



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101177** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
A61K 38/13 (2006.01)
A61P 21/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2010 10796**
(22) Дата подання заявки: **05.02.2009**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **11.03.2013**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **PCT/IB2008/000292**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **08.02.2008**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **IB**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.11.2010, Бюл.№ 22**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **11.03.2013, Бюл.№ 5**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/IB2009/000204, 05.02.2009**
(72) Винахідник(и): **Молкентін Джефрі Д. (US)**
(73) Власник(и): **ДЕБІОФАРМ СА, Forum "apres-demain", Ch. Messidor 5-7, CH-1002 Lausanne, Switzerland (CH)**
(74) Представник: **Новікова Лідія Аркадіївна, реєстр. №36**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2006/072639 A, 13.07.2006
ANGELIN A ET AL: "Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 20070116 US, vol. 104, no. 3, 16 January 2007 (2007-01-16), pages 991-996

(56) EMERY A E: "The muscular dystrophies" LANCET THE, LANCET LIMITED, LONDON, GB, vol. 359, no. 9307, 23 February 2002 (2002-02-23), pages 687-695
MAGNUS J HANSSON ET AL: "The Nonimmunosuppressive Cyclosporin Analogs NIM811 and UNIL025 Display Nanomolar Potencies on Permeability Transition in Brain-Derived Mitochondria" JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 36, no. 4, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 407-413
PARSONS STEPHANIE A ET AL: "Genetic disruption of calcineurin improves skeletal muscle pathology and cardiac disease in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 30 MAR 2007, vol. 282, no. 13, 30 March 2007 (2007-03-30), pages 10068-10078
DANIELE ET AL: "Ins and outs of therapy in limb girdle muscular dystrophies" INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, EXETER, GB, vol. 39, no. 9, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 1608-1624
NAKAYAMA HIROYUKI ET AL: "Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION SEP 2007, vol. 117, no. 9, September 2007 (2007-09), pages 2431-2444
MILLAY DOUGLAS P ET AL: "Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy." NATURE MEDICINE APR 2008, vol. 14, no. 4, April 2008 (2008-04), pages 442-447
REUTENAUER J ET AL: "Investigation of Debio 025, a cyclophilin inhibitor, in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy." BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY OCT 2008, vol. 155, no. 4, October 2008 (2008-10), pages 574-584

(54) НЕІМУНОСУПРЕСОРНИЙ ЦИКЛОСПОРИН А ДЛЯ ЛІКУВАННЯ М'ЯЗОВОЇ ДИСТРОФІЇ

(57) Реферат:

UA 101177 C2

Даний винахід стосується застосування циклоспорину А формули:

$[D\text{-MeAla}]^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$

для виготовлення лікарського засобу для лікування тазово-плечової форми м'язової дистрофії.

Даний винахід стосується застосування неімуносупресивного похідного циклоспорину А для зниження індукції некрозу м'язових волокон та дегенерації м'язових волокон у суб'єкта, у якого діагностована поясно-кінцівкова м'язова дистрофія (ПКМД), зокрема, саркогліканопатія.

М'язові дистрофії (МД) включають різнотипну групу спадкових розладів, які широко вражають поперечносмугасту м'язову тканину, приводячи в результаті до прогресуючої м'язової слабкості, виснаження і в багатьох випадках до передчасної смерті. Багато охарактеризованих мутацій, які причинно пов'язані з МД у людей, обумовлені змінами в структурних зв'язувальних білках, які прикріплюють нижчерозміщені скорочувальні білки до базальної пластинки, забезпечуючи ригідність клітинної мембрани кістякових м'язів (сарколеми), або в білках, які безпосередньо стабілізують чи репарують клітинну мембрану, таких як, наприклад, саркоглікан або дистрофін.

Наслідуючі мутації генів саркоглікану (генів альфа-, бета-, гамма- та дельта-саркоглікану) викликають скелетно-м'язове захворювання із гетерогенними синдромами, ПКМД, та його підгрупу, саркогліканопатії. Синдроми або фенотипи саркогліканопатій залежать від того, який ген саркоглікану мутований, та від типу генетичних мутацій (алельного варіанта), і проявляють чотири форми конкретних розладів: ПКМД типів 2C, 2D, 2E та 2F (мутації генів гамма-, альфа-, бета- та дельта-саркоглікану, відповідно), які представляють 25 % усіх діагностованих випадків ПКМД. Зокрема, різні мутації, що специфічно виявляються в гені дельта-саркоглікану, приводять в результаті до важкого розладу ПКМД типу 2F або ПКМД2F (Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] #601287, genetic mutations: [OMIM] 601411. Emery et al., The Lancet, 2002, 359:687-695.).

Різні типи ПКМД характеризуються прогресуючим виснаженням та слабкістю з атрофією, що переважно охоплює м'язи рук та ніг, проксимальні до плеча і стегна, відповідно. Фенотипи захворювання нагадують синдроми важкої м'язової дистрофії типу Дюшенна або Беккера. Однак останні захворювання залучають інші молекулярні механізми і генетичні розлади. До того, як стали доступні молекулярні діагностики ПКМД, пацієнтів із ПКМД часто діагностували як осіб, що страждають м'язовою дистрофією Дюшенна. Початок захворювання варіює від раннього дитинства до дорослого стану із клінічними формами від легких до важких. Аж до 25 % пацієнтів проявляють важкі форми захворювання, і у них розвивається важкий поперековий лордоз, контрактури п'яткових сухожилів, м'язова гіпертрофія, кардіоміопатія і порушення серцевої провідності. Гіпертрофія ікроножних м'язів або язика, вибірковість залученості м'язів та серцеві ускладнення пізньої стадії більш-менш специфічно пов'язані з кожною із різних форм (Danièle et al., Int J. Biochem Cell Biol., 2007; 39:1608-1624). Прогресуюча слабкість приводить до рестриктивного легеневого процесу і гіповентиляції, що вимагає допоміжної вентиляції. В цілому захворюваність та смертність варіюють. При ранньому початку прогресування захворювання до смерті типово є дуже швидким. Смерть часто настає внаслідок респіраторних ускладнень.

До теперішнього часу є недоступним специфічне лікування для пацієнтів, що страждають будь-яким із синдромів ПКМД. Інтенсивна підтримуюча терапія, наприклад, ортопедія, хірургія і фізіотерапевтичне лікування для збереження м'язової функції, максимально збільшує функціональну здатність та продовжує очікувану тривалість життя. Однак ці заходи не можуть запобігти дегенерації м'язових волокон та виникненню, в остаточному підсумку, респіраторних ускладнень.

Завдяки розробці моделей на тваринах, у яких відсутні специфічні гени, залучені в м'язову дистрофію, наблизилися до кращого розуміння молекулярних механізмів, що лежать в основі саркогліканопатій. Нещодавно було показано, що м'язові клітини мишей, у яких відсутній дельта-саркоглікан (мишей *scgd*^{-/-}) внаслідок спрямованої інактивації гена дельта-саркоглікану (*scgd*), мають схильність до підвищеного клітинного припливу кальцію. Припускають, що втрата компонентів комплексу дистрофін-глікопротеїн (ДГК), такого як комплекс дистрофіну або саркоглікану, приводить в результаті до фундаментальної зміни фізичних властивостей клітинної мембрани м'язів та до підвищеної проникності і протікання сарколеми. Активація нерегульованих каналів припливу кальцію, викликана нестабільністю і ламкістю мембран, може ініціювати дистрофічне захворювання в кістяковому м'язі, що приводить до дегенерації м'язових волокон та індукції некрозу м'язових волокон.

Авторами Parsons et al. (J. Biol. Chem., 2007, 282:10068-10078) показано, що інгібування активованої кальцієм/кальмодуліном активності сериної/треонінової протеїнфосфатази кальциневрину в результаті генетичної делеції зменшувало дегенерацію і запалення кістякового м'яза та м'язових волокон у мишей *scgd*^{-/-}, а також було цитопротекторним. Аналогічні поліпшення захворювання внаслідок інгібування активності кальциневрину не спостерігали у мишей з відсутнім геном *mdx* (мутація гена дистрофіну), використовуваних як модель м'язової

дистрофії Дюшенна, навіть незважаючи на те, що в обох моделях м'язової дистрофії спостерігали підвищений приплив кальцію. Дійсно, активований трансген для кальциневрину захищав мишей mdx (Chakkalakal et al., Hum. Mol. Genet., 2004, 13: 379-399; Stupka et al. Acta Neuropathol., 2004, 107: 299-310, але див. De Luca et al., Am. J. Pathol., 2005, 166: 477-489).

5 Авторами Parsons et al. ідентифікований кальциневрин як потенційна мішень для терапевтичних агентів ПКМД. На підставі цих спостережень Parsons et al. припустили, що інгібування активності кальциневрину може забезпечити певну користь при вибраних типах м'язових захворювань, таких як поясно-кінцівкова м'язова дистрофія, і що, отже, циклоспорин А (CsA) міг би мати потенційну користь.

10 Ефекторні механізми, які викликають прогресуючу дегенерацію м'язових волокон, індувану зміненою проникністю мембрани при ПКМД, погано зрозумілі та є предметом активних досліджень, які можуть забезпечити основу для кінцевої розробки основаних на механізмі нових стратегій лікування для пацієнтів, що страждають цим розладом. Зараз, однак, відсутній ефективний спосіб, доступний для лікування пацієнтів, що страждають ПКМД. Тому існує необхідність у нових терапевтичних підходах, таких як описані в даній заявці.

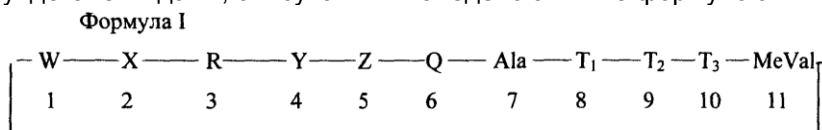
15 Мета даного винаходу полягає в забезпеченні лікарів терапією для лікування як індукції, так і прогресування некрозу м'язових волокон та дегенерації м'яза у пацієнта, що страждає ПКМД, і, зокрема, саркогліканопатією, більш конкретно, ПКМД типу 2F. Ця терапія повинна захищати проти некрозу дистрофічних кістякових м'язів, а також серцевого і діафрагмального м'яза, та повинна сповільнити прогресування захворювання.

20 Автори даного винаходу несподівано виявили, що введення неімуносупресивного похідного циклоспорину А (CsA), що не інгібує кальциневрин, суб'єкту, який страждає розладами, діагностованими як ПКМД, і, зокрема, саркогліканопатією, більш конкретно, ПКМД типу 2F, є ефективною терапією. Вони спостерігали, що введення неімуносупресивного похідного CsA [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA зменшує м'язову патологію суб'єкта, у якого діагностований некроз м'язових волокон, зокрема, ПКМД, та більш конкретно, ПКМД типу 2F, а також дегенерацію і прогресування захворювання, а також нормалізує розподіл площі м'язових волокон шляхом зниження чутливості мітохондрій до латентного перевантаження кальцію.

30 Суб'єкт може бути людиною або ссавцем, таким як, наприклад, миша, які проявляють фенотип м'язової дистрофії в результаті делеції гена або відсутності експресії гена, відповідального за фенотип захворювання.

Таким чином, даний винахід стосується застосування неімуносупресивного похідного CsA формули I, більш конкретно, неімуносупресивного похідного CsA формули II, і найкраще, неімуносупресивного похідного CsA [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA формули III, для одержання лікарського препарату для попередження або зменшення м'язової дегенерації у суб'єкта, що страждає ПКМД, і, зокрема, саркогліканопатією, більш конкретно, ПКМД типу 2F. Неімуносупресивні похідні CsA, придатні для застосування за даним винаходом, були також описані в міжнародній заявці на патент WO 2005/021028, Novartis AG, на сторінках 3-6. [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA був розкритий авторами Wenger et al. у міжнародній заявці на патент WO 00/01715. [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA формули III наданий реєстраційний номер CAS 254435-95-5.

40 Неімуносупресивні похідні CsA, застосовні в даному винаході, є циклічними ундекапептидами, описуваними наведеною нижче формулою:



де

45 W позначає MeBmt, дигідро-MeBmt, 8'-гідрокси-MeBmt або O-ацетил-MeBmt,

X позначає αAbu, Val, Thr, Nva або O-метилтреонін (MeOThr),

R позначає Pro, Sar, (D)-MeSer, (D)-MeAla або (D)-MeSer(O-ацетил),

Y позначає MeLeu, tioMeLeu, γ-гідрокси-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle або MeaThr; N-етилVal (EtVal), N-етилIle, N-етилThr, N-етилPhe, N-етилTyr або N-етилThr(O-ацетил),

50 де Y не може бути MeLeu, коли R позначає Sar,

Z позначає Val, Leu, MeVal або MeLeu,

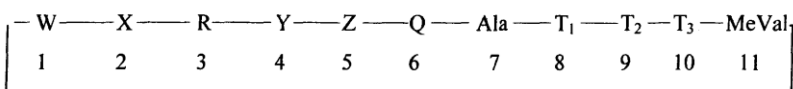
Q позначає MeLeu, γ-гідрокси-MeLeu, MeAla або Pro,

T₁ позначає (D)Ala або Lys,

T₂ позначає MeLeu або γ-гідрокси-MeLeu, та

55 T₃ позначає MeLeu або MeAla.

Формула II



де

W позначає MeBmt, дигідро-MeBmt, 8'-гідрокси-MeBmt;

5 X позначає αAbu, Val, Thr, Nva або O-метилтреонін (MeOThr);

R позначає Pro, Sar, (D)-MeSer, (D)-MeAla або (D)-MeSer(O-ацетил);

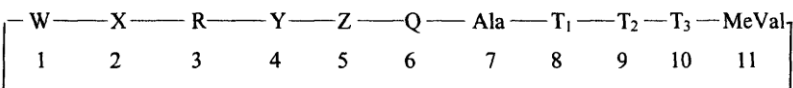
Y позначає MeLeu, tioMeLeu, γ-гідрокси-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle або MeaThr; N-етилVal (EtVal), N-етилIle, N-етилThr, N-етилPhe, N-етилTyr або N-етилThr(O-ацетил), де Y не може бути MeLeu, коли R позначає Sar;

10 Z позначає Val, Leu, MeVal або MeLeu;

Q позначає MeLeu, γ-гідрокси-MeLeu або MeAla;

T₁ позначає (D)Ala;T₂ позначає MeLeu; таT₃ позначає MeLeu.

Формула III



де

W позначає MeBmt;

X позначає αAbu;

R позначає (D)-MeAla;

20 Y позначає N-етилVal (EtVal);

Z позначає Val;

Q позначає MeLeu;

T₁ позначає (D)Ala;T₂ позначає MeLeu; і25 T₃ позначає MeLeu,

і де MeBmt позначає N-метил-(4R)-4-бут-2Е-ен-1-іл-4-метил-(L)треонін, αAbu позначає L-α-аміномасляну кислоту, D-MeAla позначає метил-D-аланін, EtVal позначає N-етил-L-валін, Val позначає L-валін, MeLeu позначає N-метил-L-лейцин, Ala позначає L-аланін, (D)Ala позначає D-аланін, і MeVal позначає N-метил-L-валін. Загальноприйнята нумерація положень амінокислот, звичайно використовувана в посиланні на циклоспорин А, показана в наведеній нижче формулі. Складені назви використовують для похідних CsA, де ці складені назви включають першу частину, яка вказує ідентичність залишків, що відрізняються від залишків у циклоспорині А, і дає їх положення, та другу частину, позначену "CsA", яка вказує, що всі інші залишки ідентичні залишкам у циклоспорині А. Наприклад, [Melle]⁴-CsA позначає циклоспорин, який ідентичний циклоспорину А, за винятком того, що MeLeu у положенні 4 замінений Melle (метил-L-ізолейцином).

У наступній формі здійснення винахід стосується неімуносупресивного похідного циклоспорину А формули I, краще, неімуносупресивного похідного CsA формули II, і найкраще, неімуносупресивного похідного CsA [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA формули III, для застосування при лікуванні ПКМД, зокрема, від саркогліканопатії, і більш конкретно, від ПКМД типу 2F.

В іншій формі здійснення винахід стосується способу попередження або зменшення м'язової дегенерації у суб'єкта, що страждає ПКМД, і, зокрема, саркогліканопатією, більш конкретно, ПКМД типу 2F, який включає введення суб'єкту ефективної кількості неімуносупресивного похідного CsA формули I, краще, неімуносупресивного похідного CsA формули II, і найкраще, неімуносупресивного похідного CsA [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA формули III. Ефективну кількість неімуносупресивного похідного циклоспорину А розуміють як кількість, яка при повторному введенні в ході терапевтичної схеми суб'єкту, що страждає ПКМД, і, зокрема, саркогліканопатією, та більш конкретно, ПКМД типу 2F, приводить в результаті до об'єктивної клінічної відповіді, такої як поліпшення, стабілізація або вповільнення прогресування захворювання. При введенні перорально ефективна кількість для добового введення або введення три рази на тиждень повинна становити від приблизно 1 мг/кг (маси тіла) до приблизно 100 мг/кг, краще, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 20 мг/кг. Показане відповідне

дозування для внутрішньовенного шляху може складати від приблизно 1 мг/кг до приблизно 50 мг/кг, краще, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 25 мг/кг.

Крім того, винахід стосується фармацевтичної композиції для попередження або зменшення м'язової дегенерації у суб'єкта, що страждає ПКМД, і, зокрема, саркогліканопатією, та більш конкретно, ПКМД типу 2F, яка містить ефективну кількість неімуносупресивного похідного CsA формули I, краще, неімуносупресивного похідного CsA формули II, і найкраще, неімуносупресивного похідного CsA $[D\text{-MeAla}]^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ формули III, фармацевтично прийнятний носій і, можливо, але необов'язково, ексципієнт та розріджувач. Розріджувач типово є водою. Ексципієнти, які типово додають в парентеральні препарати, включають ізотонічний агент, буфер або інший рН-регулюючий агент та консервант. Композиції можуть містити інші активні інгредієнти, такі як антибіотик, глюкокортикоїд, кортикостероїд, такий як, наприклад, преднізон.

Даний винахід буде додатково пояснений нижче за допомогою наведених нижче графічних матеріалів.

- На фіг. 1(а) представлено набрякання базового рівня, вимірюване як поглинання при 540 нм, мітохондрій з кістякового м'яза 6-тижневих мишей дикого типу (Wt) (білий стовпчик) та мишей scgd^{-/-} (чорний стовпчик). Мітохондрії з групи підшовних м'язів, чотириглавого та переднього великогомілкового м'язів об'єднували. Як показує більш низький вимір поглинання, мітохондрії з м'язів мишей scgd^{-/-} були більшою мірою набряклими при базовому рівні, ніж мітохондрії від мишей Wt.

- На фіг. 1(б) представлені зміни в набряканні мітохондрій через 10 хвилин після обробки кальцієм (Ca^{2+}) або ПЕГ-3350 (ПЕГ), вимірювані як різниця у поглинанні при 540 нм між необробленими і обробленими мітохондріями від 6-тижневих мишей дикого типу (Wt) (білий стовпчик) та мишей scgd^{-/-} (чорний стовпчик). Мітохондрії із групи підшовних м'язів, чотириглавого і переднього великогомілкового м'язів об'єднували.

- На фіг. 2(а) представлено зменшення м'язової патології після введення $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ у мишей scgd^{-/-}. Відношення маси м'язів (MW) до довжини великогомілкової кістки (TL) (MW/TL) вимірювали в ікроножному (Gastroc.), чотириглавому (Quad.), передньому великогомілковому (TA) та серцевому м'язах від мишей дикого типу (Wt), оброблених або носієм (білий стовпчик), або $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ (чорний стовпчик), чи від мишей scgd^{-/-}, оброблених або носієм (сірий стовпчик чи другий від кінця в групі), або $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ (стовпчик із точковою заливкою або останній стовпчик у групі). $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ запобігає збільшенню маси м'яза у мишей scgd^{-/-}, обумовленому захворюванням.

- На фіг. 2(б) представлено зменшення м'язової патології після введення $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ у мишей scgd^{-/-}, спостережуване в репрезентативних зрізах, пофарбованих гематоксиліном та еозином, чотириглавого м'яза від мишей дикого типу (Wt) та мишей scgd^{-/-}, оброблених $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$. Також показані відповідні контролю носія.

- На фіг. 2(в) представлено зменшення м'язової патології після введення $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ у мишей scgd^{-/-}, оцінюване шляхом кількісного визначення площ волокон у зрізах, пофарбованих трихромом, з діафрагми (Diaph.), переднього великогомілкового м'яза (TA), ікроножного м'яза (Gastroc.), чотириглавого м'яза (Quad). Оцінювали зрізи від мишей дикого типу (Wt), оброблених або носієм (білий стовпчик), або $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ (чорний стовпчик), та від мишей scgd^{-/-}, оброблених або носієм (сірий стовпчик чи другий стовпчик від кінця в групі), або $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ (стовпчик із точковою заливкою чи останній стовпчик групи). $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ зменшував фіброз у мишей scgd^{-/-}.

- На фіг. 3(а) представлено зменшення гетерогенності площі м'язових волокон у м'язі від мишей scgd^{-/-} після введення $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$, яку оцінювали шляхом кількісного визначення розподілу площ волокон у передньому великогомілковому (м'язі). Дослідження включало мишей дикого типу (Wt), оброблених або носієм (білий стовпчик), або $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ (чорний стовпчик), та мишей scgd^{-/-}, оброблених або носієм (сірий стовпчик чи другий стовпчик від кінця в групі), або $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ (стовпчик із точковою заливкою чи останній стовпчик у групі). (" $<$ " позначає "нижче", ">" позначає "вище"). Обробка $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ нормалізувала гетерогенність площі волокон у мишей scgd^{-/-}.

- На фіг. 3(б) представлено зменшення гетерогенності площі м'язових волокон у м'язі від мишей scgd^{-/-} після введення $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$, яку оцінювали шляхом кількісного визначення розподілу площ волокон в ікроножному (м'язі). Дослідження включало мишей дикого типу (Wt), оброблених або носієм (білий стовпчик), або $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ (чорний стовпчик), та мишей scgd^{-/-}, оброблених або носієм (сірий стовпчик або другий стовпчик від кінця в групі), або $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ (стовпчик із точковою заливкою або останній стовпчик групи). (" $<$ " позначає "нижче", ">" позначає "вище"). Обробка $D\text{-[MeAla]}^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$

нормалізувала гетерогенність площ волокон у мишей scgd-/-.

- На фіг. 3(в) представлено зменшення гетерогенності площі м'язових волокон у м'язі від мишей scgd-/- після введення D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, яку оцінювали шляхом кількісного визначення розподілу площ волокон у чотиригловому м'язі. Дослідження включало мишей

дикого типу (Wt), оброблених або носієм (білий стовпчик), або D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (чорний стовпчик), та мишей scgd-/-, оброблених або носієм (сірий стовпчик чи другий стовпчик від кінця в групі), або D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (стовпчик із точковою заливкою чи останній стовпчик групи). (" $<$ " позначає "нижче", " $>$ " позначає "вище"). Обробка D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA нормалізувала гетерогенність площ волокон у мишей scgd-/-.

Якщо підвищена концентрація кальцію служить ініціатором ПКМД шляхом некрозу м'язових волокон, ряд нижчележачих кальцій-залежних ефекторів можна потенційно вважати причинними факторами. Наприклад, підвищений кальцій може призвести до некрозу м'язових трубочок шляхом активації активованої кальцієм протеази калпаїну, сигнального білка, критично залученого у регенерацію кістякових м'язів після ушкодження і в диференціацію скелетно-м'язових клітин.

Автори Parsons et al. (2007) показали в мишачій моделі ПКМД, що інгібування активності активованої кальцієм/кальмодуліном серинової/треонінової протеїнфосфатази кальциневрину в результаті генетичної делеції зменшувало дегенерацію і запалення кістякового м'яза та м'язових волокон, тобто, поліпшувало патологію кістякового м'яза. Цього не було у випадку мишачої моделі дистрофії Дюшенна, де інгібування кальциневрину CsA було шкідливим для м'язової патології (Stupka et al., Acta Neuropathol., 2004, 107:299-310). Ця розбіжність у наслідках інгібування активності кальциневрину при різних дистрофіях, що характеризуються підвищеними концентраціями кальцію в м'язових клітинах, переважно, є наслідком їх відповідних різних генетичних делецій, що залучають, та діють на, різні зміни мембран м'язових клітин та різні шляхи передачі сигналу.

Іншим основним механізмом, який веде до клітинного некрозу, є перевантаження мітохондріального кальцію, яке вторинно підсилює утворення активних форм кисню (АФК) та додатково сприяє МРТ (зміні мембранної проникності мітохондрій). Підвищений субсарколемний кальцій також сприяє локальному підвищенню активних форм кисню (АФК), що приводить до більш значних дефектів у клітинній мембрані і додатковому надходженню кальцію, що додатково сприяє клітинному некрозу та/або апоптозу.

Були проведені експерименти з експериментальної перевірки існування причинного зв'язку між відсутністю гена scgd, прогресуючою дегенерацією м'язових волокон та клітинним некрозом та/або апоптозом, індукованим мітохондріальною дисфункцією.

Щоб оцінити, чи може індукована кальцієм мітохондріальна дисфункція ініціювати і направляти прогресуючу дегенерацію м'язових волокон, обумовлену ПКМД, автори даного винаходу порівнювали мітохондрії, виділені з дистрофічного кістякового м'яза мишей scgd-/- та мишей дикого типу. Мітохондрії, виділені шляхом гомогенізації в буфері, що містить сахарозу (250 мМ сахарози, 10 мМ трис (pH 7,4), 1 мМ ЕДТА), із групи підшовних м'язів, чотириглого і переднього великогомілкового м'язів, суспендували після промивань та центрифугування в ізотонічному буфері (120 мМ KCl, 10 мМ трис (pH 7,4), 5 мМ K₂HPO₄) та тестували в аналізі набрякання. Цей аналіз полягав в інкубації виділених мітохондрій з 200 мМ CaCl₂ (набрякання) або 5 % (мас./об.) ПЕГ-3350 (зморщування). Набрякання дає зменшення, а зморщування - збільшення поглинання при 540 нм. Результати представлені у вигляді середніх значень \pm СОС (стандартна похибка середніх) (фіг. 1 (а) та фіг. 1 (б)). Використовували двовибірковий t-критерій Стюдента, і значення вважали значущими тільки при $p < 0,05$.

Мітохондрії, виділені з кістякового м'яза мишей scgd-/-, набрякали при базовому рівні в порівнянні з мітохондріями мишей дикого типу. Вони були також рефракторними до додаткового набрякання екзогенно нанесеним кальцієм та не проявляли реверсії в набряканні базового рівня (фіг. 1(а) та фіг. 1(б)). Ця нечутливість мітохондрій мишей scgd-/- до додаткового кальцію вказувала на те, що вони були набряклими і патологічними, що відповідає нижчележачим патологічним ефектам, таким як відповідь псевдогіпертрофії в ікроножному м'язі і чотиригловому м'язу у віці 6 тижнів, де ця гіпертрофія обумовлена запаленням тканини, виражене зниження м'язових мас із віком у порівнянні з мишами дикого типу, характерне збільшення центральної нуклеації м'язових волокон, що вказує на регенерацію внаслідок триваючої дегенерації і численні цикли дегенерації/регенерації, та дестабілізація м'язової мембрани, ушкодженої надлишком кальцію.

Вищевказані відкриття є сильним свідченням на користь припущення, що кальційзалежний процес МРТ лежить в основі прогресуючої дегенерації м'язових волокон, обумовленої ПКМД, навіть незважаючи на те, що латентна мітохондріальна аномалія може не бути прогностичною

для тяжкості клінічного синдрому. Насправді, патогенний ланцюг подій слідом за генетичним ушкодженням може бути перерваний відповідними ліками. Наприклад, втрата активності міостатину може ослабляти ПКМД у мишей *scgd*^{-/-} шляхом зменшення фіброзу та індукувати регенерацію м'яза. Інгібування активності кальциневрину, як повідомляли, викликає аналогічні ефекти. Відповідно до обговорених вище нових відкриттів та тих, що представлені в Прикладах 1 та 2, модулювання циклів дегенерації/регенерації і зменшення дегенерації кістякового м'яза в мишачій моделі ПКМД може бути досягнуте шляхом нормалізації мітохондріальної функції. Ці відкриття авторів винаходу створюють можливість нового фармакологічного лікування пацієнтів, уражених ПКМД, яке спрямовано на функцію мітохондрій, але не на активність кальциневрину, та не викликає імуносупресію.

Відповідно, даний винахід стосується застосування неімуносупресивного похідного CsA, найкраще, D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, для попередження або зменшення м'язової дегенерації у суб'єкта, що страждає ПКМД. Неімуносупресивне похідне CsA можна також застосовувати для нормалізації мітохондріальної функції в мітохондріях, препаратіваних з м'язових біопсій суб'єкта, що страждає ПКМД. Виявлення толерантності до перевантаження кальцію в таких мітохондріях повинно служити індикатором того, що лікування пацієнта неімуносупресивним похідним CsA буде ефективним при зменшенні тяжкості захворювання.

Активна сполука, тобто, неімуносупресивне похідне циклоспорину А, застосовуване для лікування пацієнтів, що страждають ПКМД, можна вводити будь-яким загальноприйнятим шляхом. Його можна вводити парентерально, наприклад, у формі ін'єкційних розчинів чи суспензій, або у формі ін'єкційних депо-препаратів. Краще, його слід вводити перорально у формі розчинів чи суспензій для приймання усередину, таблеток чи капсул. Фармацевтичні композиції для перорального введення, що містять неімуносупресивне похідне циклоспорину А [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, описані у Прикладах. Такі фармацевтичні композиції типово містять вибране неімуносупресивне похідне циклоспорину А та одну чи декілька речовин, які є фармацевтично прийнятними носіями. Придатні фармацевтичні носії описані, наприклад, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990), що є стандартним довідником в даній області. Типово ці композиції є концентрованими, і їх необхідно комбінувати з відповідним розріджувачем, наприклад, з водою, перед введенням. Фармацевтичні композиції для парентерального введення типово включають також один чи декілька ексципієнтів. Можливі, але не обов'язкові ексципієнти включають ізотонічний агент, буфер чи інший агент, що регулює рН, та консервант. Ці ексципієнти можна додавати для підтримання композиції і для досягнення кращих діапазонів рН (приблизно 6,5-7,5) та осмолярності (приблизно 300 мосм/л).

Додаткові приклади препаратів циклоспорину для перорального введення можна знайти в патентах США №№ 5525590 та 5639724 та в заявці на патент США 2003/0104992. Показане дозування для введення неімуносупресивного похідного циклоспорину А пероральним шляхом від щодобового до трьох разів на тиждень може становити від приблизно 1 мг/кг (маси тіла) до приблизно 100 мг/кг, краще, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 20 мг/кг. Відповідне показане дозування для внутрішньовенного шляху може становити від приблизно 1 мг/кг до приблизно 50 мг/кг, краще, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 25 мг/кг. Ефективну кількість неімуносупресивного похідного циклоспорину А розуміють як кількість, що при повторному введенні в ході терапевтичної схеми пацієнту з ПКМД приводить в результаті до об'єктивної клінічної відповіді, такої як поліпшення, стабілізація або вповільнення прогресування захворювання. Таку клінічну відповідь можна оцінити, наприклад, за допомогою тестування кількісної ізометричної напруги (QIS). QIS дає можливість об'єктивно оцінити напругу м'яза за допомогою устаткування, що перетворює тиск і реєструє. Альтернативно нормалізацію швидкостей апоптозу можна оцінити в біопсіях м'яза біохімічними та імуногістохімічними методами, відомими фахівцям у даній області техніки. Нарешті, можна використовувати електроміографію, що показує м'язову діаграму замість нейрогенної, яку можна визначити кількісно.

При визначенні випробуваних доз для тестування ефективності фармацевтичної композиції за винаходом, яка містить неімуносупресивне похідне циклоспорину А, найкраще [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, лікар повинен враховувати численні фактори. Головними серед них є токсичність та час напівжиття неімуносупресивного похідного циклоспорину А. Додаткові фактори включають розмір пацієнта, вік пацієнта, загальний стан пацієнта (включаючи механічну вентиляцію, клінічну стадію захворювання, тяжкість симптомів), наявність інших ліків у пацієнта тощо. Курс лікування потребує повторного введення фармацевтичної композиції за винаходом. Типово адекватну дозу ліків будуть вводити один раз на добу. У зв'язку з генетичною природою захворювання може існувати необхідність продовжувати лікування протягом пролонгованого

періоду часу, можливо, протягом життя пацієнта.

Зараз невідоме ефективне фармакологічне лікування ПКМД. Пацієнтів підтримують вакцинацією проти грипу та пневмококової інфекції, і будь-яку інфекцію інтенсивно лікують антибіотиками. Тому фармацевтичні композиції за даним винаходом можуть містити один чи декілька інших активних інгредієнтів на додаток до неімуносупресивного похідного циклоспорину А, таких як, наприклад, один чи декілька антибіотиків. Неімуносупресивне похідне циклоспорину А и такий інший активний інгредієнт можна вводити разом як частину однієї і тієї ж фармацевтичної композиції, або можна вводити окремо як частину відповідного режиму дозування, призначеного для одержання користі від усіх активних інгредієнтів. Відповідний режим дозування, величина кожної дози, що вводиться, та специфічні інтервали між дозами кожного активного агента будуть залежати від конкретної застосовуваної комбінації активних агентів, від стану пацієнта, що потребує лікування, та від інших факторів, обговорених у попередньому розділі. Такі додаткові активні інгредієнти, як правило, вводять у кількостях, рівних тим, для яких вони відомі як ефективні як окремі терапевтичні агенти. Схвалені FDA дозування для таких активних агентів, які одержали схвалення FDA для введення людям, є опублікованими.

Усі патенти, заявки на патенти та публікації, цитовані в даній заявці, слід вважати включеними шляхом посилання в їх повному обсязі.

Винахід додатково розроблений за допомогою нижченаведених прикладів. Приклади наведені з метою ілюстрації для фахівців у даній області техніки і не призначені для обмеження обсягу винаходу, визначеного формулою винаходу. Таким чином, винахід не слід тлумачити як обмежений наведеними прикладами, але слід тлумачити, як такий, що охоплює будь-які та усі варіації, очевидні як результат наведених тут положень.

Приклади:

Приклад 1: Стабілізація індукованого кальцієм ушкодження в м'язовій мембрані і зменшення прогресування та патології м'язової дистрофії

Для стабілізації індукованого кальцієм ушкодження і зменшення прогресування захворювання, викликаного численними циклами дегенерації/регенерації, мишей *scgd*^{-/-} обробляли D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA.

Мишей *scgd*^{-/-} обробляли підшкірним введенням або D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA у дозі 50 мг/кг/добу, або носія (препарату, який не містить активного інгредієнта D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA), починаючи з 4-тижневого віку і закінчуючи у віці 10 тижнів. Різні препаративні м'язи, тобто ікроножний, чотириглавий, передній великогомілковий та серцевий м'язи, зважували і визначали відношення маси м'яза (MW) до довжини великогомілкової кістки (TL) (MW/TL). Результати на фіг. 2 (а) та фіг. 2 (в) представлені у вигляді середніх \pm СОС (стандартна похибка середніх). Однобічний критерій ANOVA використовували для порівняння середніх серед 3 чи більшого числа незалежних груп. Апостеріорний критерій Ньюмана-Кейлса застосовували завжди, коли проводили множинні порівняння, використовуючи Instat 3.0 (програму забезпечення Graphpad від Science Inc.). Значення вважали значущими при $p < 0,05$.

У відповідь на численні цикли дегенерації/регенерації у мишей *scgd*^{-/-} спочатку представлені гіпертрофічні кістякові м'язи, як видно у суб'єктів, що страждають ПКМД. Введення D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA мишам *scgd*^{-/-} приводило в результаті до зменшення м'язової патології, спостережуваного як зниження псевдогіпертрофічних відповідей у кістякових м'язах оброблених мишей *scgd*^{-/-} (фіг. 2 (а)). Зниження кістякової м'язової гіпертрофії було приблизно 1,3-кратним в ікроножному (Gastroc.), чотириглавому (Quad.) та передньому великогомілковому (TA) і приблизно 1,2-кратним у серцевому м'язах (Heart) D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA-оброблених мишей *scgd*^{-/-} у порівнянні із тваринами, обробленими носіями.

Знижену патологію у мишей *scgd*^{-/-}, оброблених D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, також спостерігали в гістологічних препаратах чотириглавого м'яза (фіг. 2 (б)). Поліпшення організації м'язових волокон та нормалізація розподілу площі м'язових волокон були відзначені в гістологічних препаратах оброблених D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA мишей *scgd*^{-/-} у порівнянні з мишами дикого типу і мишами *scgd*^{-/-}, обробленими носієм.

Відсоток фіброзу оцінювали за допомогою біохімічного аналізу, який кількісно визначає вміст гідроксипроліну (Parsons et al., Am. J. Pathol., 2006, 168:1975-1985) у діафрагмальному (Diaph.), передньому великогомілковому (TA), ікроножному (Gastroc.) та чотириглавому (Quad) м'язах від мишей дикого типу та мишей *scgd*^{-/-}, оброблених чи не оброблених D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA. Обробка мишей *scgd*^{-/-} D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA зменшувала фіброз у різних м'язах - приблизно на 1,5 %-3,5 % (фіг. 2 (в)).

Приклад 2: Нормалізація розподілу малих та великих волокон та зниження циклів дегенерації/регенерації в кістякових м'язах мишей *scgd*^{-/-} після обробки D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA

Обробка D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA мишей scgd^{-/-} частково нормалізувала розподіл площі волокон у передньому великогомілковому (фіг. 3(а)), ікроножному (фіг. 3(б)) та чотириглавому м'язах (фіг. 3(в)), вказуючи на зниження циклів дегенерації/регенерації. Мишам scgd^{-/-} вводили підшкірно або D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA у дозі 50 мг/кг/добу, або носій протягом 6 тижнів.

5 Гістологічний аналіз волокон трьох кістякових м'язів від мишей scgd^{-/-} показав значне збільшення чисельності волокон малих діаметрів (менше 200 мкм²) порівняно з мишами дикого типу, що вказує на зростання числа регенерованих волокон, проходження циклів дегенерації/регенерації і прогресування захворювання. Введення неімуносупресивного D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA мишам scgd^{-/-} знижувало швидкість регенерації волокон та частково

10 нормалізувало розподіл малих та великих волокон. Меншу кількість малих волокон спостерігали у мишей scgd^{-/-}, оброблених неімуносупресивним D-[MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, у порівнянні з мишами scgd^{-/-}, які одержували тільки носій.

Приклад 3: Пероральні препарати [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA

Кількості виражені у % мас/мас.

Приклад А:

[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
Глюкофузол 75	35,95
Міглікол 812	18
Кремофор RH40	35,95
Альфа-токоферол	0,1

Приклад Б:

[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
Тетрагліколь	2
Captex 800	2
Nikkol HCO-40	85,9
Бутилгідрокситолуол (БГТ)	0,1

Приклад В:

[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
Глюкофузол 75	39,95
Міглікол 812	14
Кремофор RH40	36
Бутилгідроксіанізол (БГА)	0,05-0,1

Приклад Г:

[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
Тетрагліколь	10
Міритол	5
Кремофор RH40	74,9
Альфа-токоферол	0,1

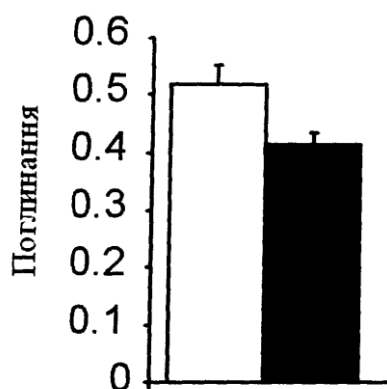
Приклад Д:

[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
Етанол	9
Пропіленгліколь	8
Кремофор RH40	41
Гліцеринмонолінолеат	32

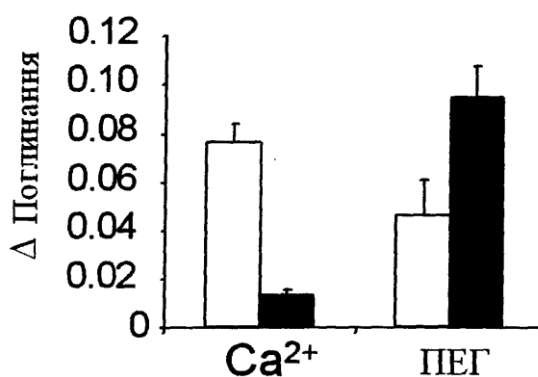
Індивідуальні компоненти препаратів А-Г та способи їх одержання див. британську заявку на патент № 2222770.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

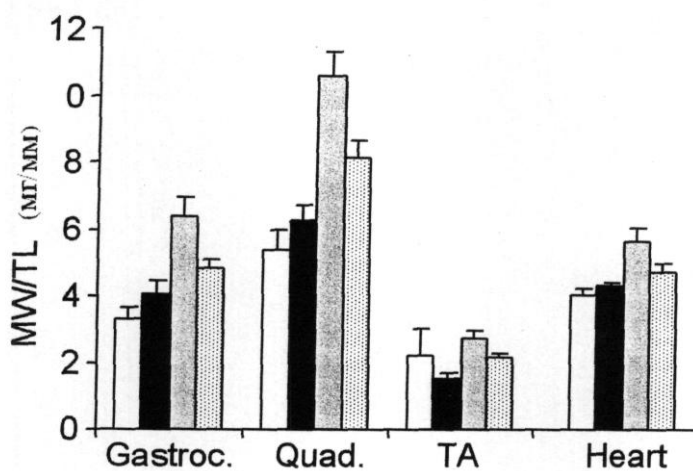
1. Застосування похідного циклоспорину А формули:
[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA
- 5 для виготовлення лікарського засобу для лікування тазово-плечової форми м'язової дистрофії.
2. Спосіб попередження або зменшення м'язової дегенерації у суб'єкта, що страждає на тазово-плечову форму м'язової дистрофії, який включає введення пацієнтові ефективної кількості похідного циклоспорину А:
[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA.



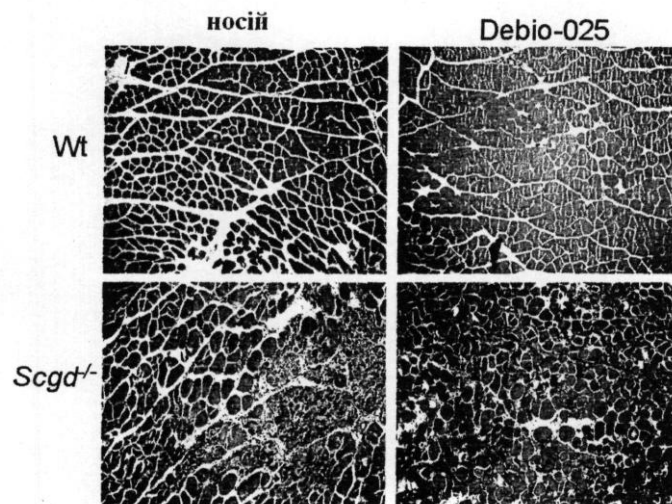
ФІГ. 1(а)



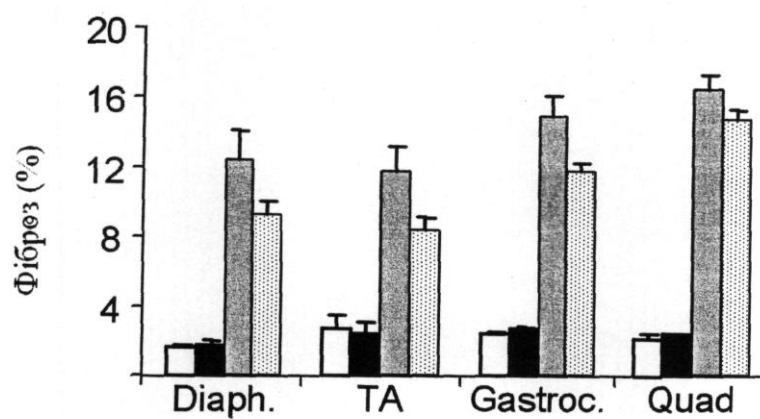
ФІГ. 1(б)



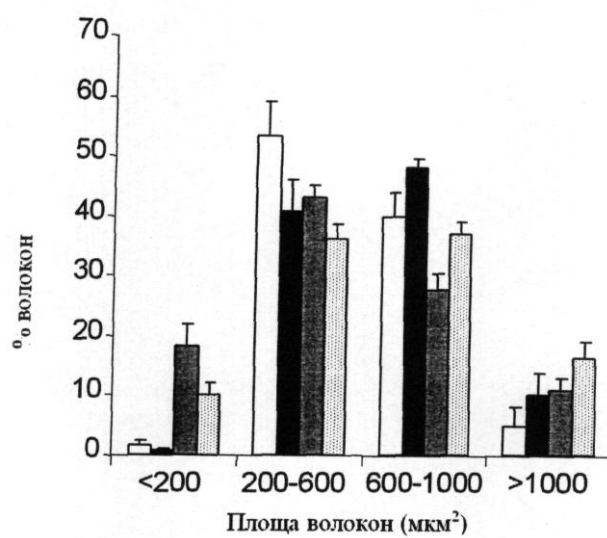
ФІГ. 2(а)



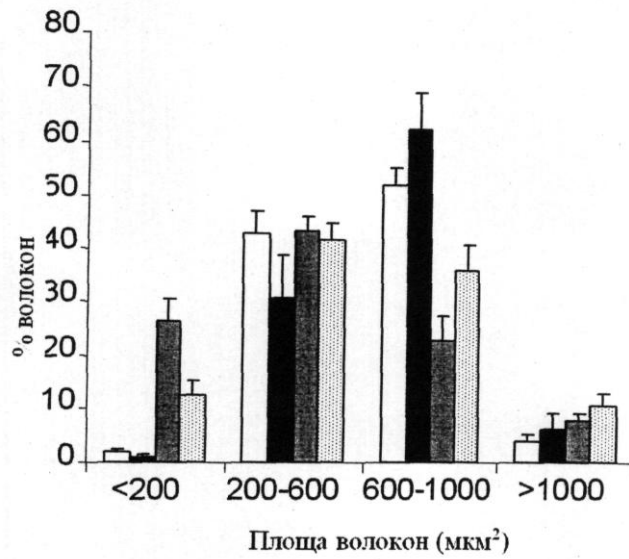
ФІГ. 2(б)



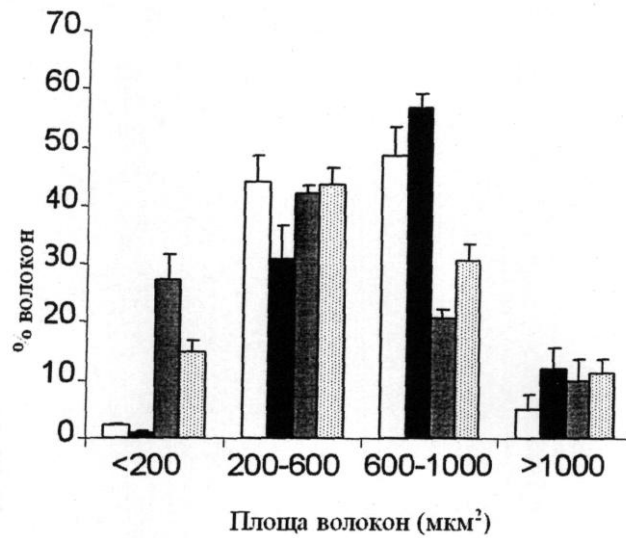
ФІГ. 2(в)



ФІГ. 3(а)



ФІГ. 3(б)



ФІГ. 3(в)

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601