



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 844875 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 31/195 (2006.01) **A61K 31/205** (2006.01)
A61K 31/215 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1996.07.19**

(30) Prioridade(s): **1995.08.03 IT RM95054**

(43) Data de publicação do pedido: **1998.06.03**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.12.27**
002/2007

(73) Titular(es):

**SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE
RIUNITE S.P.A.**

VIALE SHAKESPEARE, 47 I-00144 ROMA

MENDES S.R.L.

IT

IT

(72) Inventor(es):

SONIA MORETTI

IT

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO

R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE DERIVADOS BÁSICOS DE L-CARNITINA E ACILO PARA A
REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE CERAMIDA**

(57) Resumo:

UTILIZAÇÃO DE DERIVADOS BÁSICOS DE L-CARNITINA E ACILO PARA A REDUÇÃO DOS NÍVEIS
DE CERAMIDA.

RESUMO

"UTILIZAÇÃO DE DERIVADOS BÁSICOS DE L-CARNITINA E ACILO PARA A
REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE CERAMIDA"

Descreve-se a utilização terapêutica de aminoácidos básicos, aminoácidos básicos acilados e os seus sais farmacologicamente aceitáveis, para a preparação de um medicamento para a profilaxia de doenças ou para o tratamento terapêutico de disfunções celulares acompanhadas por elevados níveis de ceramida.

DESCRIÇÃO

"UTILIZAÇÃO DE DERIVADOS BÁSICOS DE L-CARNITINA E ACILO PARA A REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE CERAMIDA"

A invenção presente diz respeito a uma utilização terapêutica nova de derivados de L-carnitina ou de L-carnitina acilada e dos seus sais farmacologicamente aceitáveis para a profilaxia de doenças ou o tratamento terapêutico de disfunções celulares acompanhadas por elevados níveis de ceramida.

A ceramida é a molécula básica para a estrutura dos esfingolípidos e para o seu metabolismo. Todos os esfingolípidos contêm ceramida como componente hidrofílico principal e provêm da ceramida através de caminhos de biossíntese que modificam principalmente a sua posição 1-hidroxi. Por sua vez, os esfingolípidos têm um papel importante na transdução do sinal através da membrana celular.

A ceramida desempenha um papel importante na transdução do sinal através da membrana celular. As moléculas com capacidade de actuação sobre os receptores intracelulares (isto é, calcitrol) ou os receptores transmembranares [isto é, interferão gamma (IFN- γ), interleucina-1 (IL-1) e o factor do crescimento do nervo

(NGF)] hidrolisam esfingomielina a ceramida. A ceramida activa as fosfatases e as quinases de proteína e, de um ponto de vista biológico, induz a apoptose celular, o crescimento e a diferenciação celular, modula a expressão de ciclo-oxigenases e fosfolipases e a activação dos factores nucleares $\kappa\beta$ (NF κ B) [Kuno, K. et al., J. Leukoc. Biol., 56 (5): 542-7; Cifone, M. G. et al., J. Exp. Med., 180 (4): 1547-52; Kolesnick R., Mol. Chem. Neuropathol., 21(2-3): 287-97; Jarvis, W. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91 (1): 73-7; Obeid, L. M. et al., Science, 259 (5102): 1769-71].

Verificou-se agora que as variações na concentração ou no metabolismo de ceramida contribuem para a patogénese de numerosas doenças ou contribuem para a indução de disfunções celulares metabólicas. Infelizmente, até à data, não existem métodos para se reduzirem os níveis de ceramida *in vivo*.

Deste modo, um dos objectivos desta invenção é o de proporcionar uma nova utilização de L-carnitina e de L-carnitinas aciladas e dos seus sais farmacologicamente aceitáveis para a redução dos níveis de ceramida *in vivo*.

Um segundo objectivo da invenção presente é o de proporcionar uma utilização nova de L-carnitina e de L-carnitinas aciladas e dos seus sais farmacologicamente aceitáveis para a profilaxia de doenças ou para o tratamento terapêutico de disfunções celulares acompanhados

por níveis elevados de ceramida.

De facto, verificou-se que a administração de elevadas doses de L-carnitina e de L-carnitinas aciladas e dos seus sais farmacologicamente aceitáveis reduz os níveis de ceramida e que tais compostos podem assim ser utilizados para o tratamento de doenças caracterizadas por níveis elevados de ceramida.

Especificamente, verificou-se que a carnitina ou os seus derivados acilados e os seus sais farmacologicamente aceitáveis podem ser utilizados para o tratamento de doenças caracterizadas por níveis elevados de ceramida.

De acordo com esta invenção, providencia-se uma utilização nova para L-carnitina e L-carnitinas aciladas e seus sais farmacologicamente aceitáveis para a redução dos níveis de ceramida *in vivo*.

Estes produtos encontram-se disponíveis no mercado. Estes compostos podem ser utilizados sob a forma dos seus iões internos, ou a de sais aceitáveis do ponto de vista farmacêutico.

Os derivados acilados de L-carnitina também podem ser utilizados na invenção presente. Podem-se utilizar derivados de acilo C₂₋₆ lineares ou ramificados de L-carnitina. Estes ácidos são bem conhecidos pelos

farmacologistas e pelos especialistas da técnica farmacêutica. Os grupos acilo particularmente preferidos são acetilo, propionilo, butirilo, valerilo e isovalerilo.

Podem-se formar sais farmacêuticos adequados entre os aminoácidos básicos acima referidos, e qualquer anião convencional tal como cloreto, brometo, iodeto ou um aspartato ácido tal como aspartato, um citrato ácido tal como citrato, um tartarato ácido tal como tartarato, um fosfato ácido tal como fosfato, um fumarato ácido, um glicofosfato tal como o glucofosfato, lactato ácido, maleato ácido, orotato; oxalato ácido, particularmente ácido oxálico; um sulfato, particularmente e preferencialmente sulfato, tricloroacetato, tifluoroacetato e metanossulfonato.

Os exemplos de doenças ou de disfunções caracterizados por elevados níveis de ceramida incluem doenças inflamatórias intestinais, coagulação intravascular disseminada, febre, hepatoesplenomegalia associada a doenças hepáticas inflamatórias ou metabólicas, endomiocardite, trombose capilar, meningoencefalite devida a agentes infecciosos, transplante de órgãos, artrite reumatóide e doenças do tecido conjuntivo, e doenças auto-imunes, hipertiroidismo, lesões causadas por radiações e/ou agentes de quimioterapia e síndrome da fadiga crónica.

Uma vez que a utilização de alguns medicamentos pode também induzir elevados níveis de ceramida, a invenção

presente também contempla a redução dos níveis de ceramida nos pacientes tratados com tais medicamentos. Por exemplo, um aminoácido básico de acordo com a invenção presente pode ser co-administrado com corticoesteróides (tais como a dexametasona), anti-inflamatório (tais como a indometacina), antivirais (tais como o interferão), imunossupressores (tais como a ciclosporina), agentes de quimioterapia (tais como a adriamicina), imunopotenciadores (tais como a imunoglobulinas e as vacinas) e agentes endocrinológicos (tais como o metimazol) para impedir níveis acrescidos de ceramida.

Os níveis normais de ceramidas em doentes saudáveis dependem da idade, do tamanho e do peso do indivíduo, mas encontram-se geralmente no intervalo de entre 5 e 50 picomoles/ 10^6 células (preferencialmente, linfócitos do sangue periférico). Os níveis acima de 50 picomoles/ 10^6 células são considerados níveis elevados. A utilização de aminoácidos básicos, aminoácidos básicos acilados e seus sais farmacologicamente aceitáveis da invenção presente, reduz tais níveis elevados em pelo menos 25%.

Em geral, administram-se L-carnitina ou um seu derivado acilado de acordo com a invenção presente em concentrações que reduzem os níveis de ceramida em pelo menos 25%. Adequadamente, alcança-se este resultado com a administração de 50 mg a aproximadamente 15 g/dia de aminoácidos básicos por via oral ou parentérica.

Preferencialmente, devem ser administrados níveis elevados de L-carnitina ou de um seu derivado acilado, i.e., >1 g por dia, >2 g por dia; particularmente e preferencialmente, 4-10 g por dia.

A monitorização dos níveis de ceramida pode ser levada a cabo tanto pela monitorização directa dos níveis de ceramida numa célula (tal como um linfócito) como por monitorização indirecta das concentrações de um metabolito de ceramida numa célula. De preferência, os níveis de ceramida do doente são monitorizados tanto antes como após a administração de L-carnitina ou de um seu derivado acilado, de modo a avaliar a extensão da redução. A monitorização pode ter início em qualquer altura após a administração mas, apropriadamente, terá início após 3 horas para assegurar resultados rigorosos. Pode-se continuar a monitorização indefinidamente.

Os níveis de ceramida podem ser medidos directamente isolando linfócitos do sangue periférico do doente. Em seguida centrifugam-se as células para se eliminar o sobrenadante, e retiram-se os lípidos da pastilha de células. A fase orgânica que contém a ceramida pode ser avaliada utilizando o "ensaio da DAG quinase" para fosforilar a ceramida, que se evidencia por autoradiografia [Cifone, M. G. et al., J. Exp. Med., 180 (4): 1547-52].

Tendo descrito esta invenção na generalidade, uma

maior compreensão pode ser conseguida fazendo referência a certos exemplos específicos, que se disponibilizam neste documento, com intenções meramente ilustrativas e não se pretende sejam tomados como limitativos, a menos que se especifique o contrário.

Exemplo 1

Isolaram-se linfócitos de sangue periférico de acordo com as metodologias clássicas. Incubaram-se as células com L-carnitina (200 mcg/ml) ou com isovaleril-L-carnitina durante 30 min a 37°C, e depois com anticorpo monoclonal anti-Fas durante mais 30 min. Em seguida centrifugaram-se as células, eliminando o sobrenadante, e retiraram-se os lípidos da pastilha de células. Avaliou-se a fase orgânica (contendo a ceramida) no "ensaio da quinase DAG" para fosforilar a ceramida, que se evidenciou subsequentemente por auto radiografia.

Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 1.

Tabela 1

	Ceramida (<u>picomoles/10⁶células</u>)
Controlo	20
Controlo + anticorpo anti-Fas	81,6
Controlo + anticorpo anti-Fas + L-carnitina (100 mcg/ml)	7,3

Controlo + anticorpo anti-Fas +	8,6
Isovaleril-L-carnitina (50 mcg/ml)	
Controlo + anticorpo anti-Fas +	7,3
Isovaleril-L-carnitina (100 mcg/ml)	

Sabe-se que as células estimuladas adequadamente (isto é, com Fas-L, interleucina-1, etc.) geram ceramida. Utilizou-se um anticorpo anti-Fas para aumentar a produção de ceramida a partir de um valor de base (20 picomoles por 10^6 células) até 81,6 picomoles por 10^6 células.

A L-carnitina e a isovaleril-L-carnitina mostram assim inibir a síntese de ceramida *in vitro*.

Exemplo 2

Trataram-se dois doentes que sofriam de neuromiopia sintomática (síndrome da fadiga crónica) com 3 g por dia de L-carnitina por via oral ao longo de dois meses.

Mediu-se o nível de ceramida nos músculos antes e depois da administração.

Os resultados encontram-se indicados abaixo na Tabela 2.

Tabela 2

	Ceramida pré-tratamento <u>(picomoles por mg de proteínas)</u>	Ceramida pós-tratamento <u>(picomoles por mg de proteínas)</u>
Doente 1	76	28
Doente 2	142	46

Exemplo 3

Trataram-se quatro doentes, que sofriam de hipertiroidismo e tinham sido tratados com metimazol (15 mg por via oral, diariamente) durante mais de oito meses, durante quatro semanas com 8 g por dia de L-carnitina, por via oral.

Determinou-se a quantidade de ceramida associada aos linfócitos antes e depois do tratamento.

Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 3 que se segue.

Tabela 3

	Ceramida pré-tratamento <u>(picomoles/10⁶ células)</u>	Ceramida pós-tratamento <u>(picomoles/10⁶ células)</u>
Doente 1	73	26
Doente 2	45	27
Doente 3	111	36
Doente 4	69	18

Exemplo 4

Trataram-se três doentes, com hepatoesplenomegalia devida a hepatite viral do tipo C, com 4 g de L-carnitina em *bolus*, por via endovenosa.

Determinou-se a quantidade de ceramida associada aos linfócitos antes, e às 3 e 48 horas depois da infusão.

Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 4 que se segue.

Tabela 4

	Doente 1	Doente 2	Doente 3
	Ceramida	Ceramida	Ceramida
	(picomoles/10 ⁶ células)	(picomoles/10 ⁶ células)	(picomoles/10 ⁶ células)
Pré-			
tratamento	65	77	78
Após 3 horas	12	32	24
Após 48 horas	31	21	23

Torna-se aparente que a administração de um *bolus* de L-carnitina inibiu o aumento dos níveis de ceramida logo 3 horas após a infusão. O efeito mantém-se pelo menos durante dois dias.

Exemplo 5 (NÃO FAZ PARTE DA INVENÇÃO)

Trataram-se quatro doentes, que sofriam de catabolismo proteico e de depleção lipídica como consequência de infecção tuberculosa, durante duas semanas com 8 g por dia de L-carnitina por via parentérica.

Determinou-se a quantidade de ceramida associada aos linfócitos no sangue periférico antes e após o tratamento.

Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 5 que se segue.

Table 5

	Ceramida pré-tratamento (picomoles/10 ⁶ células)	Ceramida pós-tratamento (picomoles/10 ⁶ células)
Doente 1	127	59
Doente 2	265	77
Doente 3	301	152
Doente 4	78	54

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de L-carnitina ou de uma L-carnitina acilada, em que o acilo seja seleccionado de entre o grupo que inclui acetilo, propionilo, butirilo, valerilo e isovalerilo ou um seu sal farmacologicamente aceitável, para a produção de um medicamento para a profilaxia ou o tratamento terapêutico de doenças ou de disfunções celulares caracterizados por elevados níveis de ceramida, sendo que as ditas doenças ou disfunções incluem doenças inflamatórias intestinais, coagulação intravascular disseminada, trombose capilar, meningoencefalite devida a agentes infecciosos, doenças do tecido conjuntivo e lesões causadas por radiações.

2. A utilização da reivindicação 1, em que o aminoácido básico, o aminoácido básico acilado, a L-carnitina, a L-carnitina acilada ou os seus sais farmacologicamente aceitáveis, são co-administrados com corticoesteróides, agentes anti-inflamatórios, agentes antivirais, imunossuppressores, agentes citostáticos e imunostimulantes.

3. Utilização de isovaleril-L-carnitina para a produção de um medicamento para a profilaxia ou para o tratamento terapêutico de doenças ou de disfunções incluindo doenças inflamatórias intestinais, coagulação intravascular disseminada, febre, hepatoesplenomegalia

associada a doenças hepáticas inflamatórias ou metabólicas, endomiocardite, trombose capilar, meningoencefalite devida a agentes infecciosos, disfunções induzidas por transplante de órgãos, artrite reumatóide e doenças do tecido conjuntivo, doenças auto-imunes, hipertiroidismo, lesões causadas por radiações e/ou agentes de quimioterapia e síndrome da fadiga crónica.

Lisboa, 8 de Fevereiro de 2007