

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2009.02.05	(73) Titular(es): DEBIOPHARM S.A. FORUM APRÈS-DEMAIN CHEMIN MESSIDOR 5-7 1002 LAUSANNE CH
(30) Prioridade(s): 2008.02.08 WO PCT/IB2008/000292	
(43) Data de publicação do pedido: 2010.11.17	(72) Inventor(es): JEFFERY D. MOLKENTIN US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.10.14 025/2016	(74) Mandatário: LUÍS MANUEL DE ALMADA DA SILVA CARVALHO RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **CICLOSPORINA NÃO IMUNOSSUPRESSORA PARA O TRATAMENTO DE Distrofia Muscular**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE À UTILIZAÇÃO DE UM DERIVADO DE CICLOSPORINA A NÃO IMUNOSSUPRESSOR PARA PREVENÇÃO OU REDUÇÃO DE DEGENERAÇÃO MUSCULAR NUM SUJEITO SOFRENDO DE Distrofia Muscular DAS CINTURAS.

RESUMO

**"CICLOSPORINA NÃO IMUNOSSUPRESSORA PARA O TRATAMENTO DE
DISTROFIA MUSCULAR"**

A presente invenção refere-se à utilização de um derivado de ciclosporina A não imunossupressor para prevenção ou redução de degeneração muscular num sujeito sofrendo de Distrofia Muscular das Cinturas.

DESCRIÇÃO

"CICLOSPORINA NÃO IMUNOSSUPRESSORA PARA O TRATAMENTO DE DISTROFIA MUSCULAR"

A presente invenção refere-se à utilização de um derivado de ciclosporina A não imunossupressor para redução da indução de necrose das fibras musculares e degeneração das fibras musculares num sujeito diagnosticado com Distrofia Muscular das Cinturas (LGMD), em particular sarcoglicanopatia.

As distrofias musculares (DM) compreendem um grupo diverso de distúrbios hereditários que afetam grandemente o tecido muscular estriado resultando em fraqueza e perda muscular progressiva, e em muitos casos, morte prematura. Muitas mutações caracterizadas que estão causalmente ligadas a DM em humanos estão associadas a alterações em proteínas estruturais de ligação que afixam as proteínas contrácteis subjacentes à lâmina basal, proporcionando rigidez à membrana celular dos músculos esqueléticos (sarcolema), ou em proteínas que estabilizam diretamente ou reparam a membrana celular, tal como e.g. sarcoglicano ou distrofina.

As mutações herdadas nos genes do sarcoglicano, genes de alfa, beta, gama e delta-sarcoglicano) causam uma

doença do músculo esquelético com síndromas heterogêneas, LGMD e um subgrupo destas, as sarcoglicanopatias. As síndromas ou fenótipos das sarcoglicanopatias dependem de que gene de sarcoglicano está mutado e do tipo de mutações genéticas (variante alélica), e mostram quatro formas de distúrbios específicos: LGMD tipos 2C, 2D, 2E e 2F (mutações de genes de gama, alfa, beta e delta-sarcoglicano, respetivamente), que representam 25% de todos os casos de LGMD diagnosticados. Em particular, as diferentes mutações observadas especificamente no gene do delta-sarcoglicano resultam no distúrbio grave de LGMD tipo 2F ou LGMD2F (*Online Mendelian Inheritance in Man* [OMIM] #601287, mutações genéticas: [OMIM] 601411. Emery et al., *The Lancet*, 2002, 359: 687-695).

Os diferentes tipos de LGMD são caracterizados por fraqueza e perda progressiva com atrofia envolvendo predominantemente os músculos dos braços e pernas proximais ao ombro e anca, respetivamente. Os fenótipos da doença assemelham-se aos das síndromas de distrofia muscular grave semelhante a Duchenne ou semelhante a Becker. No entanto, estas últimas doenças envolvem diferentes mecanismos moleculares e distúrbios genéticos. Antes dos diagnósticos moleculares de LGMD estarem disponíveis, os pacientes de LGMD eram frequentemente diagnosticados como sofrendo de distrofia muscular de Duchenne. O início da doença varia da infância até à idade adulta com formas clínicas suaves a graves. Até 25% dos pacientes apresentam formas graves da doença, desenvolvendo lordose lombar acentuada, contraturas

dos tendões de Aquiles, hipertrofia muscular, cardiomiopatia e defeitos de condução cardíaca. Hipertrofia dos gêmeos ou da língua, seletividade do envolvimento muscular e complicações cardíacas em estágio tardio estão associadas mais ou menos especificamente a cada uma das diferentes formas (Danièle *et al.*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007; 39: 1608-1624). A fraqueza progressiva leva a doença pulmonar restritiva e hipoventilação exigindo assistência ventilatória. Em geral, as taxas de morbidez e mortalidade variam. Com início precoce, a progressão da doença para morte é tipicamente muito rápida. A morte é frequentemente uma consequência de complicações respiratórias.

Até à data, não está disponível qualquer tratamento específico para pacientes sofrendo de qualquer uma das síndromas de LGMD. O cuidado de apoio agressivo, *e.g.*, ortopedia, cirurgia e terapia física para preservação da função muscular, maximiza a capacidade funcional e prolonga a esperança de vida. Estas medidas, no entanto, não podem impedir a degeneração das fibras musculares e a eventual ocorrência de complicações respiratórias.

Com o desenvolvimento de modelos animais sem genes específicos envolvidos na distrofia muscular, verificou-se uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes às sarcoglicanopatias. Recentemente, mostrou-se que células musculares de ratinhos sem delta-sarcoglicano (ratinhos *scgd*^{-/-}) devido a inativação dirigida do gene do delta-sarcoglicano (*scgd*) têm uma propensão para aumento do

influxo de cálcio celular. Supõe-se que a perda de componentes do complexo distrofina-glicoproteína (DGC), tal como o complexo da distrofina ou sarcoglicano resulta numa alteração fundamental nas propriedades físicas da membrana das células musculares e no aumento da permeabilidade e vazamento do sarcolema. A ativação de canais de influxo de cálcio não regulados causada pela instabilidade e fragilidade da membrana pode iniciar doença distrófica nos músculos esqueléticos levando à degeneração das fibras musculares e indução de necrose das fibras musculares.

Parsons *et al.* (*J. Biol. Chem.*, 2007, 282: 10068-10078) mostraram que a inibição da atividade da proteína serina/treonina-fosfatase-calcineurina ativada por cálcio/calmodulina (calcineurina) através de deleção genética diminuiu a degeneração e inflamação do músculo esquelético e da fibras musculares em ratinhos *scgd*^{-/-}, e foi citoprotetora. Melhorias análogas da doença após inibição da atividade da calcineurina não foram observadas em ratinhos sem o gene *mdx* (mutação do gene da distrofina), utilizados como modelo para distrofia muscular de Duchenne, embora tenha sido observado aumento do influxo de cálcio em ambos os modelos de distrofia muscular. De facto, um transgene ativado para calcineurina protegeu ratinhos *mdx* (Chakkalakal *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 2004, 13: 379-399; Stupka *et al.* *Acta Neuropathol.*, 2004, 107: 299-310, mas ver De Luca *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 2005, 166: 477-489). Parsons *et al.* identificaram calcineurina como um potencial alvo para produtos terapêuticos para LGMD. Com base nas

suas observações, Parsons *et al.* sugeriram que a inibição da atividade de calcineurina pode proporcionar algum benefício em tipos selecionados de doença muscular, tais como distrofia muscular das cinturas e que, portanto, a ciclosporina A (CsA) podia ser potencialmente benéfica.

Os mecanismos efetores que causam degeneração progressiva das fibras musculares induzida por permeabilidade alterada da membrana em LGMD não estão bem compreendidos e são sujeitos de investigações ativas que podem proporcionar uma base para o eventual desenvolvimento de novas estratégias de tratamento baseadas nos mecanismos para pacientes sofrendo deste distúrbio. Neste momento, no entanto, não existe nenhum método eficaz disponível para o tratamento de pacientes sofrendo de LGMD. Assim, existe a necessidade de novas abordagens terapêuticas tais como as descritas aqui.

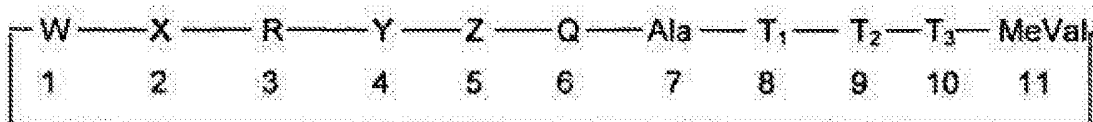
O objetivo da presente invenção é proporcionar ao clínico uma terapia para o tratamento da indução e progressão da necrose das fibras musculares e degeneração muscular num paciente sofrendo de LGMD e, em particular, de uma sarcoglicanopatia, e mais particularmente de LGMD tipo 2F. Esta terapia deve proteger contra necrose distrófica dos músculos esqueléticos e também do músculo cardíaco e do diafragma, e deverá atrasar a progressão da doença.

Os presentes inventores verificaram surpreendentemente que a administração de um derivado de ciclosporina

A (CsA) não imunossupressor, que não inibe a calcineurina, a um sujeito sofrendo de distúrbios diagnosticados como LGMD, e, em particular, de sarcoglicanopatia, e mais particularmente de LGMD tipo 2F, é uma terapia eficaz. Observaram que a administração do derivado de CsA não imunossupressor [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA reduz a patologia muscular de um sujeito diagnosticado com necrose das fibras musculares, em particular com LGMD, e, mais particularmente, com LGMD tipo 2F, e a degeneração e progressão da doença, bem como normaliza a distribuição da área das fibras musculares, reduzindo a sensibilidade das mitocôndrias à sobrecarga de cálcio latente.

Um indivíduo pode ser um humano ou um mamífero, tal como, *e.g.*, um ratinho que apresente um fenótipo de distrofia muscular devido à deleção de um gene ou à não expressão de um gene responsável pelo fenótipo da doença.

Portanto, a presente invenção refere-se a um undecapéptido cíclico com a seguinte fórmula:



em que

W é MeBmt;

X é α Abu;

R é (D)-MeAla;

Y é N-etilVal (EtVal);

Z é Val;

Q é MeLeu;

T₁ é (D)Ala;

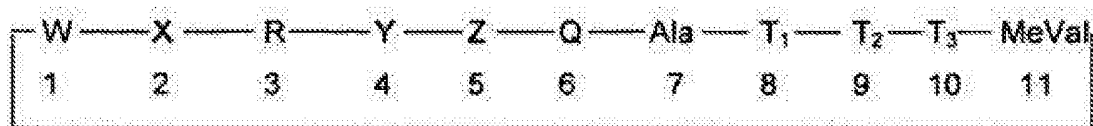
T₂ é MeLeu; e

T₃ é MeLeu

para utilização em tratamento de Distrofia Muscular das Cinturas.

O derivado de CsA não imunossupressor adequado para utilização com a presente invenção foi também descrito no Pedido Internacional de Patente WO 2005/021028 por Novartis AG, nas páginas 3-6. [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA foi divulgado por Wenger *et al.* no Pedido Internacional de Patente WO 00/01715. A [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA de fórmula III foi atribuído o Número de Registo CAS 254435-95-5.

O derivado de CsA não imunossupressor para utilização na presente invenção é um undecapéptido cíclico descrito pela seguinte fórmula:



em que

W é MeBmt;

X é αAbu;

R é (D)-MeAla;

Y é N-etilVal (EtVal);

Z é Val;

Q é MeLeu;

T₁ é (D)Ala;

T₂ é MeLeu ; e

T₃ é MeLeu,

e quando MeBmt é N-metil-(4R)-4-but-2E-en-1-il-4-metil-(L)treonina, αAbu é ácido L-α-aminobutírico, D-MeAla é N-metil-D-alanina, EtVal é N-etil-L-valina, Val é L-valina, MeLeu é N-metil-L-leucina, Ala é L-alanina, (D)Ala é D-alanina, e MeVal é N-metil-L-valina. A numeração convencional das posições de aminoácidos geralmente utilizada com referência à Ciclosporina A é mostrada abaixo da fórmula. Os nomes compostos são utilizados para derivados de CsA, os nomes compostos compreendendo uma primeira parte indicando a identidade dos resíduos que são diferentes dos da ciclosporina A e proporcionando a sua posição, e uma segunda parte marcada "CsA" indicando que todos os outros resíduos são idênticos aos da Ciclosporina A. Por exemplo, [MeIle]⁴-CsA é uma ciclosporina que é idêntica à ciclosporina A exceto que MeLeu na posição 4 é substituído por MeIle (N-metil-L-isoleucina).

Noutra forma de realização, a invenção refere-se a um derivado de CsA não imunossupressor [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA de fórmula III, para utilização em tratamento de LGMD, e, em particular, de sarcoglicanopatia, e mais particularmente de LGMD tipo 2F.

Noutra forma de realização, a invenção refere-se a um undecapéptido cíclico de acordo com a reivindicação 1 para utilização num método para prevenção ou redução da degeneração muscular num sujeito sofrendo de LGMD, e, em

particular, de sarcoglicanopatia, e mais particularmente de LGMD tipo 2F, compreendendo a administração ao sujeito de uma quantidade eficaz de um derivado de CsA não imunossupressor [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA de fórmula III. Uma quantidade eficaz de um derivado de ciclosporina A não imunossupressor é entendida como sendo uma quantidade que quando administrada repetidamente no decurso de um regime terapêutico a um sujeito sofrendo de LGMD, e, em particular, de sarcoglicanopatia, e mais particularmente de LGMD tipo 2F, resulta numa resposta clínica objetiva tal como uma melhoria, estabilização ou abrandamento da progressão da doença. Quando administrada oralmente, uma quantidade eficaz para administração diária ou três vezes por semana estará entre cerca de 1 mg/kg (peso corporal) e cerca de 100 mg/kg, de preferência de cerca de 1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg. Através da via intravenosa, a dosagem correspondente indicada pode ser de cerca de 1 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, de preferência de cerca de 1 mg/kg a cerca de 25 mg/kg.

Além disso, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica para utilização em prevenção ou redução de degeneração muscular num sujeito sofrendo de LGMD, e, em particular, de sarcoglicanopatia, e mais particularmente de LGMD tipo 2F, compreendendo uma quantidade eficaz de um derivado de CsA não imunossupressor [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA de fórmula III, um transportador farmacêuticamente aceitável e, opcionalmente, um excipiente e um diluente. O diluente é tipicamente água. Excipientes que são

tipicamente adicionados a formulações parentéricas incluem um agente isotônico, um tampão ou outro agente de controle do pH, e um conservante. As composições podem compreender outros ingredientes ativos tais como um antibiótico, um glucocorticoide, um corticosteroide tal como, *e.g.*, prednisona.

A presente invenção será explicada mais abaixo com a ajuda dos seguintes desenhos.

A Fig. 1(a) representa o inchaço limiar, medido como absorvância a 540 nm, das mitocôndrias do músculo esquelético, de ratinhos de tipo selvagem (Wt) (barra branca) e ratinhos *scgd*^{-/-} (barra negra) com 6 semanas de idade. As mitocôndrias do grupo do músculo plantar, quadríceps e tibial anterior foram combinadas. Tal como indicado pela medição da absorvância inferior, as mitocôndrias de ratinhos *scgd*^{-/-} estavam mais inchadas no limiar que as mitocôndrias dos ratinhos WT.

A Fig 1(b) representa alterações no inchaço das mitocôndrias após 10 minutos de tratamento com cálcio (Ca²⁺) ou PEG-3350 (PEG) medidas como diferenças de absorvância a 540 nm entre mitocôndrias não tratadas e tratadas de ratinhos de tipo selvagem (Wt) (barra branca) e ratinhos *scgd*^{-/-} (barra negra) com 6 semanas de idade. As mitocôndrias do grupo do músculo plantar, quadríceps, e tibial anterior foram combinadas.

A Fig. 2(a) representa a redução da patologia muscular após a administração de D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA em ratinhos *scgd*^{-/-}. As razões do peso muscular (PM) para o comprimento da tíbia (CT) (PM/CT) foram medidas no músculo gastrocnémio (Gastroc.), quadríceps (Quad.), tibial anterior (TA), e cardíaco de ratinhos de tipo selvagem (Wt) tratados com veículo (barra branca) ou D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (barra negra) ou de ratinhos *scgd*^{-/-} tratados com veículo (barra cinzenta ou segunda a última barra no grupo) ou D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (barra pontuada ou ultima barra do grupo). D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA impede um aumento no peso muscular em ratinhos *Scgd*^{-/-}, aumento esse que está associado a doença.

A Fig. 2(b) representa a redução da patologia muscular após administração de D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA em ratinhos *Scgd*^{-/-} observada em seções representativas coradas com hematoxilina e eosina de quadríceps de ratinhos de tipo selvagem (Wt) e ratinhos *scgd*^{-/-} tratados com D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA. São também mostrados os controlos de veículo correspondentes.

A Fig. 2(c) representa a redução de patologia muscular após administração de D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA em ratinhos *scgd*^{-/-} tal como avaliado através da quantificação de áreas fibróticas em seções coradas com tricroma do diafragma (Diaf.), tibial anterior (TA), gastrocnémio (Gastroc.), quadríceps (Quad). Foram avaliadas secções de ratinhos de tipo selvagem (Wt) tratados com veículo (barra

branca) ou D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (barra negra) e de ratinhos *scgd*^{-/-} tratados com veículo (barra cinzenta ou segunda a última barra no grupo) ou D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (barra pontuada ou última barra do grupo). D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA reduziu a fibrose em ratinhos *scgd*^{-/-}.

A Fig. 3(a) representa a redução da heterogeneidade da área das fibras no músculo de ratinhos *scgd*^{-/-} após a administração de D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA tal como avaliado através da quantificação da distribuição das áreas das fibras no tibial anterior (músculo). O estudo incluiu ratinhos de tipo selvagem (Wt) tratados com veículo (barra branca) ou D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (barra negra) e ratinhos *scgd*^{-/-} tratados com veículo (barra cinzenta ou segunda a última barra no grupo) ou D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (barra pontuada ou última barra do grupo). (" $<$ " significa "inferior a", " $>$ " significa "superior a"). O tratamento com D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA normalizou a heterogeneidade da área das fibras em ratinhos *scgd*^{-/-}.

A Fig. 3(b) representa a redução da heterogeneidade da área das fibras no músculo de ratinhos *scgd*^{-/-} após a administração de D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA tal como avaliado através da quantificação da distribuição das áreas das fibras no gastrocnémio. Foram incluídos no estudo ratinhos de tipo selvagem (Wt) tratados com veículo (barra branca) ou D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (barra negra) e ratinhos *scgd*^{-/-} tratados com veículo (barra cinzenta ou segunda a última barra no grupo) ou D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (barra

ponteada ou última barra do grupo). (" $<$ " significa "inferior a", " $>$ " significa "superior a"). O tratamento com D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA normalizou a heterogeneidade da área das fibras em ratinhos *scgd*^{-/-}.

A Fig. 3(c) representa a redução da heterogeneidade da área das fibras no músculo de ratinhos *scgd*^{-/-} após a administração de D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA tal como avaliado através da quantificação da distribuição das áreas das fibras no músculo quadríceps. As medições foram realizadas em ratinhos de tipo selvagem (Wt) tratados com veículo (barra branca) ou D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (barra negra) e ratinhos *scgd*^{-/-} tratados com veículo (barra cinzenta ou segunda a última barra no grupo) ou D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (barra ponteada ou última barra do grupo). (" $<$ " significa "inferior a", " $>$ " significa "superior a"). O tratamento com D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA normalizou a heterogeneidade da área das fibras em ratinhos *scgd*^{-/-}.

Se a concentração aumentada de cálcio serve como um iniciador da LGMD através da necrose de fibras musculares, vários fatores dependentes do cálcio a jusante podem estar potencialmente implicados como fatores causais. Por exemplo, o cálcio aumentado pode levar a necrose dos miotubos através da ativação da protease calpaína ativada por cálcio, uma proteína de sinalização criticamente envolvida na regeneração do músculo esquelético após lesão e na diferenciação de células do músculo esquelético.

Parsons *et al.* (2007) mostraram num modelo de ratinho de LGMD que a inibição da atividade da proteína serina/treonina-fosfatase-calcineurina ativada com cálcio/calmodulina (calcineurina) através de deleção genética diminuiu a degeneração e inflamação do músculo esquelético e das fibras musculares, *i.e.*, melhorou a patologia do músculo esquelético. Este não foi o caso num modelo de ratinho de Duchenne em que a inibição da calcineurina por CsA foi deletéria para a patologia muscular (Stupka *et al.*, *Acta Neuropathol.*, 2004, 107: 299-310). Esta discrepância nas consequências da inibição da atividade da calcineurina em diferentes distrofias caracterizadas por elevadas concentrações de cálcio nas células musculares é presumivelmente devida às suas respectivas diferentes deleções genéticas envolvendo e afetando diferentes alterações da membrana da célula muscular e diferentes vias de sinalização.

Outro mecanismo importante que leva à necrose celular é a sobrecarga de cálcio mitocondrial, que secundariamente aumenta a geração de espécies reativas de oxigénio (ROS) e promove ainda a MPT (Transição da Permeabilidade Mitocondrial). O aumento do cálcio subsarcolemal pode também promover um aumento local nas espécies reativas de oxigénio (ROS), levando a maiores defeitos na membrana celular e entrada adicional de cálcio, promovendo ainda mais necrose celular e/ou apoptose.

Foram realizadas experiências para testar experi-

mentalmente a existência de umnexo de causalidade entre a falta do gene *scgd*, a degeneração progressiva das fibras musculares e a necrose celular e/ou apoptose induzidas por disfunção mitocondrial.

Para avaliar se a disfunção mitocondrial induzida por cálcio pode iniciar e conduzir a degeneração progressiva das fibras musculares associada a LGMD, os presentes inventores compararam mitocôndrias isoladas a partir de músculo esquelético distrófico de ratinhos *scgd*^{-/-} e de ratinhos de tipo selvagem. As mitocôndrias isoladas através de homogeneização num tampão contendo sacarose (sacarose 250 mM, Tris 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM) a partir do grupo muscular plantar, quadríceps, e tibial anterior foram suspensas após lavagens e centrifugação num tampão isotónico (KCl 120 mM, Tris 10 mM (pH 7,4), KH₂PO₄ 5 mM) e testadas num ensaio de inchaço. Este ensaio consistiu na incubação de mitocôndrias isoladas com CaCl₂ 200 µM (inchaço) ou PEG-3350 a 5% (p/v) (encolhimento). O inchaço produz uma redução e o encolhimento um aumento na absorvância a 540 nm. Os resultados são apresentados como médias ± SEM (erro padrão das médias) (Fig. 1(a) e Fig. 1(b)). Foi utilizado um teste t de Student de duas amostras, e os valores foram apenas considerados significativos quando $p < 0,05$.

As mitocôndrias isoladas a partir de músculo esquelético de ratinhos *scgd*^{-/-} estavam inchadas no limiar em comparação com as dos ratinhos de tipo selvagem. Foram

também refratárias a inchaço adicional através de cálcio aplicado exogenamente e não mostraram uma inversão do inchaço no limiar (Fig. 1(a) e Fig. 1(b)). Esta insensibilidade das mitocôndrias de ratinhos *scgd*^{-/-} a cálcio adicional indicou que elas estavam inchadas e patológicas, consistente com efeitos patológicos a jusante tais como uma resposta de pseudo-hipertrofia no gastrocnêmio e quadríceps às 6 semanas de idade, hipertrofia essa que está associada a inflamação de tecidos, uma redução profunda nos pesos musculares com a idade em comparação com os ratinhos de tipo selvagem, um aumento característico na nucleação central de fibras musculares indicando regeneração devido à degeneração em curso numerosos ciclos de degeneração/regeneração, e uma desestabilização da membrana muscular danificada por excesso de cálcio.

As verificações acima sugerem fortemente que um processo de MPT dependente de cálcio está subjacente à degeneração progressiva das fibras musculares associada a LGMD, mesmo que a anomalia mitocondrial latente possa não ser preditiva da gravidade da síndrome clínica. Em princípio, a cadeia patogénica de eventos a jusante da lesão genética pode ser interrompida por um fármaco apropriado. Por exemplo, a perda de atividade da miostatina pode melhorar LGMD em ratinhos *scgd*^{-/-} através da redução da fibrose e indução da regeneração muscular. Foi relatado que a inibição da atividade da calcineurina produz efeitos análogos. De acordo com as novas verificações acima

discutidas e as apresentadas nos Exemplos 1 e 2, a modulação dos ciclos de degeneração/regeneração e a redução da degeneração do músculo esquelético num modelo de ratinho de LGMD pode ser alcançada através da normalização da função mitocondrial. Estas verificações dos inventores permitem um novo tratamento farmacológico dos pacientes afetados por LGMD, tratamento esse que se dirige à função mitocondrial mas não à atividade da calcineurina e não causa imunossupressão.

Concordantemente, a presente invenção refere-se à utilização do derivado de CsA não imunossupressor D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, para prevenção ou redução de degeneração muscular num sujeito sofrendo de LGMD. O derivado de CsA não imunossupressor pode também ser utilizado para normalização da função mitocondrial em mitocôndrias preparadas a partir de biopsias musculares de um sujeito sofrendo de LGMD. Uma verificação de tolerância à sobrecarga de cálcio em tais mitocôndrias servirá como indicador de que o tratamento do paciente com um derivado de CsA não imunossupressor será eficaz na redução da gravidade da doença.

O composto ativo, *i.e.*, o derivado de ciclosporina A não imunossupressor utilizado para tratamento de pacientes sofrendo de LGMD, pode ser administrado através de qualquer via convencional. Pode ser administrado parentericamente, *e.g.*, na forma de soluções ou suspensões injetáveis, ou na forma de formulações de depósito

injetáveis. De preferência, será administrado por via oral na forma de soluções ou suspensões para beber, comprimidos ou cápsulas. Composições farmacêuticas para administração oral compreendendo o derivado de ciclosporina A não imunossupressor [D-MeAla]3-[EtVal]4-CsA são descritas nos Exemplos. Tais composições farmacêuticas compreendem tipicamente o derivado de ciclosporina A não imunossupressor de escolha e uma ou mais substâncias transportadoras farmacêuticamente aceitáveis. Transportadores farmacêuticamente aceitáveis são descritos, e.g., em Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990), que é um texto de referência padrão neste campo. Tipicamente, estas composições são concentradas e devem ser combinadas com um diluente apropriado, e.g., água, antes da administração. Composições farmacêuticas para administração parentérica incluem também tipicamente um ou mais excipientes. Excipientes opcionais incluem um agente isotônico, um tampão ou outro agente de controle do pH, e um conservante. Estes excipientes podem ser adicionados para manutenção da composição e para a obtenção de intervalos de pH (cerca de 6,5-7,5) e de osmolaridade (cerca de 300 mOsm/L) preferidos.

Exemplos adicionais de formulações de ciclosporina para administração oral podem ser verificados nas Pat. U.S. Nos. 5525590 e 5639724, e Ped. Pat. U.S. 2003/0104992. Pela via oral, a dosagem indicada de um derivado de ciclosporina A não imunossupressor para administração diária a três vezes por semana pode ser de cerca de 1 mg/kg (peso corporal) a cerca de 100 mg/kg, de preferência de

cerca de 1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg. Pela via intravenosa, a dose correspondente indicada pode ser de cerca de 1 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, de preferência de cerca de 1 mg/kg a cerca de 25 mg/kg. Uma quantidade eficaz do derivado de ciclosporina A não imunossupressor é entendida como sendo uma quantidade que quando administrada repetidamente no decurso de um regime terapêutico a um paciente de LGMD resulta numa resposta clínica objetiva tal como uma melhoria, estabilização ou desaceleração na progressão da doença. Tal resposta clínica pode ser avaliada, e.g., através de teste Quantitativo Isométrico da Força (QIS). O QIS permite a avaliação da força muscular de forma objetiva com o auxílio de equipamento de transdução de pressão e registo. Alternativamente, a normalização das taxas de apoptose pode ser avaliada em biopsias musculares através de métodos bioquímicos e imuno-histoquímicos conhecidos dos peritos na técnica. Finalmente, podem ser utilizada eletromiografia que mostra um padrão muscular em vez de um neurogénico, que pode ser quantificado.

Numeroso fatores serão tidos em consideração por um clínico ao determinar doses de ensaio para testar a eficácia de uma composição farmacêutica da invenção compreendendo o derivado de ciclosporina A não imunossupressor [D-MeAla]3-[EtVal]4-CsA. Os principais entre estes são a toxicidade e semivida do derivado de ciclosporina A não imunossupressor. Fatores adicionais incluem o tamanho do paciente, a idade do paciente, a condição geral do paciente (incluindo ventilação mecânica, estágio clínico da doença, a gravidade dos sintomas), a presença de outros fármacos no

paciente, e semelhantes. Um curso de tratamento exigirá administração repetida de uma composição farmacêutica da invenção. Tipicamente, uma dose adequada de fármaco será administrada cerca de uma vez por dia. Devido à natureza genética da doença, o tratamento pode ter de ser continuado por um período prolongado de tempo, possivelmente durante toda a vida do paciente.

Não é conhecido presentemente nenhum tratamento farmacológico eficaz de LGMD. Os pacientes são suportados por vacinação contra gripe e infecção por pneumococos, e qualquer infecção é tratada agressivamente com antibióticos. Assim, composições farmacêuticas da presente invenção podem compreender um ou mais outros ingredientes ativos em adição ao derivado de ciclosporina A não imunossupressor tal como, por exemplo, um ou mais antibióticos. O derivado de ciclosporina A não imunossupressor e tal outro ingrediente ativo podem ser administrados em conjunto, como parte da mesma composição farmacêutica ou podem ser administrados separadamente como parte de um regime de dosagem apropriado concebido para obter os benefícios de todos os ingredientes ativos. O regime de dosagem apropriado, a quantidade de cada dose administrada, e os intervalos específicos entre doses de cada agente ativo dependerão da combinação específica dos agentes ativos empregues, da condição do paciente a tratar, e de outros fatores discutidos na secção anterior. Tais ingredientes ativos adicionais serão geralmente administrados em quantidades iguais àsquelas pelas quais se sabe serem eficazes como agentes terapêuticos individuais. As dosagens aprovadas pela FDA para tais

agentes ativos que tenham recebido aprovação da FDA para administração a humanos estão publicamente disponíveis.

A invenção é melhor explicada através dos seguintes exemplos. Os exemplos são proporcionados para fins de ilustração a um perito na técnica, e não se destinam a limitar o âmbito da invenção tal como descrito nas reivindicações. Assim, a invenção não deve ser entendida como estando limitada aos exemplos proporcionados.

Exemplos:

Exemplo 1: Estabilização da lesão induzida por cálcio na membrana muscular e redução da progressão da distrofia muscular e patologia

Para estabilizar a lesão induzida pelo cálcio da membrana muscular e reduzir a progressão da doença causada por numerosos ciclos de degeneração/regeneração, ratinhos *scgd*^{-/-} foram tratados com D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA.

Os ratinhos *Scgd*^{-/-} foram tratados através de administração subcutânea de D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA a uma dose de 50 mg/kg/dia ou veículo (formulação que não contém o ingrediente ativo D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA), começando às 4 semanas de idade e terminando às 10 semanas de idade. Diferentes músculos dissecados, ou seja, o músculo gastrocnêmio, quadríceps, tibial anterior e cardíaco, foram pesados e as razões de peso muscular (PM) para comprimento da tíbia (CT) (PM/CT) foram determinadas. Os

resultados na Fig. 2(a) e Fig. 2(c) são apresentados como médias $\pm$ SEM (erro padrão das médias). Um ANOVA de uma via foi utilizado para comparar médias entre 3 ou mais grupos independentes. Um teste post hoc de Newman-Keuls foi aplicado sempre que foram realizadas comparações múltiplas utilizando InStat 3.0 (software GraphPad de Science Inc.). Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Em resposta aos numerosos ciclos de degeneração/regeneração, os ratinhos *scgd*^{-/-} apresentaram inicialmente músculos esqueléticos hipertróficos tal como são observados em sujeitos sofrendo de LGMD. A administração de D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA em ratinhos *scgd*^{-/-} resultou numa redução na patologia muscular observada como uma redução das respostas de pseudo-hipertrofia em músculos esqueléticos de ratinhos *scgd*^{-/-} tratados (Fig. 2(a)). A redução da hipertrofia muscular esquelética foi de cerca de 1,3 vezes no gastrocnémio (Gastroc.), quadríceps (Quad.) e tibial anterior (TA) e de cerca de 1,2 vezes no músculo cardíaco (Coração) de ratinhos *scgd*^{-/-} tratados com D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA em comparação com animais tratados com veículo.

A patologia reduzida nos ratinhos *scgd*^{-/-} tratados com D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA foi também observada em lâminas histológicas de quadríceps (Fig. 2(b)). A melhoria na organização das fibras musculares e normalização das distribuições das áreas das fibras foram observadas em cortes histológicos de ratinhos *scgd*^{-/-} tratados com D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA em relação aos

ratinhos de tipo selvagem ou ratinhos *scgd*^{-/-} tratados com veículo.

A fibrose percentual foi avaliada através da média de um ensaio bioquímico que quantificou o teor de hidroxiprolina (Parsons *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 2006, 168: 1975-1985) no músculo do diafragma (Diaf.), tibial anterior (TA), gastrocnémio (Gastroc.) e quadríceps (Quad.) de ratinhos de tipo selvagem e *scgd*^{-/-} tratados ou não tratados com D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA. O tratamento de ratinhos *Scgd*^{-/-} com D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA reduziu a fibrose nos diferentes músculos - em cerca de 1,5% a 3,5% (Fig. 2(c)).

Exemplo 2: Normalização da distribuição de fibras pequenas e grandes e redução dos ciclos de degeneração/regeneração em músculos esqueléticos de ratinhos *scgd*^{-/-} após tratamento com D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA

O tratamento com D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA de ratinhos *scgd*^{-/-} normalizou parcialmente as distribuições das áreas das fibras nos músculos tibial anterior (Fig. 3(a)), gastrocnémio (Fig. 3(b)) e quadríceps (Fig. 3(c)), indicando uma redução dos ciclos de degeneração/regeneração. Aos ratinhos *Scgd*^{-/-} foi administrado por via subcutânea D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA a uma dose de 50 mg/kg/dia ou veículo durante 6 semanas. A análise histológica das fibras dos três músculos esqueléticos de ratinhos *scgd*^{-/-} mostrou aumentos significativos em populações de fibras de

pequeno diâmetro (<200 μm^2) relativamente aos ratinhos de tipo selvagem, indicando um número maior de fibras em regeneração, ciclos de degeneração/regeneração em curso e progressão da doença. A administração do D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA não imunossupressor a ratinhos *scgd*^{-/-} reduziu a regeneração das fibras e normalizou parcialmente a distribuição das fibras pequenas e grandes. Foram observadas menos fibras pequenas em ratinhos *scgd*^{-/-} tratados através de D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA não imunossupressor em comparação com os ratinhos *scgd*^{-/-} que apenas receberam veículo.

Exemplo 3: Formulações orais de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA

As quantidades são expressas como % p/p.

Exemplo A:

[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
Glicofurol 75	35,95
Miglicol 812	18
Cremophor RH40	35,95
Alfa-Tocoferol	0,1

Exemplo B:

[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
Tetraglicol	2
Captex 800	2
Nikkol HCO-40	85,9
Butil-hidroxitolueno (BHT)	0,1

Exemplo C:

[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
Glicofurol 75	39,95
Miglicol 812	14
Cremophor RH40	36
Butil-hidroxianisol (BHA)	0,05-0,1

Exemplo D:

[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
Tetraglicol	10
Miritol	5
Cremophor RH40	74,9
Alfa-Tocoferol	0,1

Exemplo E:

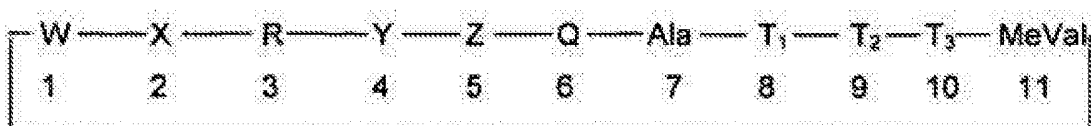
[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
Etanol	9
Propilenoglicol	8
Cremophor RH40	41
Monolinoleato de glicerol	32

Para componentes individuais das formulações A-D e para métodos de preparação ver Ped. de Patente Britânica No. 2222770.

Lisboa, 7 de janeiro de 2016

REIVINDICAÇÕES

1. Undecapéptido cíclico com a seguinte fórmula:



em que

W é MeBmt;

X é α Abu;

R é (D)-MeAla;

Y é N-etilVal (EtVal);

Z é Val;

Q é MeLeu;

T₁ é (D)Ala;

T₂ é MeLeu; e

T₃ é MeLeu

para utilização em tratamento de Distrofia Muscular das Cinturas.

Lisboa, 7 de janeiro de 2016

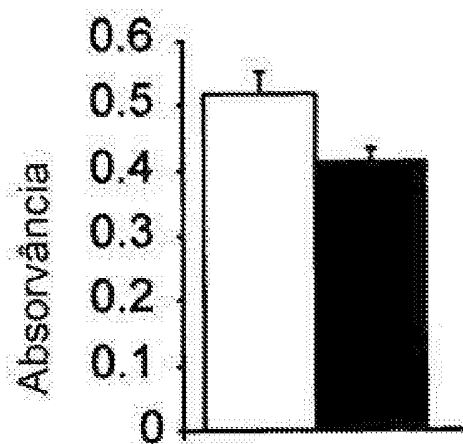
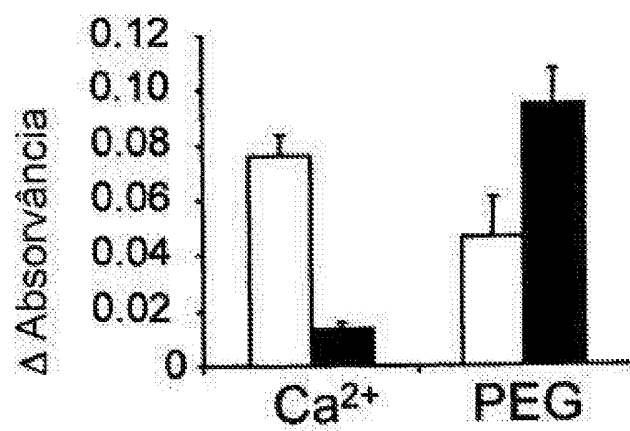
Fig. 1 (a)**Fig. 1 (b)**

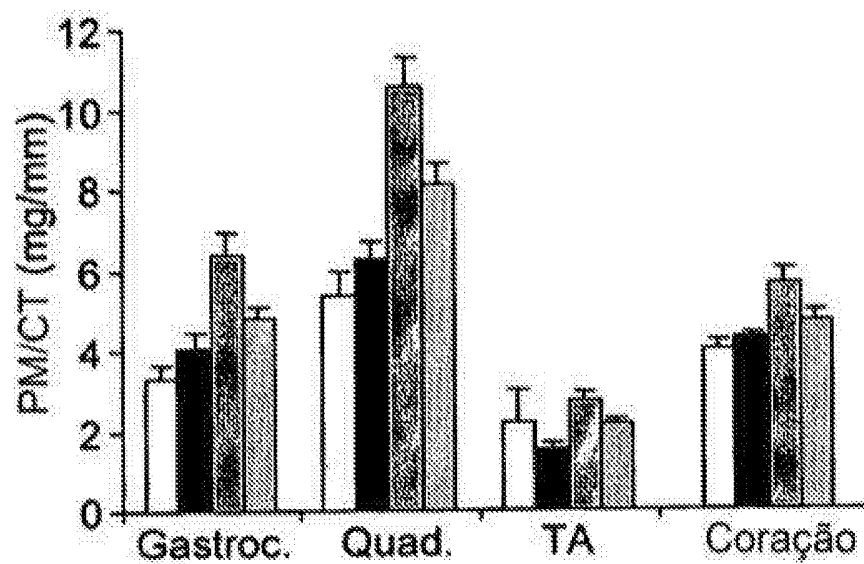
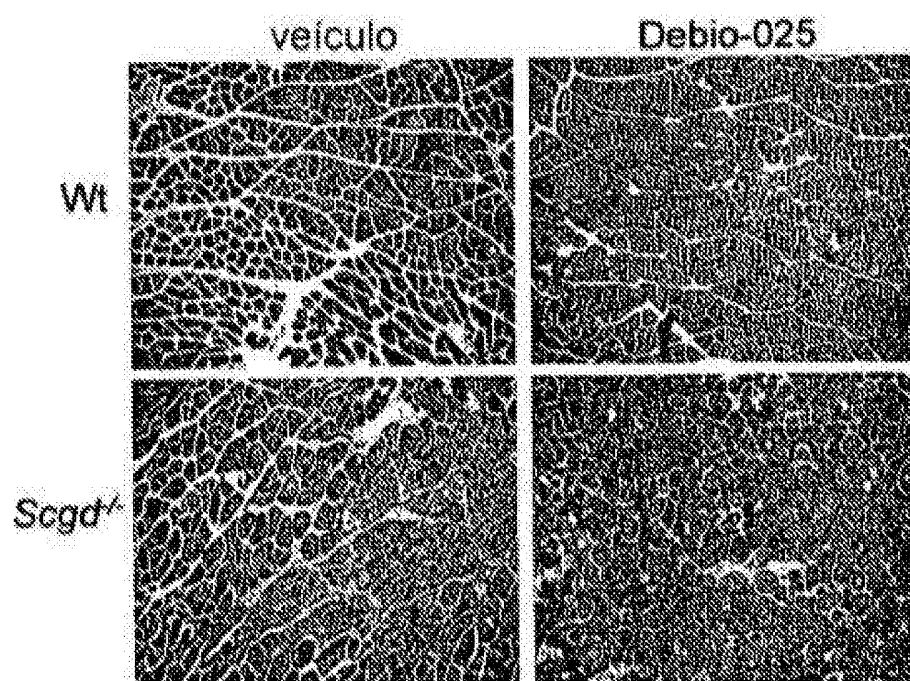
Fig. 2 (a)**Fig. 2 (b)**

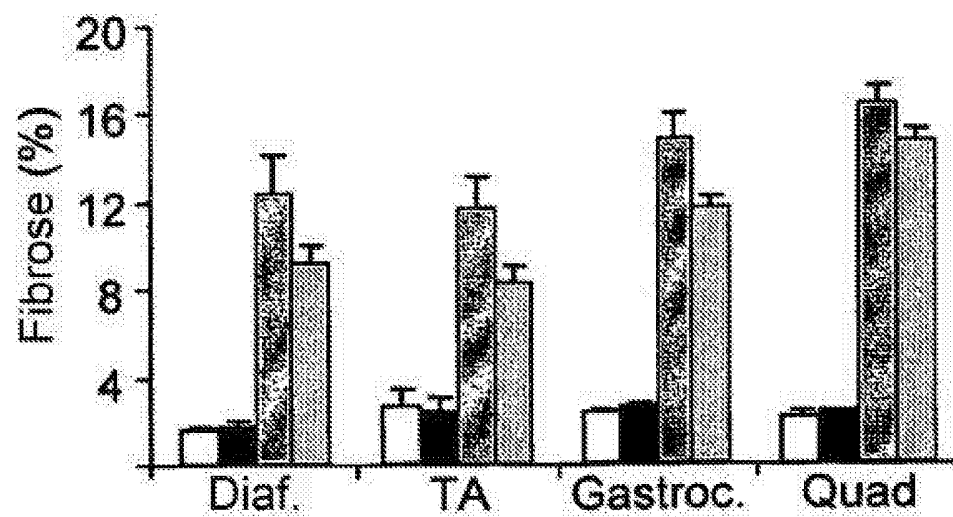
Fig. 2 (c)

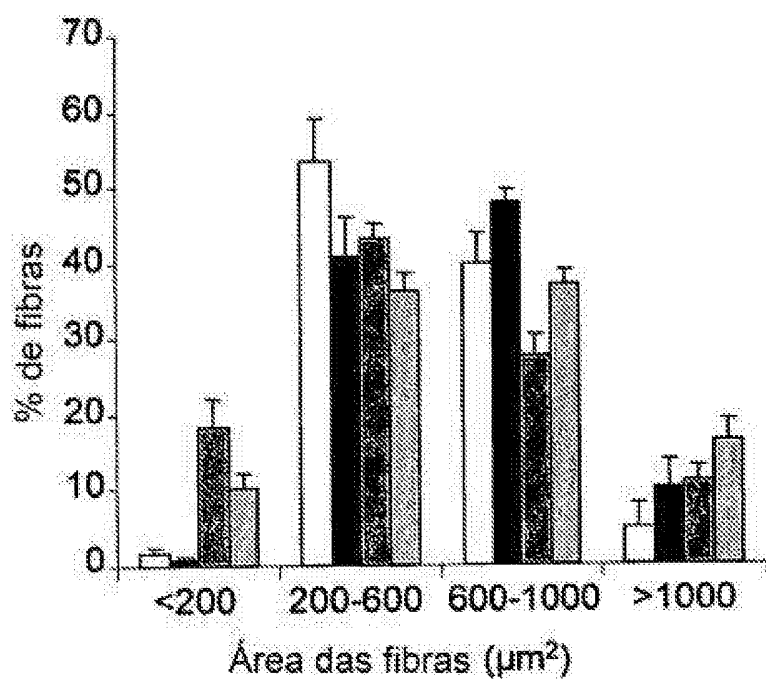
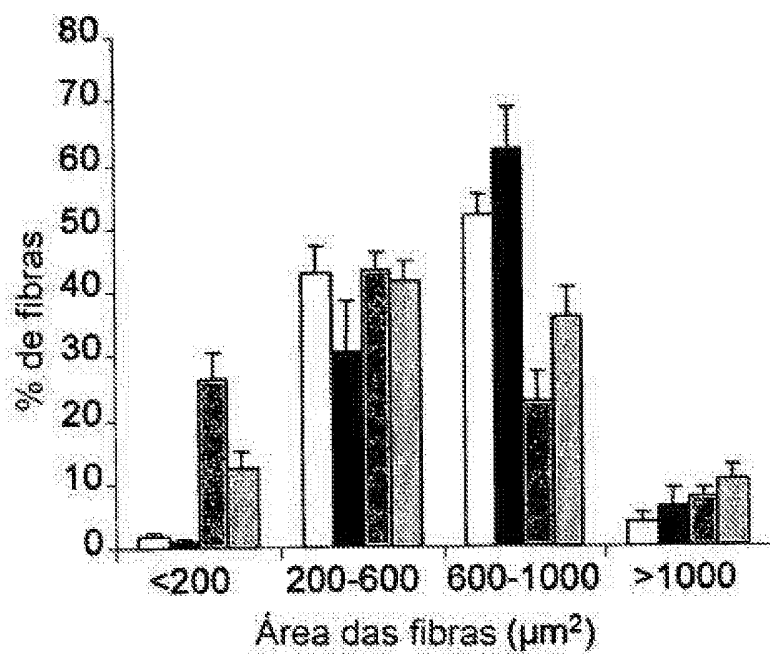
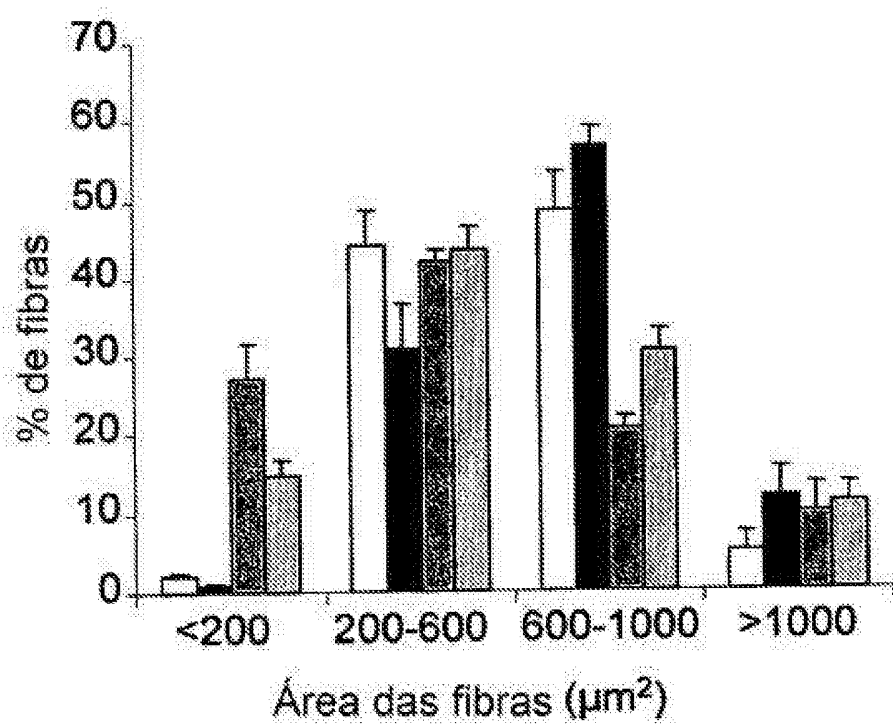
Fig. 3 (a)**Fig. 3 (b)**

Fig. 3 (c)

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * WO 2005021029 A
- * WO 0001715 A, Wenger
- * US 5625590 A
- * US 5639724 A
- * US 20030104992 A
- * GB 2222773 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- * EMERY et al. *The Lancet*, 2002, vol. 359, 687-695
- * DANIELE et al. *Int J. Biochem Cell Biol.*, 2007, vol. 39, 1608-1624
- * PARSONS et al. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, 10068-10078
- * CHAKKALAKAL et al. *Hum. Mol. Genet.*, 2004, vol. 13, 379-390
- * STUPKA et al. *Acta Neuropathol.*, 2004, vol. 107, 299-310
- * DE LUCA et al. *Am. J. Pathol.*, 2005, vol. 166, 477-489
- * STUPKA et al. *Acta Neuropathol.*, 2004, vol. 107, 299-310
- * Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, 1990
- * PARSONS et al. *Am. J. Pathol.*, 2006, vol. 168, 1975-1985