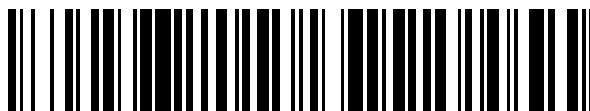


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 710**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/13** (2006.01)

**A61P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2009 E 09707226 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2249860**

54 Título: **Ciclosporina no inmunosupresora para el tratamiento de distrofia muscular del anillo óseo**

30 Prioridad:

**08.02.2008 WO PCT/IB2008/000292**

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

**08.02.2016**

73 Titular/es:

**DEBIOPHARM INTERNATIONAL SA (100.0%)  
Forum "après-demain" Chemin Messidor 5-7  
1002 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**MOLKENTIN, JEFFERY D.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 558 710 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

Ciclosporina no inmunosupresora para el tratamiento de distrofia muscular del anillo óseo

La presente invención se refiere al uso de un derivado de ciclosporina A no inmunosupresor para reducir la inducción de necrosis miofibrilar y degeneración miofibrilar en un enfermo diagnosticado de distrofia muscular del anillo óseo (LGMD, por sus siglas en inglés), en particular sarcoglicanopatía.

Las distrofias musculares (MD, por sus siglas en inglés) comprenden un grupo diverso de trastornos hereditarios que afectan principalmente al tejido muscular estriado que dan como resultado debilidad muscular progresiva, consunción y, en muchos casos, muerte prematura. Muchas mutaciones caracterizadas que están relacionadas causalmente con la MD en seres humanos están asociadas con alteraciones en las proteínas de unión estructurales que fijan las proteínas contráctiles subyacentes a la lámina basal, proporcionando rigidez a la membrana del músculo esquelético (sarcolema), o en proteínas que estabilizan o reparan directamente la membrana celular, tales como, p. ej., sarcoglicano o distrofina.

Las mutaciones hereditarias de genes de sarcoglicano (genes de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -sarcoglicano) provocan una enfermedad musculoesquelética con síndromes heterogéneos, LGMD y uno de sus subgrupos, las sarcoglicanopatías. Los síndromes o fenotipos de las sarcoglicanopatías dependen de qué gen del sarcoglicano se mute y del tipo de mutaciones genéticas (variante alélica), y muestran cuatro formas de trastornos específicos: de LGMD tipos 2C, 2D, 2E y 2F (mutaciones de genes de  $\gamma$ -,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\delta$ -sarcoglicano, respectivamente) que representan 25% de todos los casos de LGMD diagnosticados. En particular, las diferentes mutaciones observadas específicamente en el gen de  $\delta$ -sarcoglicano pueden dar como resultado el trastorno grave de LGMD tipo 2F o LGMD2F (Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] N° 601287, genetic mutations: [OMIM] 601411. Emery et al., The Lancet, 2002, 359:687-695).

Los diferentes tipos de LGMD se caracterizan por consunción y debilidad progresivas con atrofia que implica predominantemente a los músculos de los brazos y las piernas próximos al hombro y la cadera, respectivamente. Los fenotipos patológicos se asemejan a los de los síndromes de distrofia muscular tipo Duchenne o tipo Becker graves. Sin embargo, las últimas enfermedades implican diferentes mecanismos moleculares y trastornos genéticos. Antes de que estuvieran disponibles diagnósticos de LGMD, los pacientes con LGMD a menudo fueron diagnosticados de distrofia muscular de Duchenne. El comienzo de la enfermedad varía de la primera infancia a la edad adulta con formas clínicas de leves a graves. Hasta 25% de pacientes muestran formas graves de la enfermedad, desarrollando lordosis lumbar grave, contracturas de los tendones de Aquiles, hipertrofia muscular, cardiomiopatía y defectos de la conducción cardíaca. La hipertrofia de las pantorrillas o la lengua, la selectividad de la implicación muscular y complicaciones cardíacas tardías están asociadas más o menos específicamente con cada una de las diferentes formas (Danièle et al., Int J. Biochem Cell Biol., 2007; 39:1608-1624). La debilidad progresiva conduce a enfermedad pulmonar restrictiva e hipoventilación que requiere ventilación asistida. En general, las tasas de morbilidad y mortalidad varían. Con un comienzo temprano, la progresión de la enfermedad hasta la muerte típicamente es muy rápida. A menudo, la muerte es una consecuencia de las complicaciones respiratorias.

Hasta la fecha, no está disponible un tratamiento específico para pacientes que sufren cualquiera de los síndromes de LGMD. Un mantenimiento agresivo, p. ej., ortopedia, cirugía y terapia física para preservar la función muscular, maximiza la capacidad funcional y prolonga la esperanza de vida. Sin embargo, estas medidas no pueden evitar la degeneración miofibrilar y la presencia posterior de complicaciones respiratorias.

Con el desarrollo de modelos animales que carecen de genes específicos implicados en la distrofia muscular, está disponible una mejor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a las sarcoglicanopatías. Recientemente, se ha observado que las células musculares de ratones que carecen de  $\delta$ -sarcoglicano (ratones *scgd*<sup>-/-</sup>) debido a una desactivación dirigida del gen de  $\delta$ -sarcoglicano (*scgd*) son propensas a un incremento en el flujo celular de calcio. Se supone que la pérdida de componentes del complejo distrofina-glicoproteína (DGC) tal como complejo de distrofina o sarcoglicano da como resultado una alteración fundamental de las propiedades físicas de la membrana de las células musculares y un incremento de la permeabilidad y la penetrabilidad del sarcolema. La activación de los canales de flujo de calcio desregulados provocada por la inestabilidad y la fragilidad de la membrana puede iniciar una enfermedad distrófica en el músculo esquelético que conduce a degeneración miofibrilar e inducción de necrosis miofibrilar.

Parsons et al. (J. Biol. Chem., 2007, 282: 10068-10078) mostraron que la inhibición de la actividad de la serina/treonina proteína fosfatasa calcineurina activada por calcio/calmodulina (calcineurina) mediante eliminación genética disminuía la degeneración y la inflamación musculoesquelética y miofibrilar en ratones *scgd*<sup>-/-</sup>, y era citoprotectora. No se observaron mejoras análogas en la enfermedad después de la inhibición de la actividad de calcineurina en ratones que carecían del gen *mdx* (mutación del gen de distrofina) usados como modelo para la distrofia muscular de Duchenne aunque se observó un incremento del flujo de calcio en ambos modelos de distrofia muscular. De hecho, un transgén activado para calcineurina protegía a ratones *mdx* (Chakkalakal et al., Hum. Mol. Genet., 2004, 13: 379-399; Stupka et al. Acta Neuropathol., 2004, 107: 299-310, pero véase De Luca et al., Am. J.

Pathol., 2005, 166: 477-489). Parsons et al. identificaron la calcineurina como un objetivo potencial para la terapia de la LGMD. Basándose en sus observaciones, Parsons et al. sugirieron que la inhibición de la actividad de calcineurina puede proporcionar algún beneficio en tipos seleccionados de enfermedad muscular, tal como distrofia muscular del anillo óseo, y que, por lo tanto, la ciclosporina A (CsA) podría ser potencialmente beneficiosa.

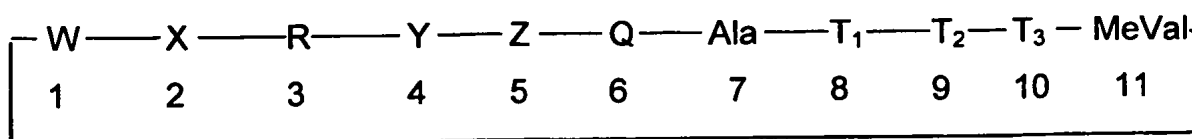
5 Los mecanismos efectores que provocan degeneración miofibrilar progresiva inducida por permeabilidad alterada de la membrana en la LGMD no se entienden bien y son objeto de investigaciones activas que pueden proporcionar una base para el desarrollo futuro de nuevas estrategias de tratamiento basadas en el mecanismo para pacientes que sufren este trastorno. En este momento, sin embargo, no hay un método eficaz disponible para el tratamiento de  
10 pacientes que sufren LGMD. De ahí que haya una necesidad de nuevos enfoques terapéuticos tales como los que se describen en la presente memoria.

El objetivo de la presente invención es proporcionar a los médicos una terapia para el tratamiento de la inducción y la progresión de necrosis miofibrilar y degeneración muscular en un paciente que sufre LGMD y, en particular, una sarcoglicanopatía, y más particularmente LGMD tipo 2F. Esta terapia debe proteger contra la necrosis de músculos esqueléticos distróficos y también músculo cardíaco y diafragmático y debe retrasar la progresión de la enfermedad.

15 Los presentes inventores encontraron sorprendentemente que la administración de un derivado de ciclosporina A (CsA) no inmunosupresor, que no inhibe calcineurina, a un enfermo que sufre trastornos diagnosticados como LGMD, y, en particular, sarcoglicanopatía, y más particularmente LGMD tipo 2F, es una terapia eficaz. Observaron que la administración del derivado de CsA no inmunosupresor [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA reduce la patología muscular de un enfermo diagnosticado de necrosis miofibrilar, en particular LGMD, y más particularmente LGMD tipo 2F, y la  
20 degeneración y la progresión de la enfermedad, así como normaliza la distribución de áreas miofibrilares al reducir la sensibilidad de las mitocondrias a la sobrecarga de calcio latente.

Un enfermo puede ser un ser humano o un mamífero tal como, p. ej., un ratón que muestra un fenotipo de distrofia muscular debido a la eliminación de un gen o la falta de expresión de un gen responsable del fenotipo de la enfermedad.

25 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un undecapéptido cíclico de la siguiente fórmula:



en la que

W es MeBmt;

X es αAbu;

30 R es (D)-MeAla;

Y es N-etilVal (EtVal);

Z es Val;

Q es MeLeu;

T<sub>1</sub> es (D)Ala;

35 T<sub>2</sub> es MeLeu; y

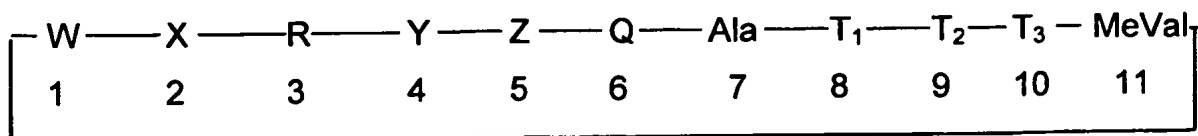
T<sub>3</sub> es MeLeu,

para el uso en el tratamiento de la distrofia muscular del anillo óseo.

El derivado de CsA inmunosupresor adecuado para el uso con la presente invención también se describió en la  
40 Solicitud de Patente Internacional WO 2005/021028 de Novartis AG, en las páginas 3-6. [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA fue divulgada por Wenger et al. en la Solicitud de Patente Internacional WO 00/01715. A la [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA de fórmula III se le ha asignado el Número de Registro del CAS 254435-95-5 .

El derivado de CsA no inmunosupresor para el uso en la presente invención es un undecapéptido cíclico descrito por la siguiente fórmula:

Formula III



en la que

- W es MeBmt;
- 5 X es αAbu;
- R es (D)-MeAla;
- Y es N-etilVal (EtVal);
- Z es Val;
- Q es MeLeu;
- 10 T<sub>1</sub> es (D)Ala;
- T<sub>2</sub> es MeLeu; y
- T<sub>3</sub> es MeLeu,

y donde MeBmt es N-metil-(4R)-4-but-2E-en-1-il-4-metil-(L)treonina, αAbu es ácido L-α aminobutírico, D-MeAla es N-metil-D-alanina, EtVal es N-etil-L-valina, Val es L-valina, MeLeu es N-metil-L-leucina, Ala es L-alanina, (D)Ala es D-alanina y MeVal es N-metil-L-valina. La numeración convencional de las posiciones de aminoácidos usada generalmente con referencia a la ciclosporina A se muestra después de la fórmula. Se usan nombres compuestos para los derivados de CsA, comprendiendo los nombres compuestos una primera porción que indica la identidad de residuos que son diferentes de los de la ciclosporina A y que proporciona su posición, y una segunda porción marcada como "CsA" que indica que todos los otros residuos son idénticos a los de la ciclosporina A. Por ejemplo, [Melle]<sup>4</sup>-CsA es una ciclosporina que es idéntica a la ciclosporina A excepto por que MeLeu en la posición 4 se reemplaza por Melle (N-metil-L-isoleucina) .

En una realización adicional, la invención se refiere a un derivado de CsA no inmunosupresor [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA de fórmula III, para el uso en el tratamiento de LGMD, y, en particular, de sarcoglicanopatía, y más particularmente de LGMD tipo 2F.

25 En otra realización, la invención se refiere a un undecapéptido cíclico según la reivindicación 1 para el uso en un método para prevenir o reducir la degeneración muscular en un enfermo que sufre LGMD, y, en particular, sarcoglicanopatía, y más particularmente LGMD tipo 2F, que comprende administrar al enfermo una cantidad eficaz de derivado de CsA no inmunosupresor [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA de fórmula III. Se entiende que una cantidad eficaz de un derivado de ciclosporina A no inmunosupresor es una cantidad que cuando se administra repetidamente en el transcurso de un régimen terapéutico a un enfermo que sufre LGMD, y, en particular, sarcoglicanopatía, y más particularmente LGMD tipo 2F, da como resultado una respuesta clínica objetiva tal como una mejora, estabilización o ralentización en la progresión de la enfermedad. Cuando se administra oralmente, una cantidad eficaz para una administración diaria o de tres veces a la semana estará entre aproximadamente 1 mg/kg (peso corporal) y aproximadamente 100 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. Por vía intravenosa, la dosificación correspondiente indicada puede ser de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg.

Por otra parte, la invención se refiere a una composición farmacéutica para el uso en la prevención o la reducción de la degeneración muscular en un enfermo que sufre LGMD, y, en particular, sarcoglicanopatía, y más particularmente LGMD tipo 2, que comprende una cantidad eficaz de un derivado de CsA no inmunosupresor [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA de fórmula III, un portador farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un excipiente, un diluyente. Típicamente, el diluyente es agua. Excipientes que se añaden típicamente a formulaciones parenterales incluyen un agente isotónico, un tampón u otro agente de control del pH, y un conservante. Las composiciones pueden comprender otros ingredientes activos tales como un antibiótico, un glucocorticoide, un corticosteroide tal como, p. ej., prednisona.

45 La presente invención se explicará adicionalmente a continuación con la ayuda de los siguientes dibujos.

- 5 - La Fig. 1 (a) representa la hinchazón de referencia, medida como absorbancia a 540 nm, de mitocondrias de músculo esquelético de ratones genéticamente intactos de 6 semanas de edad (Wt) (barra blanca) y ratones *scgd-/-* (barra negra). Se combinaron mitocondrias del grupo de músculos plantares, el cuádriceps y tibial anterior. Según se indica por la menor medida de absorbancia, las mitocondrias procedentes de músculos de ratones *scgd-/-* estaban más hinchadas en la referencia que las mitocondrias de ratones Wt.
- La Fig. 1(b) representa cambios en la hinchazón mitocondrial después de 10 minutos de tratamiento con calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o PEG-3350 (PEG) medidos como diferencias de absorbancia a 540 nm entre mitocondrias no tratadas y tratadas procedentes de ratones genéticamente intactos de 6 semanas de edad (Wt) (barra blanca) y ratones *scgd-/-* (barra negra). Se combinaron mitocondrias del grupo de músculos plantares, el cuádriceps y tibial anterior.
- 10 - La Fig. 2(a) representa la reducción de la patología muscular después de la administración de D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA en ratones *scgd-/-*. Se midieron las relaciones de peso del músculo (MW, por sus siglas en inglés) a longitud de la tibia (TL, por sus siglas en inglés) (MW/TL) en el gastrocnemio (Gastroc.), el cuádriceps (Cuad.), el tibial anterior (TA, por sus siglas en inglés) y el músculo cardíaco de ratones genéticamente intactos (Wt) tratados bien con vehículo (barra blanca) o bien con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA (barra negra) o de ratones *scgd-/-* tratados bien con vehículo (barra gris o de la segunda a la última barra del grupo) o D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA (barra punteada o última barra del grupo). La D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA evita un incremento en el peso del músculo en ratones *Scgd-/-*, incremento que está asociado con la enfermedad.
- 15 - La Fig. 2(b) representa la reducción de la patología muscular después de la administración de D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA en ratones *Scgd-/-* observados en secciones representativas teñidas con hematoxilina y eosina de cuádriceps de ratones genéticamente intactos (Wt) y ratones *scgd-/-* tratados con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA. También se muestran testigos con vehículo correspondientes.
- La Fig. 2(c) representa la reducción de la patología muscular después de la administración de D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA en ratones *scgd-/-* según se determina por la cuantificación de áreas fibróticas en secciones teñidas con tricromo del diafragma (Diaf.), el tibial anterior (TA), el gastrocnemio (Gastroc.), el cuádriceps (Cuad). Se determinaron secciones de ratones genéticamente intactos (Wt) tratados bien con vehículo (barra blanca) o bien con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA (barra negra) y de ratones *scgd-/-* tratados bien con vehículo (barra gris o de la segunda a la última barra del grupo) o bien con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA (barra punteada o última barra del grupo). La D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA reducía la fibrosis en ratones *scgd-/-*.
- 25 - La Fig. 3(a) representa la reducción de la heterogeneidad de áreas fibrosas en músculo de ratones *scgd-/-* después de la administración de D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA según se determina por la cuantificación de la distribución de áreas fibrosas en el (músculo) tibial anterior. El estudio incluía ratones genéticamente intactos (Wt) tratados bien con vehículo (barra blanca) o bien con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA (barra negra) y ratones *scgd-/-* tratados bien con vehículo (barra gris o de la segunda a la última barra del grupo) o bien con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA (barra punteada o última barra del grupo). (" $<$ " significa "inferior a", " $>$ " significa "superior a"). El tratamiento con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA normalizaba la heterogeneidad de las áreas fibrosas en ratones *scgd-/-*.
- 30 - La Fig. 3(b) representa la reducción de la heterogeneidad de áreas fibrosas en músculo de ratones *scgd-/-* después de la administración de D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA según se determina por la cuantificación de la distribución de áreas fibrosas en el gastrocnemio. Se incluyeron en el estudio ratones genéticamente intactos (Wt) tratados bien con vehículo (barra blanca) o bien con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA (barra negra) y ratones *scgd-/-* tratados bien con vehículo (barra gris o de la segunda a la última barra del grupo) o bien con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA (barra punteada o última barra del grupo). (" $<$ " significa "inferior a", " $>$ " significa "superior a"). El tratamiento con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA normalizaba la heterogeneidad de las áreas fibrosas en ratones *scgd-/-*.
- 35 - La Fig. 3(c) representa la reducción de la heterogeneidad de áreas fibrosas en músculo de ratones *scgd-/-* después de la administración de D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA según se determina por la cuantificación de la distribución de áreas fibrosas en el cuádriceps. Las medidas se llevaron a cabo sobre ratones genéticamente intactos (Wt) tratados bien con vehículo (barra blanca) o bien con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA (barra negra) y ratones *scgd-/-* tratados bien con vehículo (barra gris o de la segunda a la última barra del grupo) o bien con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA (barra punteada o última barra del grupo). (" $<$ " significa "inferior a", " $>$ " significa "superior a"). El tratamiento con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA normalizaba la heterogeneidad de las áreas fibrosas en ratones *scgd-/-*.
- 40 Si el aumento de la concentración de calcio sirve como un iniciador de la LGMD a través de necrosis miofibrilar, un número de efectores dependientes del calcio ulteriores pueden estar implicados potencialmente como factores causales. Por ejemplo, un incremento del calcio puede conducir a necrosis miotubular a través de la activación de la proteasa calpaína activada por calcio, una proteína de señalización implicada críticamente en la regeneración del músculo esquelético después de una lesión y la diferenciación de células del músculo esquelético.
- 45 Parsons et al. (2007) mostraron en un modelo de ratón de LGMD que la inhibición de la actividad de serina/treonina proteína fosfatasa calcineurina activada por calcio/calmodulina (calcineurina) mediante eliminación genética
- 50
- 55

disminuía la degeneración y la inflamación musculoesquelética y miofibrilar, es decir, mejoraba la patología del músculo esquelético. Este no es el caso en un modelo de Duchenne en ratones, en el que la inhibición de calcineurina por CsA era perjudicial para la patología muscular (Stupka et al., Acta Neuropathol, 2004, 107: 299-310). Esta discrepancia en las consecuencias de la inhibición de la actividad de calcineurina en diferentes distrofias

5 caracterizadas por concentraciones elevadas de calcio en células musculares se debe presumiblemente a sus diferentes eliminaciones genéticas respectivas que implican y que afectan a diferentes alteraciones de la membrana de las células musculares y diferentes rutas de señalización .

Otro mecanismo importante que conduce a necrosis celular es la sobrecarga de calcio mitocondrial, que de forma secundaria aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y promueve

10 adicionalmente la MPT (transición de la permeabilidad mitocondrial, por sus siglas en inglés). El incremento del calcio subsarcolémico también puede promover un incremento local en las especies reactivas de oxígeno (ROS) que conduce a mayores defectos en la membrana celular y a la entrada de calcio adicional, promoviendo además la necrosis y/o la apoptosis celular.

Se llevaron a cabo experimentos para probar experimentalmente la existencia de una conexión causal entre la falta del gen *scgd*, la degeneración progresiva de miofibras y la necrosis y/o la apoptosis celular inducidas por disfunción

15 mitocondrial.

Para determinar si la disfunción mitocondrial inducida por calcio puede iniciar y conducir la degeneración progresiva de miofibras asociada con la LGMD, los presentes inventores compararon mitocondrias aisladas de músculo

20 esquelético distrófico de ratones *scgd*<sup>-/-</sup> y ratones genéticamente intactos. Las mitocondrias aisladas mediante homogeneización en un tampón que contiene sacarosa (sacarosa 250 mM, Tris 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM) procedentes del grupo de músculos plantares, el cuádriceps y el tibial anterior se suspendieron después de los lavados y la centrifugación en tampón isotónico (KCl 120 mM, Tris 10 mM (pH 7,4), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM) y se probaron en un ensayo de hinchazón. Este ensayo consistía en la incubación de mitocondrias aisladas con CaCl<sub>2</sub> 200 μM (hinchazón) o PEG-3350 al 5% (p/v) (contracción). La hinchazón produce una reducción y la contracción un

25 incremento en la absorbancia a 540 nm. Los resultados se presentan como medias ± EEM (error estándar de las medias) (Fig. 1 (a) y Fig. 1 (b)). Se usó una prueba de la t de Student de dos muestras y los valores solo se consideraban significativos cuando p < 0,05.

Las mitocondrias aisladas de músculo esquelético de ratones *scgd*<sup>-/-</sup> se hinchaban en la referencia en comparación con las de ratones genéticamente intactos. También era refractarias a la hinchazón adicional mediante calcio

30 exógenamente aplicado y no mostraban una inversión en la hinchazón de referencia (Fig. 1(a) y Fig. 1 (b)). Esta insensibilidad de las mitocondrias de ratones *scgd*<sup>-/-</sup> a calcio adicional indicaba que estaban hinchadas y eran patológicas, de acuerdo con efectos patológicos ulteriores tales como una respuesta pseudohipertrófica en el gastrocnemio y el cuádriceps a las 6 semanas de edad, hipertrofia que está asociada con la inflamación tisular, una reducción intensa en los pesos musculares con el envejecimiento en comparación con los ratones genéticamente

35 intactos, un incremento característico en la nucleación central de miofibras que indica regeneración debida a degeneración en marcha y numerosos ciclos de degeneración/regeneración, y una desestabilización de la membrana muscular dañada por exceso de calcio.

Los hallazgos anteriores sugieren intensamente que un proceso de MPT dependiente del calcio subyace a la degeneración progresiva de miofibras asociada con la LGMD, aunque la anomalía mitocondrial latente puede no

40 ser predictiva de la gravedad del síndrome clínico. En principio, la cadena patógena de episodios ulteriores a la lesión genética se puede interrumpir mediante un fármaco apropiado. Por ejemplo, la pérdida de la actividad de miostatina puede mejorar la LGMD en ratones *scgd*<sup>-/-</sup> al reducir la fibrosis e inducir la regeneración muscular. Se presentó que la inhibición de actividad de calcineurina producía efectos análogos. Según los nuevos hallazgos analizados anteriormente y los presentados bajo los Ejemplos 1 y 2, la modulación de los ciclos de

45 degeneración/regeneración y la reducción de la degeneración del músculo esquelético en un modelo de LGMD en ratones se pueden alcanzar a través de la normalización de la función mitocondrial. Estos hallazgos de los inventores permiten un nuevo tratamiento farmacológico de pacientes afectados por LGMD, tratamiento que se dirige a la función mitocondrial pero no a la actividad de calcineurina y no provoca inmunosupresión.

Según esto, la presente invención se refiere al uso del derivado de CsA no inmunosupresor D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA, para prevenir o reducir la degeneración muscular en un enfermo que sufre LGMD. El derivado de CsA no

50 inmunosupresor también se puede usar para normalizar la función mitocondrial en mitocondrias preparadas a partir de biopsias musculares de un enfermo que sufre LGMD. Un hallazgo de la tolerancia a la sobrecarga de calcio en tales mitocondrias servirá como un indicador de que el tratamiento del paciente con un derivado de CsA no inmunosupresor será eficaz para reducir la gravedad de la enfermedad.

El compuesto activo, es decir, el derivado de ciclosporina A no inmunosupresor usado para tratar pacientes que sufren LGMD, se puede administrar mediante cualquier vía convencional. Se puede administrar parenteralmente, p.

55 ej., en la forma de soluciones o suspensiones inyectables, o en la forma de formulaciones inyectables de liberación retardada. Preferiblemente, se administrará oralmente en la forma de soluciones o suspensiones para beber,

comprimidos o cápsulas. Composiciones farmacéuticas para administración oral que comprenden el derivado de ciclosporina A no inmunosupresor [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA se describen en los Ejemplos. Tales composiciones farmacéuticas comprenden típicamente el derivado de ciclosporina A no inmunosupresor de elección y una o más sustancias portadoras farmacéuticamente aceptables. Portadores farmacéuticos adecuados se describen, p. ej., en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990), que es un texto de referencia estándar en esta especialidad. Típicamente, estas composiciones son concentradas y se necesita que se combinen con un diluyente apropiado, p. ej., agua, antes de la administración. Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral típicamente también incluyen uno o más excipientes. Excipientes opcionales incluyen un agente isotónico, un tampón u otro agente de control del pH, y un conservante. Estos excipientes se pueden añadir para mantener la composición y para obtener intervalos preferidos de pH (aproximadamente 6,5-7,5) y osmolaridad (aproximadamente 300 mosm/l).

Ejemplos adicionales de formulaciones de ciclosporina para administración oral se pueden encontrar en las Pat. EE. UU. N° 5.525.590 y 5.639.724 y la Sol. Pat. EE. UU. 2003/0104992. Por vía oral, la dosificación indicada de un derivado de ciclosporina A no inmunosupresor para la administración diaria o tres veces por semana puede ser de aproximadamente 1 mg/kg (peso corporal) a aproximadamente 100 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. Por vía intravenosa, la dosificación correspondiente puede ser de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg. Se entiende que una cantidad eficaz del derivado de ciclosporina A no inmunosupresor es una cantidad que, cuando se administra repetidamente en el transcurso de un régimen terapéutico a un paciente de LGMD, da como resultado una respuesta clínica objetiva tal como una mejora, estabilización o ralentización en la progresión de la enfermedad. Tal respuesta clínica se puede determinar, p. ej., mediante una prueba de fuerza isométrica cuantitativa (QIS, por sus siglas en inglés). La QIS permite la evaluación de la fuerza muscular de un modo objetivo con la ayuda de un equipo de transducción de presión y registro. Alternativamente, la normalización de las tasas de apoptosis se puede determinar en biopsias musculares mediante métodos bioquímicos e inmunohistoquímicos conocidos por los expertos en la especialidad. Finalmente, se puede utilizar una electromiografía que muestra un patrón muscular en lugar de uno neurogénico, que se puede cuantificar.

Numerosos factores serán tenidos en cuenta por un médico cuando se determinan dosis de ensayo para probar la eficacia de una composición farmacéutica de la invención que comprende el derivado de ciclosporina A no inmunosupresor [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA. Entre estos son principales la toxicidad y la semivida del derivado de ciclosporina A no inmunosupresor. Factores adicionales incluyen la talla del paciente, la edad del paciente, el estado general del paciente (incluyendo ventilación mecánica, fase clínica de la enfermedad, la gravedad de los síntomas), la presencia de otros fármacos en el paciente, y similares. Una tanda de tratamiento requerirá la administración repetida de una composición farmacéutica de la invención. Típicamente, una dosis de fármaco adecuada se administrará aproximadamente una vez al día. Debido a la naturaleza genética de la enfermedad, puede ser necesario continuar el tratamiento durante un período de tiempo prolongado, posiblemente a lo largo de la vida del paciente.

Actualmente no se conoce un tratamiento farmacológico eficaz de la LGMD. Los pacientes son apoyados mediante vacunación contra la gripe o una infección neumocócica, y cualquier infección es tratada agresivamente con antibióticos. De ahí que las composiciones farmacéuticas de la presente invención puedan comprender uno o más de otros ingredientes activos además del derivado de ciclosporina A no inmunosupresor, tales como, por ejemplo, uno o más antibióticos. El derivado de ciclosporina A no inmunosupresor y este otro ingrediente activo se pueden administrar conjuntamente como parte de la misma composición farmacéutica o se pueden administrar separadamente como parte de un régimen de dosificación apropiado diseñado para obtener los beneficios de todos los ingrediente activos. El régimen de dosificación, la cantidad de cada dosis administrada y los intervalos específicos de cada agente activo dependerán de la combinación específica de agentes activos empleada, el estado del paciente que se trate y otros factores analizados en la sección previa. Tales ingredientes activos adicionales se administrarán generalmente en cantidades iguales a aquellas para las que se sabe que son eficaces como agentes terapéuticos individuales. Las dosificaciones aprobadas por la FDA para tales agentes activos que han recibido aprobación de la FDA para la administración a seres humanos están disponibles públicamente.

La invención se elabora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan con propósitos de ilustración para un experto en la especialidad, y no pretenden limitar el alcance de la invención que se describe en las reivindicaciones. Así, no se debe considerar que la invención se limite a los ejemplos proporcionados.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Estabilización del daño inducido por calcio en la membrana muscular y reducción de la progresión y la patología de la distrofia muscular

Para estabilizar el daño inducido por calcio en la membrana muscular y reducir la progresión de la enfermedad provocada por numerosos ciclos de degeneración/regeneración, ratones *scgd*<sup>-/-</sup> fueron tratados con D-[MeAla]<sup>3</sup>-

[EtVal]<sup>4</sup>-CsA.

Los ratones *scgd*<sup>-/-</sup> fueron tratados mediante administración subcutánea bien de D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA en una dosis de 50 mg/kg/día o bien de vehículo (formulación que no contiene el ingrediente activo D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA), empezando a las 4 semanas de edad y terminando a las 10 semanas de edad. Diferentes músculos disecados, es decir, gastrocnemio, cuádriceps, tibial anterior y músculos cardíacos, se pesaron y se determinaron las relaciones de peso del músculo (MW) a longitud de la tibia (TL) (MW/TL). Los resultados de la Fig. 2 (a) y la Fig. 2 (c) se presentan como medias ± EEM (error estándar de las medias). Se usó un ANOVA unidireccional para comparar las medias entre 3 o más grupos independientes. Se aplicó una prueba *post hoc* de Newman-Keuls siempre que se efectuaran comparaciones múltiples usando InStat 3.0 (programa GraphPad de Science Inc.). Los valores se consideraban significativos cuando  $p < 0,05$ .

En respuesta a los numerosos ciclos de degeneración/regeneración, los ratones *scgd*<sup>-/-</sup> inicialmente presentaban músculos esqueléticos hipertróficos como se observa en enfermos que sufren LGMD. La administración de D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA en ratones *scgd*<sup>-/-</sup> daba como resultado una reducción en la patología muscular observada como una reducción de respuestas de pseudohipertrofia en músculos esqueléticos de ratones *scgd*<sup>-/-</sup> tratados (Fig. 2 (a)). La reducción de la hipertrofia musculoesquelética era aproximadamente 1,3 veces en el gastrocnemio (Gastroc.), el cuádriceps (Cuad.) y el tibial anterior (TA) y aproximadamente 1,2 veces en el músculo cardíaco (Corazón) de ratones *scgd*<sup>-/-</sup> tratados con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA en comparación con animales tratados con vehículo.

La patología reducida en los ratones *scgd*<sup>-/-</sup> tratados con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA también se observó en frotis histológicos de cuádriceps (Fig. 2 (b)). Se apreció una mejora en la organización y la normalización miofibrilares de distribuciones de áreas fibrosas en frotis histológicos de ratones *scgd*<sup>-/-</sup> tratados con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA sobre ratones genéticamente intactos o ratones *scgd*<sup>-/-</sup> tratados con vehículo.

El porcentaje de fibrosis se determinó por medio de un ensayo bioquímico que cuantificaba el contenido de hidroxiprolina (Parsons et al., Am. J. Pathol., 2006,168: 1975-1985) en los músculos diafragma (Diaf.), tibial anterior (TA), gastrocnemio (Gastroc.) y cuádriceps (cuad.) de ratones genéticamente intactos y *scgd*<sup>-/-</sup> tratados o no tratados con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA. El tratamiento de los ratones *scgd*<sup>-/-</sup> con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA reducía la fibrosis en los diferentes músculos – en aproximadamente 1,5% a 3,5% (Fig. 2 (c)).

Ejemplo 2: Normalización de la distribución de fibras pequeñas y grandes y reducción de los ciclos de degeneración/regeneración en músculos esqueléticos de ratones *scgd*<sup>-/-</sup> después del tratamiento con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA

El tratamiento con D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA de ratones *scgd*<sup>-/-</sup> normalizaba parcialmente las distribuciones de áreas fibrosas en los músculos tibial anterior (Fig. 3(a)), gastrocnemio (Fig. 3(b)) y cuádriceps (Fig. 3(c)), indicando una reducción de los ciclos de degeneración/regeneración. A los ratones *scgd*<sup>-/-</sup> se les administró subcutáneamente bien D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA en una dosis de 50 mg/kg/día o bien vehículo durante 6 semanas. Los análisis histológicos de las fibras de los tres músculos esqueléticos de ratones *scgd*<sup>-/-</sup> mostraban incrementos significativos en las poblaciones de fibra de diámetro pequeño (<200  $\mu\text{m}^2$ ) con relación a los ratones genéticamente intactos, indicando un incremento en el número de fibras que se regeneran, los ciclos de degeneración/regeneración en marcha y la progresión de la enfermedad. La administración de la D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA no inmunosupresora a ratones *scgd*<sup>-/-</sup> reducía la tasa de regeneración de las fibras y normalizaba parcialmente la distribución de fibras pequeñas y grandes. Se observaban menos fibras pequeñas en ratones *scgd*<sup>-/-</sup> tratados mediante D-[MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA no inmunosupresora en comparación con los ratones *scgd*<sup>-/-</sup> que solo recibían vehículo.

Ejemplo 3: Formulaciones orales de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA.

Las cantidades se expresan como % p/p.

Ejemplo A:

[D-MeAla] <sup>3</sup> -[EtVal] <sup>4</sup> -CsA	10
Glycofurol 75	35.95
Miglycol 812	18
Cremophor RH40	35,95
$\alpha$ -Tocoferol	0,1



## ES 2 558 710 T3

### Ejemplo B:

[D-MeAla] <sup>13</sup> -[EtVal] <sup>4</sup> -CsA	10
Tetraglicol	2
Captex 800	2
Nikkol HCO-40	85,9
Butilhidroxitolueno (BHT)	0,1

### Ejemplo C:

[D-MeAla] <sup>3</sup> -[EtVal] <sup>4</sup> -CsA	10
Glycofurol 75	39,95
Miglycol 812	14
Cremophor RH40	36
Butilhidroxianisol (BHA)	0,05-0,1

### Ejemplo D:

[D-MeAla] <sup>3</sup> -[EtVal] <sup>4</sup> -CsA	10
Tetraglycol	10
Myritol	5
Cremophor RH40	74,9
A-Tocoferol	0,1

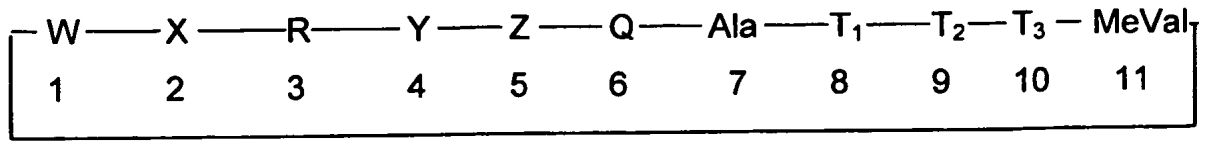
### Ejemplo E:

[D-MeAla] <sup>3</sup> -[EtVal] <sup>4</sup> -CsA	10
Etanol	9
Propilenglicol	8
Cremophor RH40	41
Monolinoleato de glicerol	32

Para los componentes individuales de las formulaciones A-D y para los métodos de preparación, véase la Sol. Patente Británica N° 2.222.770.

REIVINDICACIONES

1. Un undecapéptido cíclico de la siguiente fórmula:



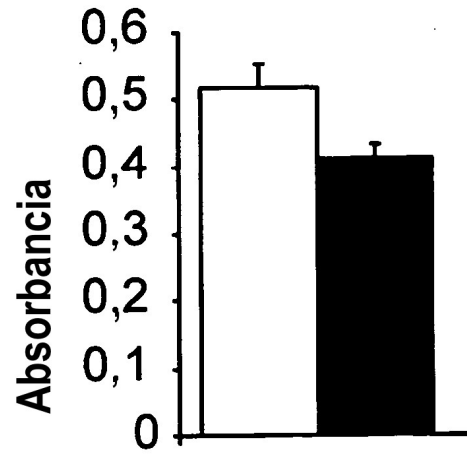
en la que

- 5            W es MeBmt;  
              X es αAbu;  
              R es (D)-MeAla;  
              Y es N-etilVal (EtVal);  
              Z es Val;
- 10           Q es MeLeu;  
              T<sub>1</sub> es (D)Ala;  
              T<sub>2</sub> es MeLeu; y  
              T<sub>3</sub> es MeLeu,

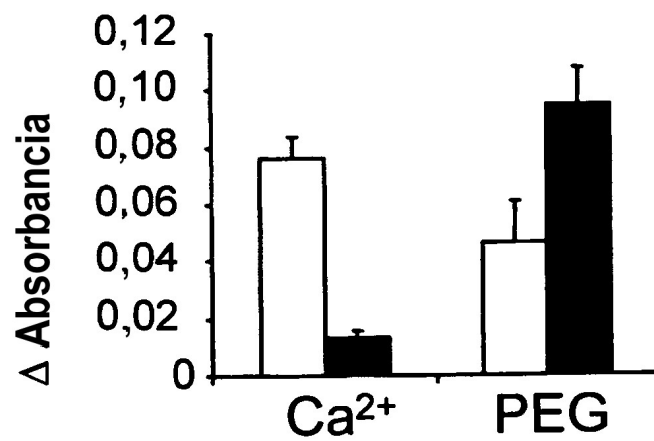
para el uso en el tratamiento de la distrofia muscular del anillo óseo.

15

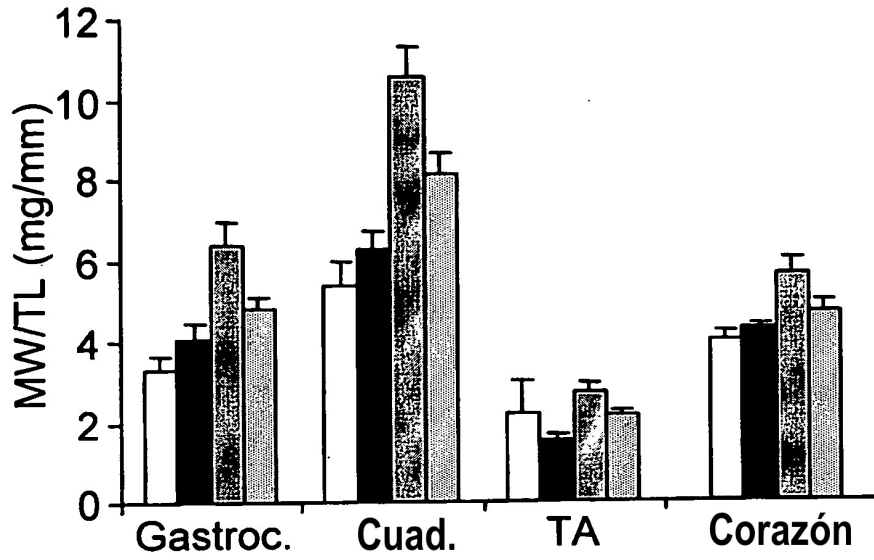
**Fig. 1 (a)**



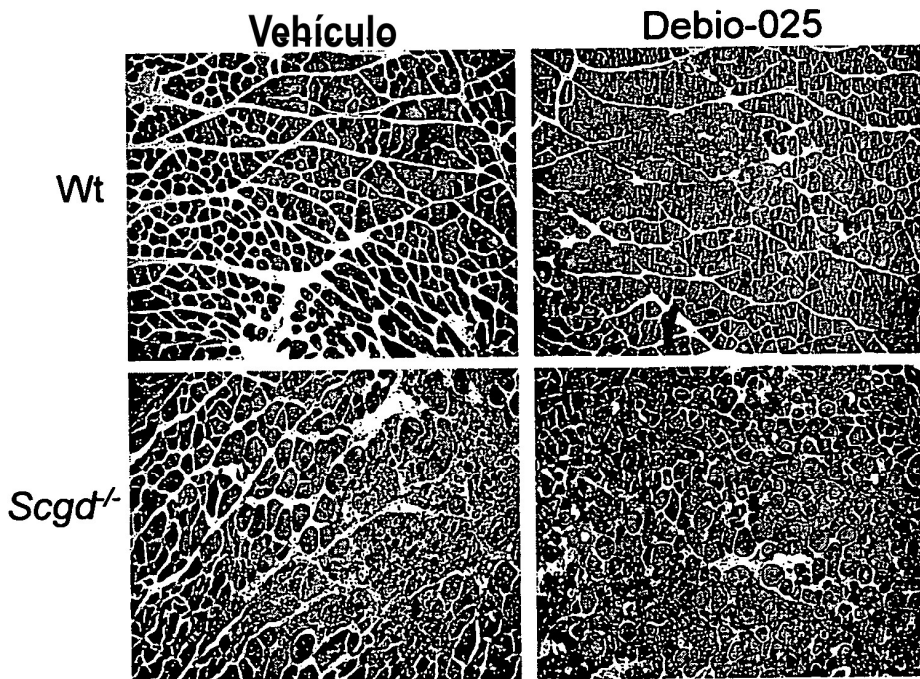
**Fig. 1 (b)**



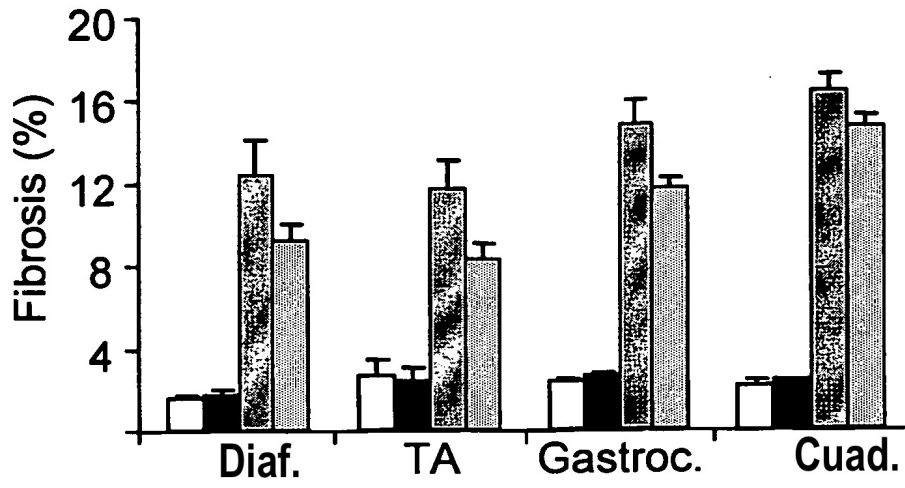
**Fig. 2 (a)**



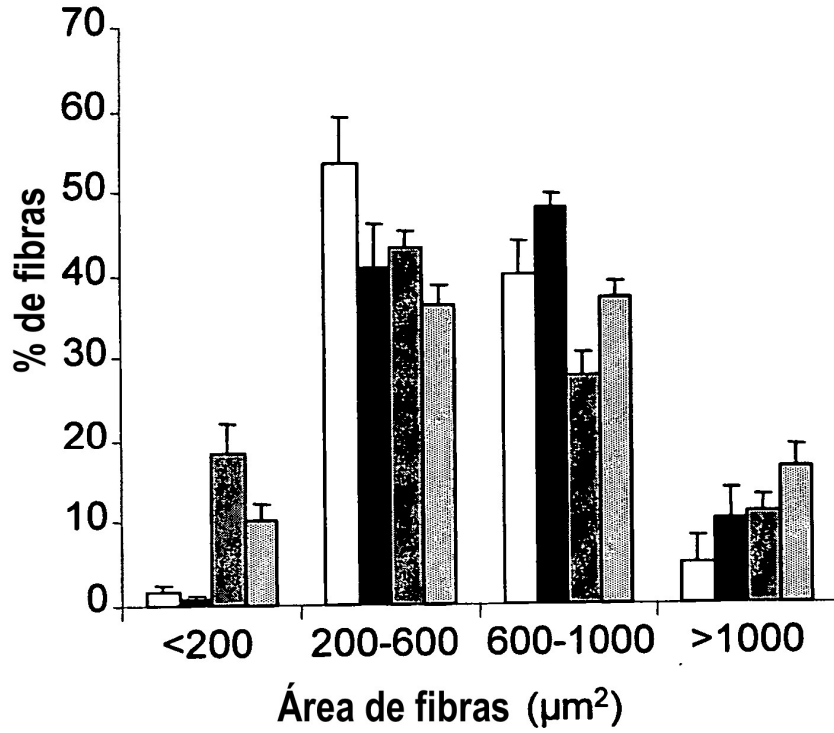
**Fig. 2 (b)**



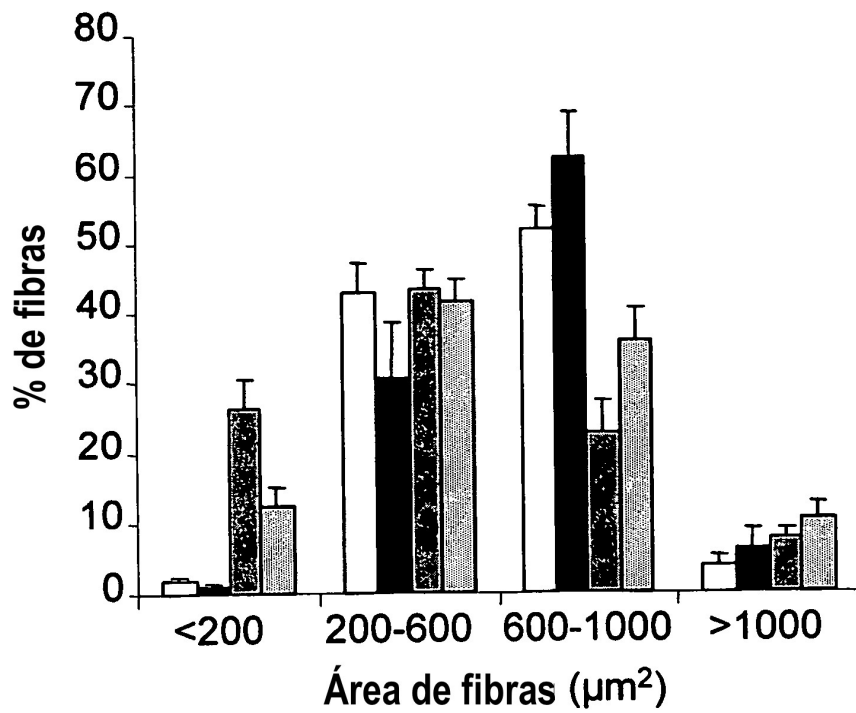
**Fig. 2 (c)**



**Fig. 3 (a)**



**Fig. 3 (b)**



**Fig. 3 (c)**

