colágeno en la fibrosis ha incitado intentos para desarrollar agentes que inhiban o modulen su acumulación. Algunas enzimas post-transcripcionales únicas de la vía de biosíntesis de colágeno parecen objetivos atractivos para reducir la formación de fibras de colágeno o la acumulación de fibras con propiedades alteradas (Prockop DJ, (1995) Annu Rev Biochem. 64:403-34).

[0014] La mayor desventaja de estos inhibidores es que no son específicos para el tipo de colágeno y pueden inhibir la biosíntesis de otros colágenos provocando serias consecuencias tóxicas.

[0015] Hasta la fecha no existe una terapia efectiva para reducir la fibrosis del músculo esquelético. No se conoce en la actualidad ningún tratamiento que afecte al tejido fibroso sin afectar negativamente la salud del tejido muscular u otras funciones corporales. El único tratamiento que ha mostrado eficacia clínica es un tratamiento de prednisona/prednisolona que provoca un modesto aumento de fuerza, y retrasa, pero no para, el progreso de la enfermedad (Backman, et al. Neuromuscul Disord. 5:233-41 y Dubowitz, (2002) Neuromuscul Disord. 12:113-6).

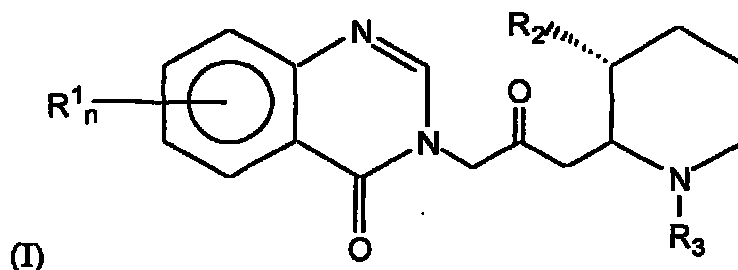
[0016] Por lo tanto, existe una necesidad ampliamente reconocida, que resultaría muy ventajosa, de obtener un método para prevenir o retrasar el desarrollo de la fibrosis del músculo esquelético que acompaña a los trastornos como las distrofias musculares de Duchenne y de Becker y otras distrofias musculares con importante fibrosis, así como para reducir el efecto en los músculos del diafragma con la distrofia muscular de Duchenne.

Derivados de Quinazolinona

[0017] Los derivados de quinazolinona se presentaron por primera vez en la patente Estadounidense Núm. 3.320.124 concedida a American Cyanamid como un tratamiento para la enfermedad parasitaria intestinal, coccidiosis. La halofuginona, (7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidinil)-2-oxo- propil]-4(3H)-quinazolinona), análoga de una planta alcaloide originalmente aislada a partir de la planta *Dichroa febrifuga*, se describió como el derivado preferido de la quinazolinona. Posteriormente, las patentes estadounidenses con números 4.824.847; 4.855.299; 4.861.758 y 5.215.993 hacen todas referencia a las propiedades coccidicidas de la halofuginona.

[0018] Más recientemente, se publicó en la patente estadounidense núm. 5.449.678 que estos derivados de quinazolinona son sorprendentemente útiles para el tratamiento de una afección fibrótica como la esclerodermia

y la enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Esta publicación proporcionaba composiciones de un inhibidor específico comprendiendo una cantidad efectiva terapéuticamente de un compuesto activo farmacéuticamente de la fórmula:



5

donde: $n=1-2$

R_1 es un miembro del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, nitro, benzo, alquilo inferior, fenilo y alcoxi inferior;

10 R_2 es un miembro del grupo que consiste en hidroxilo, acetoxi y alcoxi inferior; y R_3 es un miembro del grupo que consiste en hidrógeno y alquenoxi-carbonylo inferior. También se incluyen las sales farmacológicamente aceptables de los mismos. De este grupo de compuestos, se ha descubierto que la halofuginona es particularmente efectiva para el tratamiento publicado.

15 **[0019]** El potencial clínico de la halofuginona en la terapia anti-fibrótica también se ha descrito en Pines, et al. Drug of the Future 21:569-599 y Pines, et al.(1997) Gen. Pharmac. 30:445-450 y Pines, et al.(2000) Drug Develop. Res. 50, 371-378). La halofuginona, un inhibidor de síntesis de colágeno tipo I descubierto para inhibir la expresión génica del colágeno tipo I, pero no del tipo II (Granot, et al. Biochim Biophys Acta 1156:107-112) o del tipo III (Choi, et al. (1995) Arch Surg 130:257-261).

20 **[0020]** La patente estadounidense núm. 5.891.879 también publica que los derivados de quinazolinona son efectivos al tratar la reestenosis. Las dos afecciones mencionadas anteriormente, la esclerodermia y la enfermedad de injerto contra huésped, se asocian a una deposición excesiva de colágeno, que puede inhibirse mediante halofuginona. La reestenosis se caracteriza por una proliferación de células musculares lisas y la acumulación extracelular dentro del lumen de los vasos sanguíneos afectados como respuesta a una lesión vascular (Choi et al. Arch. Surg., 130:257-261 (1995)). Un contraste de dicha proliferación de células musculares lisas es la alteración fenotípica, de un fenotipo contráctil normal a uno sintético. Se ha demostrado que el colágeno tipo I soporta dicha alteración fenotípica, que puede bloquearse mediante la halofuginona (Choi et al., Arch. Surg., 130: 257-261, (1995); Patente estadounidense núm. 5,449,678).

30 **[0021]** En particular, la acción *in vitro* de la halofuginona no siempre predice los efectos *in vivo*. Por ejemplo, según se demuestra en la patente estadounidense núm. 5.449.678, la halofuginona inhibe la síntesis de colágeno tipo I en condrocitos de hueso *in vitro*. Sin embargo, no se informó de que los pollos tratados con halofuginona tuvieran una tasa mayor de rotura de hueso, indicando que el efecto no se ha visto *in vivo*. Además, pese a que la halofuginona inhibe la síntesis de colágeno mediante fibroblastos *in vitro*, promueve la curación de herida *in vivo* (WO 01/17531). Por lo tanto, el comportamiento exacto de la halofuginona *in vivo* no siempre puede predecirse con exactitud a partir de los estudios *in vitro*.

35 **[0022]** Las composiciones farmacéuticas que contienen quinazolinona, incluyendo halofuginona, se han publicado y reivindicado como efectivas para tratar malignidades (US 6.028.075), para prevenir la neovascularización (US 6.090.814), así como para tratar una fibrosis hepática (US 6.562.829), una fibrosis pulmonar (WO 98/43642) y una fibrosis renal (WO 02/094178), una esclerodermia y una variedad de otras enfermedades serias, exhiben una producción excesiva de tejido conjuntivo, que resulta en la destrucción de la arquitectura y función del tejido normal.

40 **[0023]** WO 00/09070 hace referencia a un método para tratar y prevenir el proceso fibrótico, como consecuencia de respuestas patofisiológicas al trauma tisular, preferiblemente fibrosis cardíaca.

[0024] En la mayoría de los modelos animales de fibrosis, independientemente del tejido, la halofuginona tiene un efecto mínimo sobre el contenido de colágeno en los animales no fibrosos, mientras que muestra un profundo efecto inhibitorio en los órganos fibrosos. Esto sugiere una regulación diferente del bajo nivel de los genes

constitutivos de la expresión del colágeno tipo I por una parte y la sobreexpresión inducida por el estímulo fibrogénico que es normalmente un proceso agresivo y rápido, por otra parte.

Tejido muscular

5 **[0025]** El músculo es un tejido muy especializado que tiene tanto la habilidad de contraer como la habilidad de conducir impulsos eléctricos. Los músculos se clasifican tanto funcionalmente, en voluntarios o involuntarios, como estructuralmente, ya sean estriados o lisos. A partir de esto, emergen tres tipos de músculos: músculo liso (involuntario), músculo esquelético voluntario (voluntario e involuntario) y músculo cardíaco. El músculo esquelético y el cardíaco se llaman músculos estriados por su apariencia rayada bajo el microscopio.

10 **[0026]** El músculo esquelético puede ser un tipo de músculo voluntario o involuntario, siendo innervado por las neuronas que originan desde la rama somática o voluntaria del sistema nervioso, proporcionando un control deliberado de los músculos esqueléticos, o, como es el caso de los músculos de diafragma, estando controlado por nervios eferentes desde el centro respiratorio que pasan por la médula espinal hacia el diafragma.

15 **[0027]** Las células del músculo esquelético son cilindros largos multinucleados, que adquirieron esta característica porque se desarrollan a partir de la fusión de pequeñas células individuales en unidades largas. Las células pueden variar en diámetro, con un promedio entre 100 y 150 micrones. Las células del músculo esquelético son células independientes separadas las unas de las otras por un tejido conjuntivo y cada una debe estimularse mediante axones de una neurona. Todas las células innervadas por ramificaciones de la misma neurona se contraerán a la vez y se les denomina unidad de motor. Las unidades motoras varían su tamaño: las unidades motoras grandes con más de 100 células son típicas de los músculos posturales de acción lenta. Las unidades motoras muy pequeñas con alrededor de 10 células aproximadamente son típicas de los músculos de acción rápida con un control muy preciso como aquellos que mueven el ojo. La mayoría de los músculos humanos tienen una mezcla de unidades motoras de diferentes tamaños.

25 **[0028]** Los músculos esqueléticos tienen diferentes rayas o estrías que les identifican y se relacionan con la organización de los miofilamentos de proteína dentro de la célula. Las células del músculo esquelético se asocian al tipo de célula madre conocida como una célula satélite. Se cree que estas células ayudan a la recuperación de fibras musculares después del daño y pueden contribuir sus núcleos a reemplazar y complementar los núcleos de las células dañadas. Esto ocurre como respuesta a los "microdesgarros" producidos por el ejercicio enérgico y provoca la producción aumentada de proteínas y miofibrillas.

30 **[0029]** Los músculos voluntarios comprenden una variedad de tipos de fibra que se especializan para tareas particulares. La mayoría de los músculos voluntarios contienen una mezcla de tipos de fibra pese a que un tipo puede predominar.

35 **[0030] Tipo 1** o fibras oxidativas, tienen una velocidad de contracción lenta y una baja actividad de miosina-ATPasa. Estas células están especializadas en la actividad estable, continua, altamente resistente a la fatiga. Sus motoneuronas suelen ser activas, con una baja frecuencia de descarga. Estas células son finas (elevada proporción entre el volumen y la superficie) con una buena administración de capilares para un intercambio de gas eficiente. Son ricas en mitocondria y mioglobina, que les proporciona un color rojo. Se producen para el metabolismo aeróbico y prefieren usar grasa como fuente de energía. Estas son las fibras del músculo de un corredor de maratón.

40 **[0031] Tipo 2** o fibras rápidas oxidativas glucolíticas con una velocidad de contracción rápida y una alta actividad de miosina ATPasa. Se consiguen progresivamente cuando se requiere un esfuerzo adicional, pero todavía son muy resistentes a la fatiga. Sus motoneuronas muestran estallidos de actividad intermitente. Estas células son finas (elevada proporción entre el volumen y la superficie) con una buena administración de capilares para un intercambio de gas eficiente. Son ricas en mitocondria y mioglobina, que les proporciona un color rojo. Se producen para un metabolismo aeróbico y pueden utilizar glucosa o grasas como fuente de energía. Estas son las fibras musculares de uso general que dan ventaja en el rendimiento deportivo, pero su funcionamiento resulta más costoso que el tipo 1.

45 **[0032] Tipo 2B** o fibras rápidas glucolíticas con una velocidad de contracción rápida y una alta actividad de miosina-ATPasa. Sólo se consiguen para esfuerzos máximos breves y se fatigan fácilmente. Sus motoneuronas transmiten estallidos ocasionales de impulsos de frecuencia muy alta. Estas células grandes con una pobre proporción entre el volumen y su administración de capilares limitada ralentiza la administración de oxígeno y la eliminación de productos de desecho. Tienen poca mitocondria y poca mioglobina, resultando en un color blanco (p.ej. pechuga de pollo). Generan ATP mediante la fermentación anaeróbica de glucosa al ácido láctido. Estas son fibras de músculo de un corredor sprinter, no se utilizan para el rendimiento sostenido.

[0033] El músculo cardíaco es el músculo que se encuentra en el corazón. Se compone de células mucho más

cortas que las del músculo esquelético que se ramifican para conectarse unas con otras. Estas conexiones se hacen mediante uniones en hendidura llamadas discos intercalados que permiten que un impulso electroquímico pase a todas las células conectadas. Esto provoca que las células formen una red funcional llamada sincitio en la que las células trabajan como una unidad. Muchas células de músculo cardíaco son miogénicas, lo que significa que el impulso se eleva desde el músculo, no desde el sistema nervioso. Esto provoca que el músculo del corazón y el propio corazón lata con su ritmo natural. Pero el sistema nervioso autónomo controla el ritmo del corazón y le permite responder al estrés y otras exigencias. Por ello se dice que el corazón es involuntario.

[0034] El músculo cardíaco tiene un número de características únicas que reflejan su función en el bombeo de la sangre.

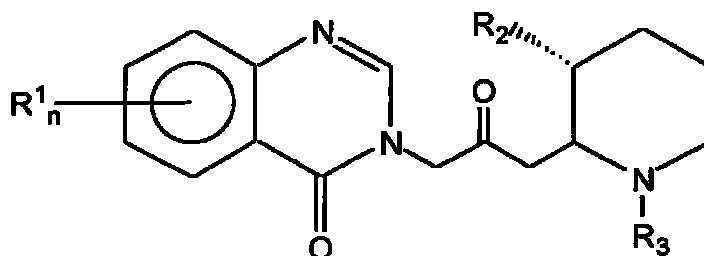
- Las miofibrillas de cada célula (un músculo cardíaco está formado por células individuales - cada una con un núcleo individual) se ramifican.
- Las ramificaciones conectan con aquellas fibras adyacentes a través de la zonula adherens. Estas fuertes uniones permiten al corazón contraerse enérgicamente sin desgarrar las fibras.
- La acción potencial que desencadena el latido del corazón se genera dentro del mismo corazón. Los nervios motores (del sistema nervioso autónomo) controlan el corazón, pero su efecto es sólo modular - aumentar o disminuir - el ritmo intrínseco y la fuerza del latido. Incluso si se destruyen los nervios (como ocurre en un corazón transplantado), el corazón sigue latiendo.
- La acción potencial que impulsa la contracción del corazón pasa de fibra en fibra a través de las uniones en hendidura.

[0035] Debido a las numerosas diferencias estructurales y funcionales entre varios tipos de músculos, el efecto de un ingrediente farmacéuticamente activo en un tipo de músculo particular no puede predecirse con ningún grado de fiabilidad de acuerdo con el efecto de ese ingrediente en un tipo de músculo diferente.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0036] La presente invención aborda con éxito las carencias de los métodos actualmente conocidos para tratar y/o prevenir la fibrosis del músculo esquelético proporcionando composiciones y métodos que comprenden un derivado de quinazolinona.

[0037] Según se utiliza aquí, el derivado de quinazolinona comprende un compuesto con una fórmula:



donde:

R₁ es un miembro del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, nitro, benzo, alquilo inferior, fenilo y alcoxi inferior;

R₂ es un miembro del grupo que consiste en hidroxilo, acetoxi y alcoxi inferior; y R₃ es un miembro del grupo que consiste en hidrógeno y alquenoxy-carbonilo inferior; y n no es ni 1 ni 2; y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

[0038] De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica para tratar y/o evitar y/o al menos reducir la velocidad de progresión de la fibrosis del músculo esquelético en un sujeto que lo necesita, la composición comprendiendo una cantidad efectiva farmacéuticamente de un derivado de quinazolinona y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0039] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica para mejorar la regeneración del músculo esquelético en un sujeto que lo necesita, la composición comprendiendo una cantidad efectiva farmacéuticamente de un derivado de quinazolinona y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

de los mismos; y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0040] Se proporciona un método para reducir la progresión de la fibrosis del músculo esquelético en un sujeto que lo necesita, el método comprendiendo la administración de una cantidad efectiva farmacéuticamente de un derivado de quinazolinona y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0041] Se proporciona un método para mejorar y/o inducir la regeneración del músculo esquelético en un sujeto que lo necesita, la composición del método comprendiendo una cantidad efectiva farmacéuticamente de un derivado de quinazolinona y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; y un portador farmacéuticamente aceptable. La mejora de regeneración del músculo esquelético opcionalmente ocurre al inhibir la vía del TGFβ y/o al inhibir la vía de Miostatina dependiente de Smad3.

[0042] De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona el uso de un derivado de quinazolinona y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; en la elaboración de un medicamento para reducir la progresión de la fibrosis de músculo esquelético en un sujeto que lo necesita.

[0043] De acuerdo con estas características en modos de realización preferidos de la invención abajo descrita, el derivado de quinazolinona es opcional y preferiblemente halofuginona.

[0044] De acuerdo con características adicionales en los modos de realización preferidos descritos, el sujeto que necesita tratamiento con las composiciones y métodos de la presente invención sufre un trastorno que afecta el tejido del músculo esquelético, como, por ejemplo una distrofia muscular, incluyendo la distrofia muscular de Duchenne, la distrofia muscular de Becker, la distrofia muscular de Emery-Dreifuss, la distrofia muscular de cinturas, la distrofia muscular facioescapulohumeral, la distrofia miotónica, la distrofia muscular oculofaríngea, la distrofia muscular distal y la distrofia muscular congénita.

[0045] De manera alternativa, el sujeto puede sufrir atrofia por denervación.

[0046] Opcionalmente, el tejido del músculo esquelético afectado por el trastorno puede comprender el músculo de diafragma.

[0047] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos aquí utilizados tienen el mismo significado según se entiende comúnmente por alguien especializado en la técnica a la que esta invención pertenece. Pese a que pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos aquí descritos en la práctica o el estudio de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen abajo. En caso de conflicto, la especificación de la patente, incluyendo las definiciones, prevalecen. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no tienen carácter limitativo.

[0048] Según se utiliza aquí, el término "tratar" incluye abrogar, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la progresión de una afección, mejorando sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o previniendo sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

[0049] El término "comprendiendo" significa que pueden añadirse otros pasos o ingredientes que no afecten al resultado final. este término abarca los términos "consistiendo en" y "consistiendo esencialmente en".

[0050] La frase "consistiendo esencialmente en" significa que la composición o método puede incluir ingredientes y/o pasos adicionales, pero sólo si los ingredientes y/o pasos adicionales no alteran materialmente las características básicas e innovadoras de la composición o método reivindicada/o.

[0051] El término "método" hace referencia a maneras, medios, técnicas y procedimientos para conseguir una tarea dada incluyendo, sin carácter limitativo, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por, o fácilmente desarrollados de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por, los practicantes de las artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

[0052] El término "ingrediente activo" hace referencia a un agente farmacológico incluyendo cualquier sustancia química natural o sintética que tras su aplicación tiene, como mínimo, al menos un efecto farmacéutico o terapéutico deseado.

[0053] El término "cantidad efectiva terapéuticamente" o "cantidad efectiva farmacéuticamente" denota esa dosis de un ingrediente activo o una composición comprendiendo el ingrediente activo que proporcionará el efecto terapéutico para el que se indica el ingrediente activo.

[0054] Según se utiliza aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia

reguladora del gobierno federal o estatal o enlistado en la Farmacopea de Estados Unidos u otras farmacopeas generalmente reconocidas para su uso con animales, y más en particular con humanos. Aquí, las frases "portador fisiológicamente adecuado" y "portador farmacéuticamente aceptable" se utilizan de manera intercambiable y hacen referencia a un portador aprobado o un diluyente que no provoca una irritación significativa a un organismo y no abroga la actividad biológica y las propiedades del conjugado administrado.

[0055] Según se utiliza aquí, el término "portador" hace referencia a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el fármaco.

[0056] Aquí el término "excipiente" hace referencia a una sustancia inerte añadida a la composición farmacéutica para facilitar más los procesos y la administración de los ingredientes activos.

[0057] Según se utiliza aquí, la forma singular "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

[0058] A lo largo de esta publicación, varios aspectos de esta invención pueden presentarse en un formato de rango. Debería entenderse que la descripción en un formato de rango es simplemente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. En consecuencia, debería considerarse que la descripción de un formato de rango ha publicado específicamente todos los subrangos posibles así como valores numéricos individuales dentro del rango. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un rango de 1 a 6 ha publicado específicamente subrangos como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente al ancho del rango.

[0059] Siempre que se indique un rango numérico, se pretende incluir cualquier numeral citado (fraccionario o integral) dentro del rango indicado. Las frases "oscila/oscilando entre" un primer número indicador y un segundo número indicador y "oscilando/oscila desde" un primer número indicador "hasta" un segundo número indicador se utilizan aquí de manera intercambiable y se pretende que incluyan el primer y el segundo número indicado y todos los numerales fraccionarios e integrales en medio.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0060] La invención se describe aquí, sólo como modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca entendiéndose que los particulares mostrados sirven solo como ejemplo y con el objetivo de ilustrar la exposición de los modos de realización preferidos de la presente invención, y se presentan con la intención de proporcionar lo que se cree como la descripción entendida como más útil y rápida de la descripción, así como los principios y los aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se realiza ningún intento para mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle que el necesario para un entendimiento fundamental de la invención, la descripción tomada con los dibujos haciendo evidente para aquellos expertos en la técnica cómo deben realizarse las diferentes formas de la invención en la práctica.

[0061] En los dibujos:

La Fig 1 muestra el efecto de la halofuginona sobre la fibrosis y la miogénesis a través de las vías dependientes de Smad3;

La Fig. 2 presenta los resultados de la tinción con rojo Sirio del contenido de colágeno y la hibridación *in situ* de la expresión génica del colágeno $\alpha 1(I)$ en ratones *mdx* y los grupos de control C57B, en presencia y ausencia de halofuginona;

La Fig. 3 es un gráfico de barras demostrando el efecto de la halofuginona en la fibrosis muscular utilizando la tinción y cuantificación mediante el análisis de las imágenes; y

La Fig. 4 es un gráfico de barras ilustrando una regeneración muscular después del tratamiento de halofuginona.

DESCRIPCIÓN DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN PREFERIDOS

[0062] La presente invención es de un método y composición farmacéutica para tratar o prevenir la fibrosis de músculo esquelético en un sujeto, o al menos reducir la progresión de la misma, utilizando un derivado de quinazolinona, preferiblemente de halofuginona. De acuerdo a los modos de realización preferidos, la presente invención hace referencia a un método y composiciones farmacéuticas para al menos reducir la pérdida

progresiva de la fuerza y/o función muscular asociada con la fibrosis de músculo esquelético en un sujeto. Opcional y preferiblemente, dicha al menos reducción de la pérdida progresiva de la fuerza y/o función muscular y/o el tratamiento y/o prevención se dan en un sujeto que sufre fibrosis del músculo esquelético asociada con una enfermedad que directa o indirectamente provoca dicha fibrosis, incluyendo, sin carácter limitativo, la

5 distrofia muscular o atrofia por denervación. La distrofia muscular incluye la distrofia muscular de Duchenne, la distrofia muscular de Becker, la distrofia muscular de Emery-Dreifuss, la distrofia muscular de cinturas, la distrofia muscular facioescapulohumeral (también conocida como de Landouzy-Dejerine) la distrofia miotónica, la distrofia muscular oculofaríngea, la distrofia muscular distal y la distrofia muscular congénita.

10 **[0063]** Sorprendentemente, de acuerdo con modos de realización preferidos de la presente invención, un derivado de quinazolinona, preferiblemente halofuginona, puede utilizarse opcional y preferiblemente al menos para retrasar la progresión de fibrosis del diafragma en un sujeto que sufre una enfermedad que afecta a este músculo involuntario incluyendo, pero no limitándose a, la distrofia muscular de Duchenne. Más preferiblemente, la presente invención hace referencia al tratamiento y/o prevención de la fibrosis del diafragma de un sujeto que sufre dicha enfermedad.

15 **[0064]** De acuerdo con modos de realización preferidos de la presente invención y según se demuestra más adelante, uno o más tipos de células musculares pueden opcional y preferiblemente ser capaz de regenerarse ellas mismas como resultado de la administración de un derivado de quinazolinona, preferiblemente halofuginona, a un sujeto que lo necesita.

20 **[0065]** Los principios y funcionamiento de las composiciones y métodos de acuerdo con la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntos.

25 **[0066]** Antes de explicar al menos un modo de realización de la invención con detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles presentados en la siguiente descripción o ejemplificados en los Ejemplos. La invención puede tener otros modos de realización o practicarse o llevarse a cabo de diferentes maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y la terminología aquí empleada tiene el propósito de describir y no debería entenderse con carácter limitativo.

30 **[0067]** La miostatina es un miembro de la familia del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) que juega un papel esencial al regular el crecimiento del músculo esquelético, inhibiendo la proliferación y diferenciación de mieloblastos, mediante la inhibición de genes de miogenina de MyoD específicos de los músculos. La señalización se produce mediante la activación de proteínas Smad3 (Langley, et al. (2002) J Biol Chem. 277: 49831-40 y Zhang, et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:39237-45 and Zhu, et al. (2004) Cytokine. 26(6):262-72; Fig. 1).

[0068] TGF β es el mayor estimulador de síntesis de colágeno, particularmente colágeno tipo I, en fibroblastos que conducen a la fibrosis. La correlación inversa entre fibrosis y formación muscular en la distrofia ha sido demostrada (Wanger, et al. (2002) Ann Neurol. 52:832-6).

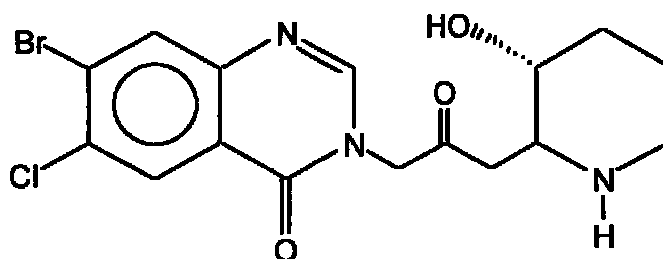
35 **[0069]** Se ha demostrado que la halofuginona, un inhibidor de actividad Smad3 (McGaha, et al. (2002) J Invest Dermatol. 118(3):461-70), es un potente inhibidor de fibrosis debido a su efecto en la biosíntesis de colágeno y la degradación en variedad de tejidos (Levi-Schaffer, et al. (1996) J Invest Dermatol 106:84-88). Los tipos de tejido estudiados no incluían el músculo esquelético. Además, la técnica anterior no muestra el uso de halofuginona en la regeneración del músculo.

40 **[0070]** Los experimentos preliminares de los inventores presentes han demostrado una inhibición dependiente de halofuginona en la expresión génica de la miostatina en un hígado fibroso. La halofuginona es hasta la fecha el único inhibidor específico del colágeno tipo en el nivel transcripcional. La inhibición de síntesis de colágeno en el nivel transcripcional es más efectiva que intentar tratar las consecuencias de la sobreproducción de colágeno, que es el objetivo de otros fármacos antifibrosis.

45 **[0071]** Debido a las numerosas diferencias estructurales y funcionales entre varios tipos de músculos, el efecto de un ingrediente farmacéuticamente activo en un tipo de músculo particular no puede predecirse con ningún grado de fiabilidad.

50 **[0072]** Por lo tanto, se creyó que la halofuginona podría mejorar la integridad del músculo esquelético e inhibir la fibrosis en un sujeto, como consecuencia de su efecto combinado en la inhibición de síntesis de colágeno tipo I, aumentar la degradación de colágeno y mejorar la regeneración muscular al inhibir secuencias de TGF β y miostatina dependientes de Smad3, como se muestra en la Fig. 1. Además, la halofuginona puede inhibir la expresión génica de miostatina en el músculo según se mostró en otros tejidos provocando un mayor aumento en la regeneración muscular.

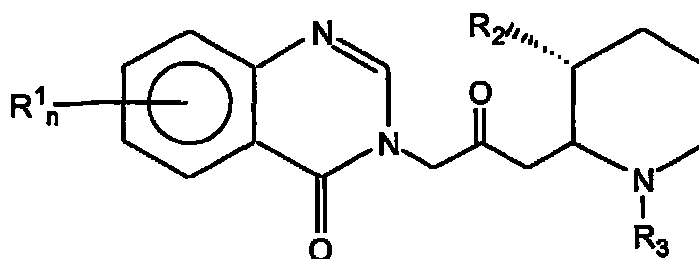
[0073] De aquí en adelante, el término "halofuginona" se define por un compuesto con una fórmula:



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

[0074] La frase "sal farmacéuticamente aceptable" hace referencia a una especie cargada de un compuesto pariente y su contraión, que se utiliza típicamente para modificar las características de solubilidad del compuesto pariente y/o para reducir cualquier irritación significativa provocada a un organismo mediante el compuesto pariente, a la vez que no abroga la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado.

[0075] Pese a que como derivado específico de quinazolinona se menciona la "halofuginona" a lo largo de la especificación, se entiende que otros derivados de la quinazolinona pueden utilizarse en su lugar, teniendo estos derivados la fórmula general:



donde: $n=1-2$

R_1 es un miembro del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, nitro, benzo, alquilo inferior, fenilo y alcoxi inferior;

R_2 es un miembro de un grupo que consiste en hidroxilo, acetoxi y alcoxi inferior; y

R_3 es un miembro del grupo que consiste en hidrógeno y alquenoxi-carbonilo inferior y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

[0076] Los términos "fibrosis de músculo esquelético" "fibrosis muscular" y "fibrosis" se utilizan aquí para referirse a un fenómeno que ocurre frecuentemente en un músculo enfermo o dañado, caracterizado por el crecimiento excesivo de un tejido fibroso y una deficiencia de la función muscular.

[0077] De aquí en adelante, el término "un sujeto" hace referencia a un ser humano o animal al que se le administra halofuginona.

[0078] El término "reducir el alcance de" incluye tanto prevenir sustancialmente el proceso de la fibrosis de músculo esquelético desde el comienzo como ralentizar o parar la progresión de la fibrosis del músculo esquelético una vez que se ha presentado.

[0079] Los compuestos destinados a la inhibición de la fibrosis de músculo esquelético se probaron con un modelo *in vivo* por su habilidad para ralentizar o parar el proceso patológico que lleva a la deposición del tejido fibroso. Dichos experimentos se llevaron a cabo para el inhibidor de la síntesis de colágeno tipo I, la halofuginona según se describe con mayor detalle en la sección Ejemplos más adelante.

[0080] Se eligió el ratón *mdx* como modelo para evaluar la eficacia de la halofuginona en la prevención y el

tratamiento de la distrofia al inhibir la fibrosis muscular (disminuyendo la síntesis de colágeno y aumentando la degradación de colágeno) y retrasando la degradación muscular, y mejorando la regeneración muscular al inhibir la señalización de miostatina.

5 **[0081]** Según se muestra en la sección de Ejemplos más adelante, se demostró que la halofuginona es altamente eficaz reduciendo el alcance de la fibrosis de músculo esquelético, y mejorando la regeneración del músculo esquelético, tanto en el músculo esquelético como en músculos del diafragma.

[0082] La presente invención proporciona por lo tanto una composición farmacéutica comprendiendo un derivado de quinazolinona, como la halofuginona, para reducir el alcance de la fibrosis de músculo esquelético y para mejorar la regeneración del músculo esquelético.

10 **[0083]** La composición farmacéutica de la presente invención comprende, además del derivado de quinazolinona, un portador farmacéuticamente aceptable, y también puede comprender opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, como, por ejemplo, agentes aglutinantes, estabilizadores, diluyentes, tensoactivos, y odorizantes.

15 **[0084]** Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo aquellos procedentes del petróleo, de origen animal o sintético, como el aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es el portador preferido cuando la composición se administra de manera intravenosa. Las soluciones salinas y soluciones de dextrosa y glicerol acuoso también pueden emplearse como portadores de líquido particularmente para soluciones inyectables.

20 **[0085]** Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden elaborarse mediante procesos conocidos en la técnica, p.ej., mediante los procesos de mezcla, disolución, granulado, elaboración de gragea, pulverización, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales. Pueden encontrarse técnicas adicionales para la formulación y administración de ingredientes activos en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, que se incorpora aquí como referencia como anexo a la presente solicitud. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas para su uso de
25 acuerdo con la presente invención pueden formularse de manera convencional utilizando uno o más portadores farmacéuticamente aceptables comprendiendo excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de ingredientes activos en preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

30 **[0086]** La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por cualquier vía seleccionada desde la vía oral, parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intranasal, intraauricular, sublingual, rectal, transmucosa, intestinal, intraauricular, bucal, intramedular, intratecal, intraventricular directa, intraperitoneal, o intraocular. Preferiblemente, la administración es a través de las vías oral o parental.

35 **[0087]** De aquí en adelante, el término "administración oral" incluye, sin carácter limitativo, la administración por la boca para la absorción a través del tracto gastrointestinal, la administración bucal y la administración sublingual.

[0088] Para la administración oral, los ingredientes activos pueden formularse fácilmente combinando los ingredientes activos con portadores farmacológicamente aceptables conocidos en la técnica. Dichos portadores permiten a los ingredientes activos de la invención formularse como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, licuados, polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en medio acuoso o no acuoso y
40 similares para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden realizarse utilizando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir auxiliares adecuados si se desea, para obtener núcleos de grageas o comprimidos. Pueden ser deseables excipientes adecuados como espesantes, diluyentes, saborizantes, auxiliares de dispersión, emulsionantes, aglutinantes o conservantes.

45 **[0089]** Los núcleos de gragea se suministran con revestimientos adecuados. Con este propósito, pueden utilizarse soluciones concentradas de azúcar que opcionalmente contienen goma arábiga, talco, pirrolidona de polivinilo, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas disolventes. Los colorantes o pigmentos pueden añadirse al revestimiento de los comprimidos o grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de
50 ingredientes activos.

[0090] Las composiciones farmacéuticas, que pueden utilizarse oralmente, incluyen cápsulas duras elaboradas con gelatina así como cápsulas blandas, cápsulas cerradas hechas de gelatina y un plastificante, como el glicerol o el sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener ingredientes activos en la mezcla con rellenos como la lactosa, aglutinantes como el almidón, lubricantes como el talco o el estearato de magnesio y, opcionalmente,

estabilizadores. En cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deberían estar en dosis adecuadas según la vía de administración elegida.

5 **[0091]** El término "administración parenteral" incluye, sin carácter limitativo, administración mediante goteo intravenoso o inyección en bolo, subcutáneo, o inyección intra muscular. Las formulaciones de administración parenteral pueden presentarse en forma de dosis de unidad, p.ej., en ampollas o en recipientes multidosis con conservantes opcionalmente añadidos. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos portadores aceitosos o acuosos y pueden contener agentes formuladores como agentes de
10 suspensión, estabilizadores y/o dispersantes.

[0092] Las composiciones farmacológicas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los ingredientes activos pueden prepararse como suspensiones de inyección oleica. Los solventes o vehículos portadores lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos como el aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos como el oleato de etilo, los triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

20 **[0093]** La dosis puede variar dependiendo de las formas farmacéuticas empleadas y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis pueden elegirse por el propio médico al ver la condición del paciente. (Véase p.ej., Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap.1 pág.1).

[0094] Las composiciones de la presente invención pueden, si se desea, presentarse en un paquete o dispositivo dispensador, como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas farmacéuticas de unidad
25 conteniendo el ingrediente activo. El paquete puede, por ejemplo, comprender una lámina de plástico o metálica, como un blíster. El paquete o el dispositivo dispensador puede ir acompañado por instrucciones para su administración. El paquete o dispensador también puede estar acompañado de un aviso con referencia al recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de fármacos, cuyo aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o la
30 administración a seres humanos o animales. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser una etiqueta aprobada por la Agencia de Alimentos y Medicamentos Estadounidense para la prescripción de fármacos o la introducción de un producto aprobado.

[0095] Los objetos adicionales, ventajas y características novedosas de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras el análisis de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitadores.
35 Adicionalmente, cada uno de los diferentes modos de realización y aspectos de la presente invención, según se describen más arriba y según se reivindica en la sección de reivindicaciones abajo, encuentra un apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

40 **[0096]** Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, los que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención con un carácter no limitativo.

Ejemplo 1: Contenido de la expresión génica de colágeno $\alpha 1$ (I) en los músculos cuádriceps y tibial

[0097] Los ratones *mdx* se trataron con halofuginona mediante una inyección intraperitoneal cada dos días (3µg/ratón) empezando a las 5 semanas de edad durante 4 semanas, o con un vehículo portador salino. Los ratones C57B se utilizaron como grupos de control.

45 **[0098]** Al acabar el periodo de 4 semanas, los músculos tibial anterior (rápido) y cuádriceps (lento) se extrajeron para la evaluación de la fibrosis por la tinción con rojo Sirio del contenido de colágeno y mediante la hibridación *in situ* de la expresión génica del colágeno $\alpha 1$ (I).

Ejemplo 2: Efecto de la halofuginona sobre la fibrosis en los músculos de diafragma, gastrocnemio y tibial

50 **[0099]** La halofuginona se administra mediante una inyección intraperitoneal a los ratones *mdx* (n=7) desde las 3 semanas de edad cada dos días con una concentración de 5µg/ratón. Los ratones de tipo salvaje (C57/BL) y *mdx* sin halofuginona sirvieron como grupos de control. A la edad de 7 a 11 semanas los ratones se sacrificaron y el

diafragma, el gastrocnemio y el tibial se fijaron para histología y se congelaron muestras para análisis más detallados. Las secciones se tiñeron para el colágeno con rojo Sirio y con verde de metilo como contratinción. El análisis de las imágenes utilizando el software Image Pro se llevó a cabo para la evaluación estadística del efecto de la halofuginona en contenido colágeno. Para el análisis de las imágenes, se tomaron imágenes de 3 animales/grupos y 4 copias de cada animal/tejido. Los resultados son la proporción entre el color rojo (R) y el verde (V).

Ejemplo 3: Efecto de la halofuginona en la regeneración muscular

[0100] Los ratones *mdx* se trataron con halofuginona 5µg o 7.5µg durante 1 o 2 meses empezando a la edad de 3 semanas. Los ratones *mdx* sin tratar sirvieron como grupos de control. Al final del experimento, los diafragmas se tomaron para su tinción con hematoxilina y eosina antes del recuento de núcleos centrales. Los resultados son la media ±SE de 20 fotos tomadas de 3 ratones diferentes. Cada foto contenía aproximadamente 120 fibras.

Resultados

[0101] Según se muestra en la Fig. 2, los músculos cuádriceps (lento) y tibial (rápido) de los grupos de control C57B mostraron casi ninguna célula expresando el gen de colágeno α1(I), y se observaron niveles bajos de colágeno alrededor de las fibras. Se observó un aumento significativo tanto en la expresión génica de colágeno α1(I) como en la cantidad de fibras de colágeno en los músculos cuádriceps y tibial de los *mdx* comparados con los grupos de control. Este aumento se previno casi por completo con el tratamiento de halofuginona.

[0102] La fig. 3 demuestra que en los ratones de tipo salvaje, el nivel de colágeno era bajo en el diafragma, el gastrocnemio y el tibial mientras que en los ratones *mdx*, se observó un aumento en el contenido de colágeno en todos los músculos. El aumento principal se observó en el diafragma; esto ya era evidente a las 3 semanas de edad y se alcanzó un incremento de 9 y 15 múltiplos comparado con el tipo salvaje a la 7 y 11 semanas, respectivamente. En el gastrocnemio, se observó un aumento en el contenido de colágeno a las 3 semanas de edad con un aumento adicional a las 7 semanas. Con más edad, se observó una disminución en el contenido de colágeno pese a que el nivel todavía era mayor al que tenían los ratones de tipo salvaje. Sólo se observó un aumento diminuto en el colágeno en el tibial. En el diafragma, la halofuginona redujo los niveles de colágeno en un 25% a las 7 semanas (4 semanas de tratamiento) y en un 53% a las 11 semanas (8 semanas de tratamiento). En el gastrocnemio, la halofuginona redujo el contenido de colágeno en un 25% y un 33% a las 7 y 11 semanas, respectivamente. No se observó un efecto de la halofuginona en el contenido de colágeno en el músculo tibial.

[0103] La fig. 4 muestra el efecto de la halofuginona 5µg (morado) o 7.5µg (blanquecino) en la regeneración muscular, con los ratones *mdx* sin tratar (azul) como grupo de control. En los ratones de tipo salvaje, el núcleo de cada fibra muscular se sitúa en la periferia de la célula. En los ratones *mdx* se observan pequeñas fibras inmaduras centralmente nucleadas, reflejando la regeneración muscular desde los mioblastos que provocan un equilibrio entre los procesos necróticos y regenerativos en la fase temprana de la enfermedad. Después del tratamiento con halofuginona se observó una reducción importante dependiente de la dosis en el número de núcleos centrales del diafragma. Estos resultados sugieren que la halofuginona mejoró la fisiología muscular y redujo la presión en los músculos de los ratones *mdx* para regenerarse.

Análisis

[0104] En las diferentes distrofias musculares y síndromes distróficos, los diferentes tipos de músculo se ven afectados por la fibrosis en un grado diferente. En el ratón *mdx*, que sirve como modelo de la distrofia muscular de Duchenne (DMD), el músculo más afectado es el diafragma pese a que otros músculos también se ven afectados. En consecuencia, el mayor efecto de la halofuginona en ratones *mdx* se observó en cuanto a los músculos del diafragma fibroso, resultando en una inhibición de fibrosis y del proceso fibroso del 53%.

[0105] En conjunto, los resultados anteriores sugieren que la halofuginona es un potente inhibidor de fibrosis muscular en los ratones *mdx* inhibiendo síntesis de colágeno tipo I y puede inhibir la necesidad de degeneración muscular inhibiendo la vía de miostatina.

[0106] Los resultados anteriores muestran adicionalmente que el alcance de la inhibición de fibrosis mediante halofuginona es dependiente del alcance de la fibrosis. Se ha observado que la halofuginona inhibe la fibrosis mediante la inhibición de síntesis de colágeno en cada músculo que se ve afectado por la fibrosis, pero en músculos en los que sólo ocurre aumento diminuto en la síntesis de colágeno, la inhibición de síntesis de colágeno provocada por la halofuginona puede no ser claramente demostrable en el contexto del experimento, por ejemplo durante el periodo de tiempo probado.

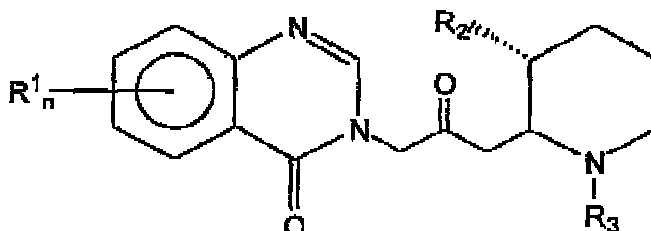
[0107] Se aprecia que varias características de la invención, descritas para ofrecer mayor claridad, en el contexto de modos de realización separados, también pueden proporcionarse en combinación en un único modo de

realización. Por el contrario, varias características de la invención, que, para mayor concisión, se describen en el contexto de un único modo de realización, también pueden proporcionarse de manera separada o en cualquier subcombinación adecuada.

- 5 **[0108]** Pese a que la invención se ha descrito junto con modos de realización específicos de la misma, es obvio que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. Por lo tanto, se pretenden abarcar todas estas alternativas, modificaciones y variaciones que caen dentro del amplio ámbito y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Reivindicaciones

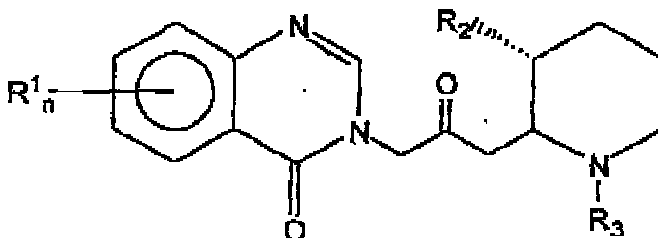
1. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o su uso en la prevención de la fibrosis de los músculos esqueléticos en un sujeto que lo necesita, la composición comprendiendo una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, el compuesto con una fórmula:



donde: n es o bien 1 o 2;

R_1 es un miembro en el grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, nitro, benzo, alquilo inferior, fenilo y alcoxi inferior; R_2 es un miembro del grupo que consiste en hidroxilo, acetoxi y alcoxi inferior; y R_3 es un miembro del grupo que consiste en hidrógeno y alquenoxi-carbonilo inferior y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

2. Composición farmacéutica para su uso en la mejora o la inducción de la regeneración de los músculos esqueléticos en un sujeto que lo necesita, la composición comprendiendo una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, el compuesto con una fórmula:



donde es o bien 1 o 2;

R_1 es un miembro del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, nitro, benzo, alquilo inferior, fenilo y alcoxi inferior;

R_2 es un miembro del grupo que consiste en hidroxilo, acetoxi y alcoxi inferior; y R_3 es un miembro del grupo que consiste en hidrógeno y alquenoxi-carbonilo inferior y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

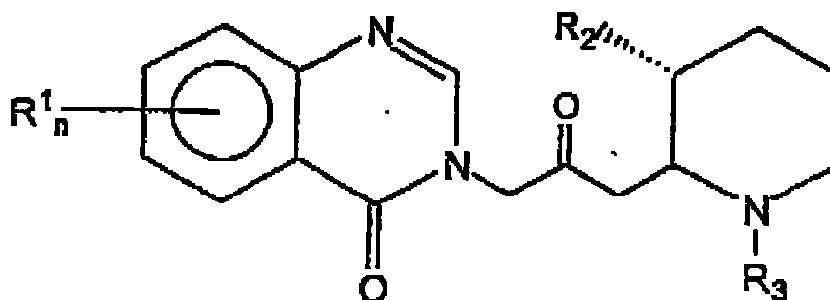
3. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho compuesto es halofuginona.
4. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 3, en la que dicho sujeto sufre un trastorno que engloba un tejido de músculo esquelético.
5. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 3 y 4, en la que dicho trastorno es una distrofia muscular.
6. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicha distrofia muscular se selecciona del grupo que consiste en distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular de cinturas, distrofia muscular

facioescapulohumeral, distrofia miotónica, distrofia muscular oculofaringea, distrofia muscular distal, miopatía de Miyoshi y distrofia muscular congénita.

7. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho trastorno es una atrofia por denervación.

8. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho tejido de músculo esquelético es el músculo de diafragma.

9. El uso de un compuesto con una fórmula:



donde: n es o bien 1 o 2;

R_1 es un miembro del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, nitro, benzo, alquilo inferior, fenilo y alcoxi inferior; R_2 es un miembro del grupo que consiste en hidroxilo, acetoxi y alcoxi inferior; y R_3 es un miembro del grupo que consiste en hidrógeno y alquenoxi-carbonilo inferior y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

en la elaboración de un medicamento para reducir la progresión de la fibrosis de los músculos esqueléticos en un sujeto que lo necesita.

10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho compuesto es halofuginona.

11. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho sujeto sufre un trastorno que afecta a un tejido de músculo esquelético.

12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho trastorno es una disfrofia muscular.

13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicha distrofia muscular se selecciona del grupo que consiste en distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular de cinturas, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia miotónica, distrofia muscular oculofaringea, distrofia muscular distal, miopatía de Miyoshi y distrofia muscular congénita.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho trastorno es una atrofia por denervación.

15. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho tejido de músculo esquelético es el músculo de diafragma.

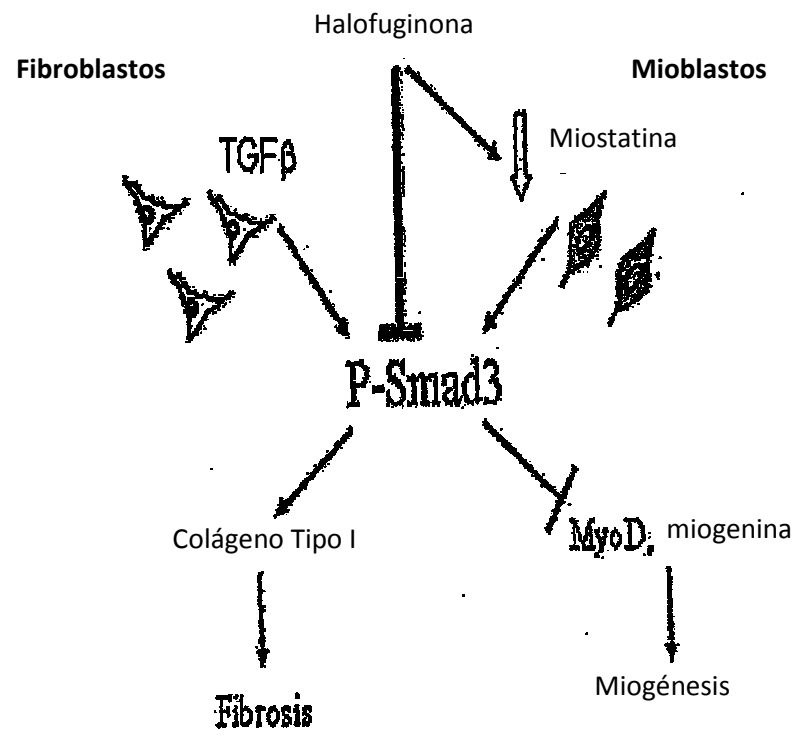


FIGURA 1

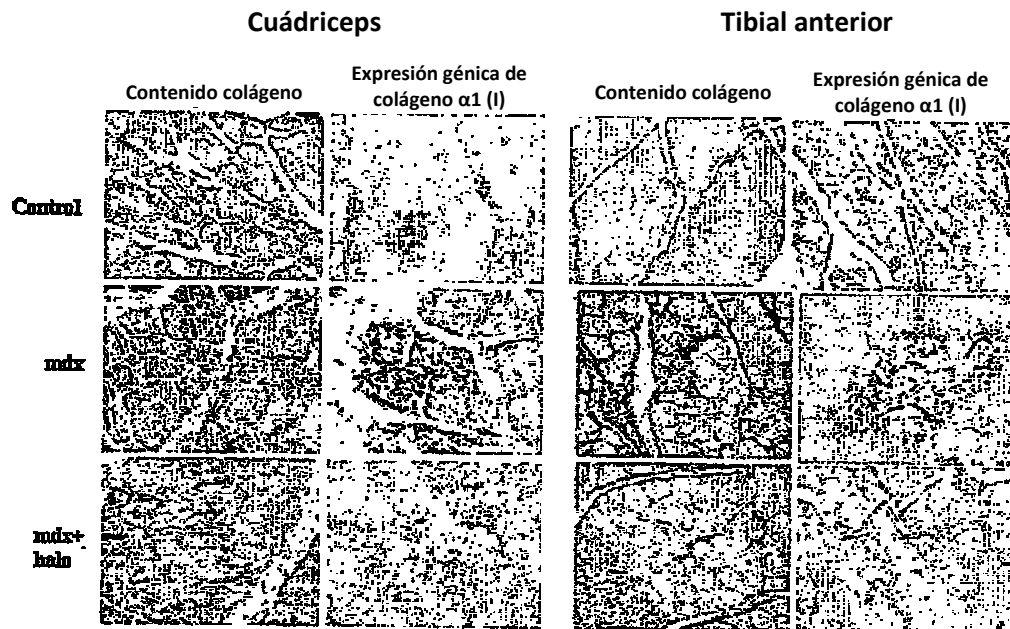


FIGURA 2

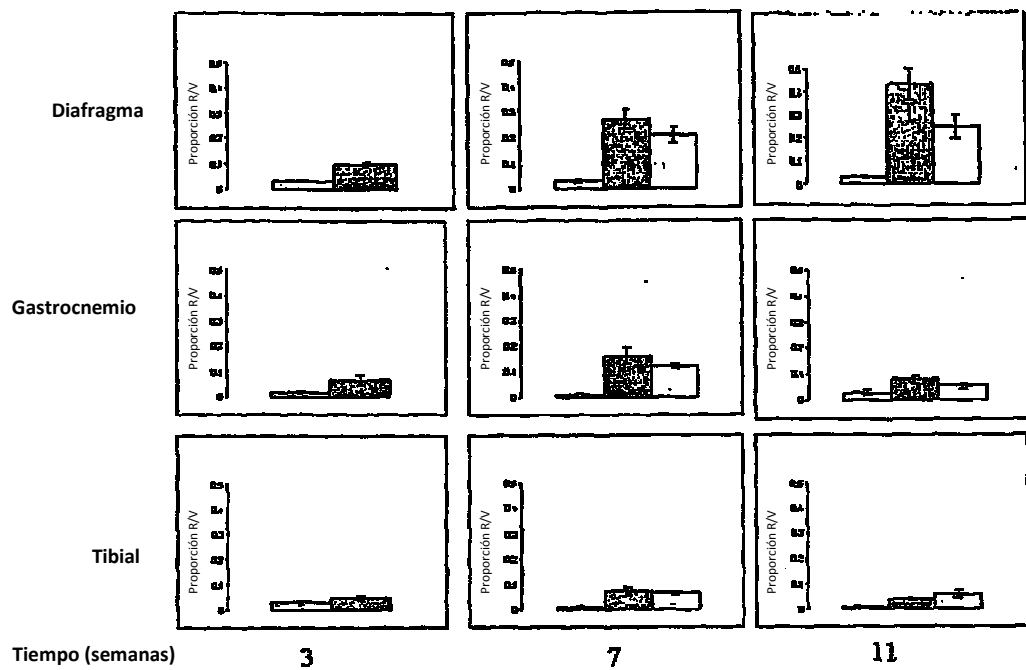


FIGURA 3

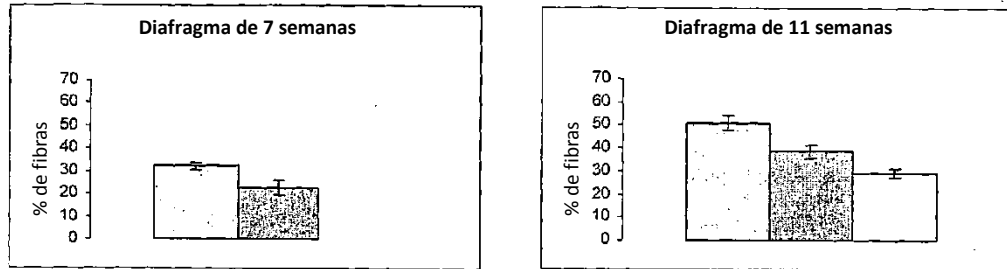


FIGURA 4