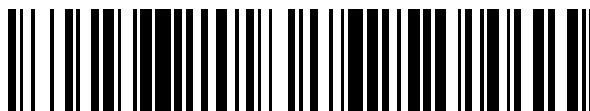


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 074**

51 Int. Cl.:

A61K 31/135 (2006.01)

A61K 31/197 (2006.01)

A61K 31/343 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2013 PCT/FR2013/052157**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14044972**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2013 E 13774756 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2897600**

54 Título: **Tratamiento de neuronopatías motoras**

30 Prioridad:

19.09.2012 FR 1258796

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.04.2018

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (100.0%)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR**

72 Inventor/es:

**LEFEBVRE, SUZIE;
KHOOBARRY, KEVINEE y
BURLET, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 666 074 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de neuropatías motoras

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a un antagonista cálcico elegido entre el grupo de antagonistas cálcicos de la familia de las fenilalquilaminas para su utilización en el tratamiento de una neuropatía motora.

10 **Estado de la técnica**

La amiotrofia espinal infantil (o SMA, *Spinal Muscular Atrophy*) es una enfermedad neuromuscular de transmisión autosómica recesiva. Se caracteriza por una degeneración de las neuronas motoras alfa del asta anterior de la médula espinal que provoca una atrofia muscular y conduce a la parálisis. Por lo tanto esta degeneración de las neuronas motoras alfa compromete sustancialmente el pronóstico vital de los pacientes. En el sujeto sano, estas neuronas transmiten los mensajes del cerebro a los músculos, provocando la contracción de estos últimos. En ausencia de una estimulación de este tipo, los músculos se atrofian. A partir de ese momento, además de una debilidad generalizada y una atrofia de los músculos, y más particularmente los del tronco, la parte superior de los brazos y los muslos, estos trastornos pueden ir acompañados de graves problemas respiratorios.

Existe una fuerte correlación entre la edad de aparición de los síntomas y la gravedad de la enfermedad, de modo que cuanto antes comienza la enfermedad, menos favorable es el pronóstico vital. De acuerdo con este criterio, esta enfermedad se ha clasificado en 3 tipos clínicos como sigue a continuación:

- 25 - tipo I (enfermedad de Wernig-Hoffman), caracterizado por un comienzo precoz, por lo general antes de los 6 meses y en el que nunca se adquiere la posición sentada y la evolución es extremadamente grave. La esperanza de vida de los niños afectados rara vez supera los tres años y, a menudo, se limita a varios meses.
- tipo II o forma intermedia de la enfermedad de Wernig-Hoffman que habitualmente aparece entre las edades de seis meses y tres años, en la que se adquiere la posición sentada, pero nunca se puede andar. Este tipo clínico a menudo se asocia con infecciones respiratorias frecuentes que pueden complicar la causa de esta afección y disminuir la esperanza de vida.
- 30 - tipo III o enfermedad de Kugelberg-Welander, que generalmente aparece alrededor de los 3-4 años y en ocasiones hasta los 21 años de edad y en la que se adquiere la capacidad de andar con problemas de la marcha más o menos pronunciados, dependiendo de la gravedad que es muy variable de un paciente a otro.
- 35 Este tipo de enfermedad en general no compromete la esperanza de vida.

Todas las formas de amiotrofia espinal van acompañadas por una debilidad y una atrofia progresiva de los músculos, como resultado de la degeneración de las neuronas del asta anterior de la médula espinal. La SMA constituye en la actualidad una de las causas más frecuentes de mortalidad infantil. Afecta a niñas o niños indistintamente en todas las regiones del mundo con una prevalencia comprendida entre 1/6000 y 1/10000.

El gen implicado en las amiotrofias espinales infantiles se ha localizado en el cromosoma 5 en la posición q12-q13, independientemente del tipo clínico presentado. Este gen codifica la proteína de supervivencia de las neuronas motoras (SMN). Esta proteína se localiza en el citoplasma y el núcleo, en los que se acumula en dominios puntiformes denominados Cuerpos de Cajal, o Cajal bodies (CB). Un defecto de esta acumulación se describe en la SMA.

Se admite que la SMA está relacionada con una inactivación del gen SMN. De forma más precisa, se han puesto de manifiesto dos genes que codifican la proteína SMN: SMN1 y SMN2, siendo los 2 genes transcritos. El análisis de sus promotores mostró que estos elementos son casi idénticos tanto a nivel de su secuencia como a nivel de su actividad. Además, el gen SMN2 codifica la misma proteína SMN pero en cantidades menores. Además, se ha encontrado que la inactivación de SMN1 se puede aliviar en parte mediante la expresión del gen SMN2 casi idéntico.

Los pacientes que padecen SMA disponen en la actualidad de cuidados médicos o paramédicos que les asegura una mejor calidad de vida posible, tales como:

- fisioterapia motora e hidroterapia que consisten en ayudar al paciente a establecer su esquema corporal;
- fisioterapia respiratoria que permitía aliviar a los pacientes de la congestión bronquial, reduciendo de ese modo el riesgo de enfermedades respiratorias; o incluso
- 60 - tratamiento ortopédico para prevenir las deformidades del esqueleto y las articulaciones.

Sin embargo, estos cuidados solo están destinados a aliviar los síntomas y prevenir las complicaciones de la enfermedad. No permiten curar la patología.

65 Por otra parte, la esclerosis lateral amiotrófica (SLA) o la enfermedad de Charcot es una enfermedad neurodegenerativa que afecta principalmente a adultos, y que se caracteriza por un debilitamiento además de una

parálisis de los músculos de las piernas y los brazos, de los músculos respiratorios así como los músculos de la deglución y del habla. La prevalencia de esta enfermedad se calcula en 1 paciente de 25 000 personas.

5 Esta enfermedad también implica la degeneración de las neuronas motoras, en particular las de la corteza cerebral y del asta anterior de la médula espinal. Esta degeneración conduce a una destrucción del haz piramidal. La SLA se puede presentar en dos formas principales: la forma « espinal » y la forma « bulbar ». La forma espinal se debe a la degeneración de las neuronas motoras situadas en la médula espinal mientras que la forma bulbar corresponde a la degeneración de las neuronas motoras del bulbo raquídeo. Estas dos formas se pueden encadenar o se pueden desarrollar de forma simultánea, y la enfermedad progresa casi siempre hacia una forma completa (espinal y bulbar).

10 Los pacientes que padecen SLA disponen de cuidados médicos que tienen como objeto no la recuperación de las funciones motoras, sino el mantenimiento de las funciones restantes, especialmente gracias a la reeducación con fisioterapia y orfónica. Además, recientemente se ha propuesto una estrategia terapéutica que se basa en el Riluzol (comercializado con el nombre de Rilutek®). Pero esta estrategia solo permite retrasar la evolución de la patología eficaz y prolonga la fase de la enfermedad durante la cual el paciente es autónomo. Además, este compuesto mejora el pronóstico de los pacientes solamente en un 30 %, lo que sigue siendo insatisfactorio. En la actualidad no existe un tratamiento eficaz contra la aparición y/o desarrollo de la SLA.

20 No existe ningún tratamiento induzca a la parada de manera eficaz de la progresión de las neuronopatías motoras, en particular para frenar la degeneración de las neuronas motoras. Por lo tanto, existe una necesidad desde hace tiempo de una estrategia terapéutica eficaz contra las neuronopatías motoras, en particular las neuronopatías motoras de tipo amiotrofia espinal infantil y esclerosis lateral amiotrófica.

25 Wagatsuma A et ál., Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sport, 2002, describe el efecto beneficioso de la nifedipina en la atrofia muscular.

Hugon J, Neurology, 1996, divulga el potencial de utilización de los antagonistas cálcicos en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.

30 Szcudlik A, Neurologia, 1998, describe una ralentización de la progresión de la esclerosis lateral amiotrófica gracias a la administración del antagonista cálcico pimozida.

35 Miller et ál., Muscle and Nerve, 1996, describe el interés del verapamilo en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica. Miller et ál., Neuromuscular Disorders, 1996, describe el interés del nimodipino en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.

La solicitud de patente CN 102 274 157 divulga una composición que comprende flunarizina y nicergolina.

40 La solicitud WO2006086544 describe composiciones que comprenden antagonistas de VEGF y antagonistas cálcicos tales como flunarizina.

La solicitud WO2011156481 describe composiciones que comprenden amiodarona y una ciclodextrina sustituida.

45 La solicitud WO00/41688 describe la utilización de la amiodarona como agente antifúngicos.

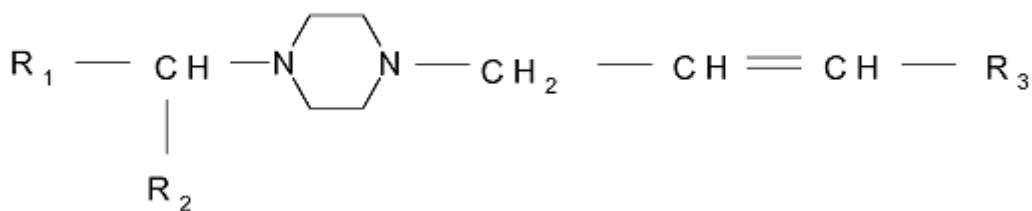
Objeto de la invención

50 Los inventores han descubierto ahora que los antagonistas cálcicos de la familia de las fenilalquilaminas, aminoácidos y benzofuranos permiten por una parte aumentar de manera significativa la distribución de SMN en los CB y por otra parte, mejorar un defecto de acumulación de las snRNP en los CB. En consecuencia, estos inhibidores cálcicos constituyen una estrategia terapéutica relevante en el tratamiento de las neuronopatías motoras, en particular SMA o SLA.

55 En el presente documento se describe un antagonista cálcico elegido entre el grupo formado por:

- antagonistas cálcicos de la familia de las fenilalquilaminas de fórmula I y sus sales,

Fórmula I



en la que:

- 5 - los grupos R_1 , R_2 y R_3 son idénticos o diferentes y se eligen entre los radicales fenilo y fluorofenilo, con la condición de que al menos uno de los grupos R_1 , R_2 y R_3 sea un radical fluorofenilo;

➤ antagonistas cálcicos de la familia de los aminoácidos de fórmula II,



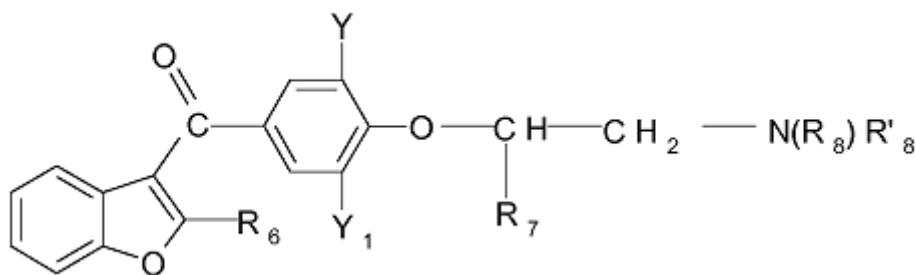
en la que:

- 15 - el grupo R_4 representa un radical alquilo inferior de cadena lineal o ramificada que contiene hasta 8 átomos de carbono, y el grupo R'_4 es un átomo de hidrógeno,
 o
 R_4 y R'_4 forman en conjunto un radical alquilo inferior cíclico que contiene hasta 8 átomos de carbono, y
 - el grupo R_5 es un átomo de hidrógeno o un radical alquilo inferior de cadena lineal o ramificada que contiene hasta 8 átomos de carbono;

20

➤ antagonistas cálcicos de la familia de los benzofuranos de fórmula III y sus sales

Fórmula III



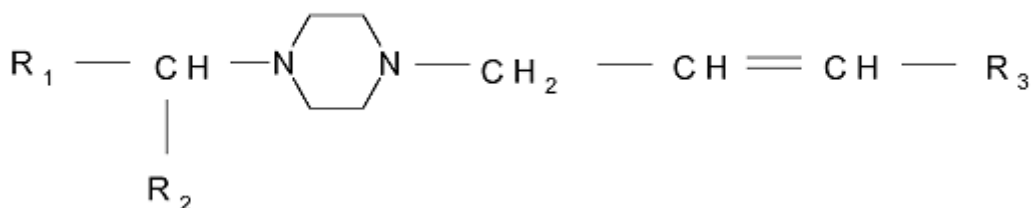
25 en la que:

- el grupo R_6 representa un radical alquilo inferior de cadena lineal o ramificada que contiene hasta 6 átomos de carbono,
 - el grupo R_7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo,
 30 - el grupo $N(R_8)R'_8$ representa un grupo dimetilamino, dietilamino, dipropilamino, piperidino, pirrolidino o morfolino, y
 - los grupos Y e Y_1 son idénticos y representan un átomo de hidrógeno, de yodo o de bromo;

35 para su utilización en el tratamiento de una neuropatía motora elegida entre la amiotrofia espinal infantil, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis lateral primaria, la enfermedad de Kennedy, y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

La invención se refiere a un antagonista cálcico elegido entre el grupo formado por antagonistas cálcicos de la familia de las fenilalquilaminas de fórmula I y sus sales,

40

Fórmula I

en la que:

- 5 - los grupos R₁, R₂ y R₃ son idénticos o diferentes y se eligen entre los radicales fenilo y fluorofenilo, con la condición de que al menos uno de los grupos R₁, R₂ y R₃ sea un radical fluorofenilo;

para su utilización en el tratamiento de una neuropatía motora elegida entre la amiotrofia espinal infantil, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis lateral primaria, la enfermedad de Kennedy, y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

Por "**neuronas motoras**" o "**motoneuronas**", se hace referencia a las neuronas que constituyen la vía de salida del sistema nervioso central (o la vía final) de cualquier acto motor. Los cuerpos celulares de las motoneuronas se sitúan bien en el tronco cerebral, o bien en el asta ventral de la sustancia gris de la médula espinal. Cada motoneurona posee un axón que parte del sistema nervioso central para inervar las fibras musculares de un músculo. El conjunto formado por una motoneurona y las fibras musculares que inerva constituye una unidad motora. Se distinguen tres tipos de motoneuronas: las "**motoneuronas alfa**", que inervan las fibras musculares responsables de la contracción, las "**motoneuronas gamma**", que inervan los haces neuromusculares, ajustando de ese modo su sensibilidad al estiramiento, así como las "**motoneuronas beta**", que inervan los dos tipos de fibras. Preferentemente, el compuesto de la invención es particularmente ventajoso para el tratamiento de neuropatías motoras que implican la degeneración de las neuronas motoras alfa.

Por "**neuronopatía motora**", se hace referencia a una enfermedad que implica la degeneración de las neuronas motoras, que se manifiesta por una ausencia de estimulación de los músculos que conduce a una amiotrofia.

Esta enfermedad está asociada con un déficit de proteína SMN y/o con una reducción del número de los CB y/o con una falta de localización de la proteína SMN en los CB.

Los síntomas de una patología de este tipo pueden ser variados y pueden comprender:

- un déficit motor progresivo;
- una amiotrofia;
- espasmos; y/o
- calambres.

Dicha neuropatía motora es amiotrofia espinal infantil, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, enfermedad de Kennedy, o enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Preferentemente, dicha neuropatía motora es amiotrofia espinal infantil, esclerosis lateral amiotrófica. Más preferentemente, dicha neuropatía es amiotrofia espinal infantil. Por lo general, dicha amiotrofia espinal infantil es de tipo I, de tipo II o de tipo III.

Por "**antagonista cálcico**" o "**inhibidor cálcico**" se hace referencia a un compuesto que inhibe la entrada del calcio en las células por los canales cálcicos dependientes del voltaje. Esta clase terapéutica está particularmente bien documentada en la técnica anterior, en particular para su utilización en cardiología, en particular en el tratamiento de hipertensión arterial, angina o incluso crisis de taquicardia supraventricular paroxística.

Théophile Godfraind, entre otros, describe estos antagonistas cálcicos en el manual Calcium Channel Blockers, publicado en las ediciones Milestones en Drug Therapy el 26 de marzo de 2004.

Los inventores ahora han sacado a la luz un nuevo papel para estos antagonistas cálcicos. De hecho, han demostrado que estos últimos permiten el aumento de la distribución de la proteína SMN y de las snRNP en los Cuerpos de Cajal y/o el aumento del número de Cuerpos de Cajal.

Además, los antagonistas cálcicos de la invención, al aumentar de forma significativa la distribución de la proteína SMN y de las snRNP en los Cuerpos de Cajal y/o el número de Cuerpos de Cajal, constituyen una estrategia terapéutica relevante para el tratamiento de las neuropatías motoras, en particular la SMA.

Por "**Cuerpos de Cajal**" o "**Cajal bodies**" o incluso los "CB" se hace referencia al sitio de las modificaciones iniciales y de montaje de varios ARN nucleares pequeños con sus ribonucleoproteínas, las snRNP (ribonucleoproteínas nucleares pequeñas) importados desde el citoplasma o reciclados en el núcleo. Los CB presentan una ultra estructura que revela hilos enrollados, de ahí su otro nombre de « cuerpos superenrollados ».

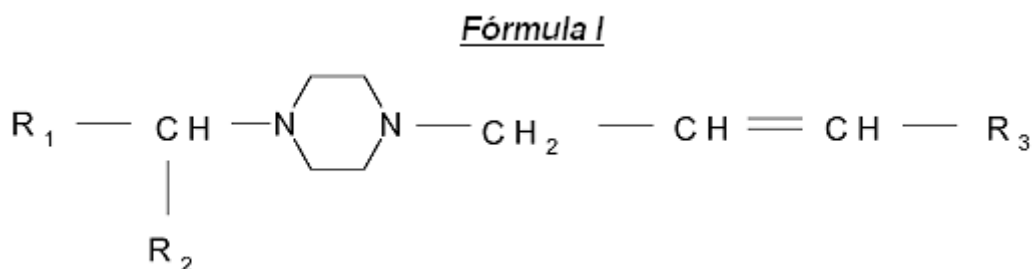
Los CB son estructuras dinámicas y su número puede cambiar rápidamente si hay un cambio en el nivel de transcripción. La abundancia de los CB puede ser determinada fácilmente por el experto en la materia, en particular mediante inmunodetección de la ubicación de las snRNP en los CB y el número de CB detectados de ese modo, o de forma más precisa mediante la detección de la proteína coilina en los CB. Como se ha indicado anteriormente, la proteína SMN se acumula en los Cuerpos de Cajal. Un defecto en esta acumulación se describe en la SMA.

Los inventores también han demostrado el hecho de que los antagonistas cálcicos de la invención permiten el aumento de los snRNP a nivel de los Cuerpos de Cajal.

La proteína SMN forma parte de un gran complejo multiproteico, cuyo papel es el ensamblaje de partículas ribonucleoproteicas de corte y empalme, las snRNP. Un defecto de este conjunto se visualiza mediante una disminución marcada en la localización de las snRNP a nivel de los CB en los fibroblastos de pacientes con SMA. Además, los antagonistas cálcicos de la invención, al aumentar esta acumulación de snRNP a nivel de los CB, Permiten tratar, con eficacia, las neuropatía motoras, en particular la SMA.

Antagonista cálcico de la familia de las fenilalquilaminas

El antagonista cálcico de la invención es un antagonista de la familia de las fenilalquilaminas de fórmula I o una de sus sales:



en la que:

- los grupos R₁, R₂ y R₃ son idénticos o diferentes y se eligen entre los radicales fenilo y fluorofenilo, con la condición de que al menos uno de los grupos R₁, R₂ y R₃ sea un radical fluorofenilo.

Théophile Godfraind describe esta clase de antagonistas cálcicos en el manual Calcium Channel Blockers, publicado en las ediciones Milestones en Drug Therapy el 26 de marzo de 2004. Estos antagonistas cálcicos de fórmula I también se describen en la solicitud de patente FR 2 014 487 (Janssen Pharmaceutica). La fórmula I de la invención engloba todos los estereoisómeros geométricos Z o E. Preferentemente, la fórmula I de la invención está en la configuración E.

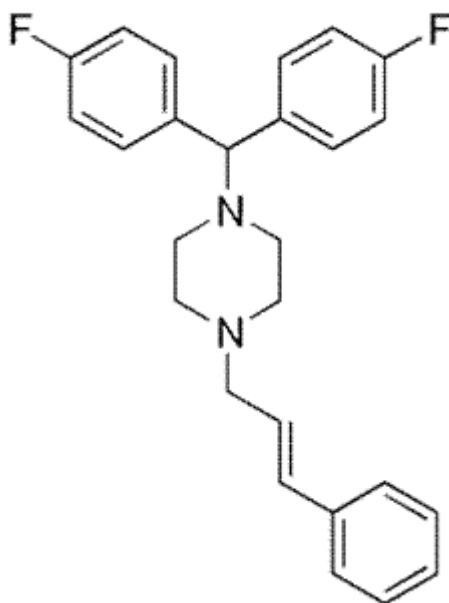
En un modo de realización preferente:

- los grupos R₁ y R₂ son radicales parafluorofenilo; y
- el grupo R₃ es un radical fenilo.

En este modo de realización, dicho antagonista cálcico de la familia de las fenilalquilaminas es la flunarizina o una de sus sales. De manera preferente, se trata del diclorhidrato de flunarizina. Además, la invención se refiere a la flunarizina o una de sus sales para su utilización en el tratamiento de una neuropatía motora elegida entre la amiotrofia espinal infantil, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis lateral primaria, la enfermedad de Kennedy, y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

En efecto, los inventores han mostrado que este compuesto presenta los mejores resultados en cuanto al aumento de la acumulación de la proteína SMN y/o de las snRNP en los CB. Por lo general, el diclorhidrato de flunarizina se puede administrar a una dosis comprendida entre 5 mg y 10 mg al día.

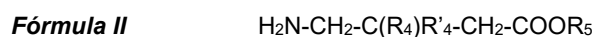
La flunarizina tiene como fórmula C₂₆H₂₈Cl₂F₂N₂ tal como se representa en la fórmula la:

Fórmula Ia

5 La flunarizina tiene el número CAS: 30484-77-6. Esta molécula se conoce por su aplicación en el tratamiento de las migrañas y se comercializa con el nombre SIBELIUM®. Se trata de un inhibidor de los canales cálcicos de las neuronas y de los canales cálcicos de los vasos, utilizada en el tratamiento de los vértigos de origen vestibular y de la migraña.

Antagonistas cálcicos de la familia de los aminoácidos

10 Otros antagonistas cálcicos que se describen en el presente documento como compuestos de referencia son antagonistas cálcicos de la familia de los aminoácidos de fórmula II:



15 en la que:

- el grupo R_4 representa un radical alquilo inferior de cadena lineal o ramificada que contiene hasta 8 átomos de carbono, y el grupo R'_4 es un átomo de hidrógeno,

20 R_4 y R'_4 forman en conjunto un radical alquilo inferior cíclico que contiene hasta 8 átomos de carbono, y

- el grupo R_5 es un átomo de hidrógeno o un radical alquilo inferior de cadena lineal o ramificada que contiene hasta 8 átomos de carbono. Por lo general, los radicales alquilo inferior R_4 o R_5 de fórmula II son radicales alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, en particular un radical metilo, etilo, isopropilo, isobutilo o terc-butilo.

25 Théophile Godfraind describe esta clase de antagonistas cálcicos en el manual Calcium Channel Blockers, publicado en las ediciones Milestones en Drug Therapy el 26 de marzo de 2004. Estos antagonistas cálcicos de fórmula (II) También se describen en la solicitud de patente FR 2 294 697 (Warner Lambert Company).

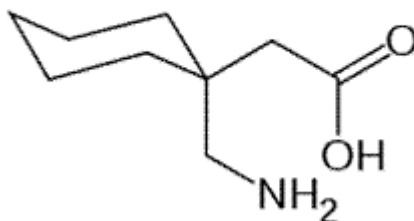
En un modo de realización preferente:

- 30
- R_4 y R'_4 forman en conjunto un grupo ciclohexano, y
 - el grupo R_5 es un átomo de hidrógeno.

35 En este modo de realización preferente, dicho antagonista cálcico de la familia de los aminoácidos es la gabapentina. Además, en el presente documento se describe una gabapentina para su utilización en el tratamiento de una neuropatía motora elegida entre la amiotrofia espinal infantil, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis lateral primaria, la enfermedad de Kennedy, y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

40 La gabapentina o ácido 2-[1-(aminometil)ciclohexil]acético tiene como fórmula empírica $C_9H_{17}NO_2$ y se representa con la fórmula (IIa).

Fórmula IIa



La gabapentina tiene el número CAS : 60142-96-3. se conoce por su actividad antiepiléptica. Además se comercializa con el nombre Neurontin®.

5

En otro modo de realización,

- el grupo R₄ es un isobutilo, y
- los grupos R'₄ y R₅ Son un átomo de hidrógeno.

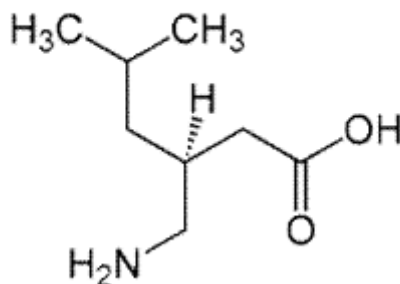
10

En este modo de realización en particular, dicho antagonista cálcico de la familia de los aminoácidos es la pregabalina. Además, se describe una pregabalina para su utilización en el tratamiento de una neuropatía motora elegida entre la amiotrofia espinal infantil, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis lateral primaria, la enfermedad de Kennedy, y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

15

La pregabalina tiene como fórmula empírica C₈H₁₇NO₂ y se representa con la fórmula IIb:

Fórmula IIb



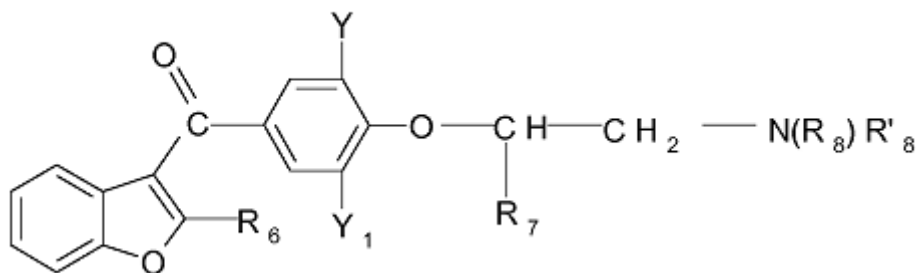
20 La pregabalina tienen el número CAS 148553-50-8. Se conoce por su actividad antiepiléptica.

Antagonistas cálcicos de la familia de los benzofuranos

En otro modo de realización, los compuestos de fórmula I se pueden administrar en asociación con un antagonista de la familia de los benzofuranos de fórmula III o una de sus sales:

25

Fórmula III



en la que:

- el grupo R₆ representa un radical alquilo inferior de cadena lineal o ramificada que contiene hasta 6 átomos de carbono,
- el grupo R₇ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo,
- 5 - el grupo N(R₈)R'₈ representa un grupo dimetilamino, dietilamino, dipropilamino, piperidino, pirrolidino o morfolino, y
- los grupos Y e Y₁ son idénticos y representan un átomo de hidrógeno, de yodo o de bromo.

10 Théophile Godfraind describe esta clase de antagonistas cálcicos en el manual Calcium Channel Blockers, publicado en las ediciones Milestones en Drug Therapy el 26 de marzo de 2004. Estos antagonistas cálcicos de fórmula (III) también se describen en la solicitud de patente FR 1 339 389 (Sociedad belga del nitrógeno y de productos químicos del Marly).

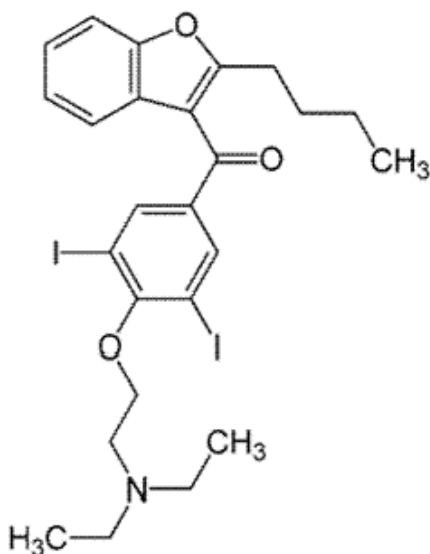
En un modo de realización preferente,

- 15 - el grupo R₆ es un butilo,
- el grupo R₇ es un átomo de hidrógeno,
- el grupo N(R₈)R'₈ es un grupo dietilamino, y
- 20 - los grupos Y e Y₁ son idénticos y son un átomos de yodo.

En este modo de realización, el antagonista de la familia de los benzofuranos es la amiodarona o una de sus sales. Además, se describe una amiodarona o una de sus sales para su utilización en el tratamiento de una neuropatía motora elegida entre la amiotrofia espinal infantil, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis lateral primaria, la enfermedad de Kennedy, y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

25 La amiodarona o el clorhidrato de (2-butil-3-benzofuranil)[4-[2-(dietilamino)etoxi]-3,5-diiodofenil]metanona es un compuesto de fórmula empírica C₂₅H₂₉I₂NO₃ y se representa con la fórmula IIIa.

Fórmula IIIa



30 La amiodarona tiene el número CAS : 96027-74-6. Se conoce por su actividad antiarrítmica.

Método de tratamiento

35 También se describe que los antagonistas cálcicos de fórmula I para la utilización de métodos de tratamiento de un sujeto que padece una neuropatía motora, tal como amiotrofia espinal infantil, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, enfermedad de Kennedy o incluso la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth que comprende la etapa de administración, a dicho sujeto, de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos los antagonistas cálcicos de la invención. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se hace referencia a una cantidad suficiente para

40 tratar y/o tratar o detener la progresión de las neuropatías motoras.

Composiciones farmacéuticas

Los antagonistas cálcicos de la invención también se pueden utilizar para preparar composiciones farmacéuticas

para el tratamiento de neuronopatías motoras tales como amiotrofia espinal infantil, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, enfermedad de Kennedy o la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Por lo tanto, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas para una utilización en métodos de tratamiento de neuronopatías motoras en el ser humano, comprendiendo dichas composiciones al menos un antagonista cálcico de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los antagonistas cálcicos de la invención se conocen y están disponibles en el mercado. Las formulaciones ya desarrolladas y usadas se podrán utilizar para cada uno de los antagonistas cálcicos de la invención. No importa que antagonista cálcico de acuerdo con la invención se pueda combinar con cualquier tipo de vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en particular los que ya se han descrito una técnica anterior para su utilización para los antagonistas cálcicos de la invención, para formar una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacción inversa, alérgica u otra reacción no deseada cuando se administran a un mamífero, en particular un ser humano. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser sólido, semisólido o líquido.

La forma de las composiciones farmacéuticas, su vía de administración, su dosificación y su posología dependen naturalmente de la gravedad de la patología, de su estado de evolución, de la edad, del sexo, del peso del sujeto a tratar, etc. Por lo tanto, el experto en la materia se preocupará de la adaptación de las dosificaciones en función del paciente a tratar, en particular durante el tratamiento de la SMA en la que los pacientes son niños.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden formular para una administración tópica, oral, sistémica, intranasal, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, u otra. De acuerdo con el modo de administración, la composición que comprende un antagonista cálcico de acuerdo con la invención se puede presentar en todas las formas galénicas.

De preferencia, el antagonista cálcico de acuerdo con la invención está comprendido en una composición que se administra por vía oral. Por vía oral, las composiciones se pueden presentar en forma de comprimidos, cápsulas, grageas, siropes, suspensiones, soluciones, polvos, gránulos, emulsiones, microesferas o nanoesferas o vesículas lipídicas o polimérico es que permitan una liberación controlada.

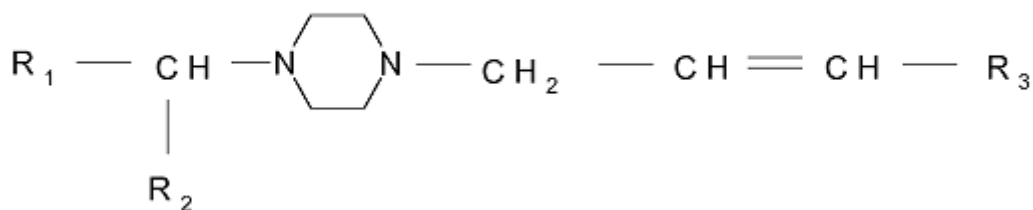
Para una aplicación tópica sobre la piel, la composición puede tener la forma, en particular, de solución acuosa u oleosa o de dispersión de tipo loción o sérum; de emulsión de consistencia líquida o semilíquida de tipo leche, obtenida por dispersión de una fase grasa en una fase acuosa (H/E) o a la inversa (E/H); de emulsión de consistencia blanda de tipo crema; de emulsión bifásica; de gel acuoso o anhidro; de espuma o incluso microcápsulas o micropartículas, o de dispersiones vesiculares de tipo iónico y/o no iónico, o incluso de fórmulas pulverizables de tipo « spray ». Estas composiciones se preparan de acuerdo con los métodos habituales conocidos por el experto en la materia.

Para una aplicación por vía sistémica, la composición se puede presentar en forma de solución acuosa u oleosa o en forma de sérum.

En un modo de realización preferente, la composición de acuerdo con la invención comprende un antagonista cálcico de la familia de las fenilalquilaminas de acuerdo con la invención y un antagonista cálcico de la familia de los benzofuranos de acuerdo con la invención. Además, la invención también se refiere a una composición que comprende:

- un antagonista cálcico de la familia de las fenilalquilaminas de fórmula I y sus sales,

Fórmula I

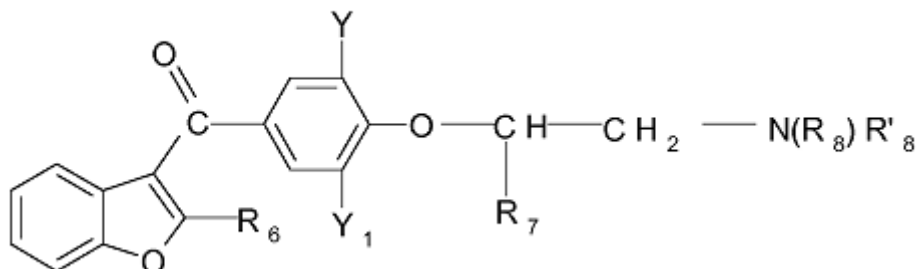


en la que:

- los grupos R₁, R₂ y R₃ son idénticos o diferentes y se eligen entre los radicales fenilo y fluorofenilo, con la condición de que al menos uno de los grupos R₁, R₂ y R₃ sea un radical fluorofenilo;

y

➤ un antagonista cálcico de la familia de los benzofuranos de fórmula III y sus sales

Fórmula III

5

en la que:

- el grupo R_6 representa un radical alquilo inferior de cadena lineal o ramificada que contiene hasta 6 átomos de carbono,
- el grupo R_7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo,
- el grupo $N(R_8)R'_8$ representa un grupo dimetilamino, dietilamino, dipropilamino, piperidino, pirrolidino o morfolino, y
- los grupos Y e Y_1 son idénticos y representan un átomo de hidrógeno, de yodo o de bromo;

15

para su utilización en el tratamiento de una neuropatía motora elegida entre la amiotrofia espinal infantil, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis lateral primaria, la enfermedad de Kennedy, y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

20 Todas las características técnicas mencionadas anteriormente se aplican en el presente documento.

Preferentemente, dicho antagonista cálcico de la familia de las fenilalquilaminas de fórmula I es la flunarizina, y más preferentemente el diclorhidrato de flunarizina. Preferentemente, dicho antagonista cálcico de la familia de los benzofuranos de fórmula III es el clorhidrato de amiodarona.

25

En efecto los inventores han mostrado que la administración combinada del diclorhidrato de flunarizina y del clorhidrato de amiodarona ejerce un efecto de sinergia, que va más allá de la simple acumulación de los efectos de dichos dos compuestos tomados por separado.

30 Además el diclorhidrato de flunarizina y el clorhidrato de amiodarona actúan en sinergia sobre la distribución de la proteína SMN en los CB en los fibroblastos de pacientes.

Por consiguiente, la invención también se refiere a una composición que comprende diclorhidrato de flunarizina y clorhidrato de amiodarona para su utilización en el tratamiento de una neuropatía motora elegida entre la amiotrofia espinal infantil, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis lateral primaria, la enfermedad de Kennedy, y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

35

En este modo de realización en particular, la combinación de diclorhidrato de flunarizina y clorhidrato de amiodarona se administra a una dosis inferior a 5 mg al día. Al reducir ligeramente la dosis de principio activo administrada para tratar a un paciente que padece una neuropatía motora, los inventores han desarrollado una estrategia terapéutica que reduce de forma considerable los riesgos de aparición de efectos nocivos y/o secundarios relacionados con el tratamiento. Por lo tanto, se demuestra que una estrategia terapéutica de este tipo es particularmente relevante, en particular en el tratamiento crónico de pacientes de corta edad que padecen neuropatía motora.

40

45 La composición de acuerdo con la invención puede asociar los antagonistas cálcicos de acuerdo con la invención a otros agentes activos, en particular agentes activos susceptibles de tratarlas neuropatías motoras. Entre estos agentes activos, se pueden mencionar a modo de ejemplo:

- riluzol, (Haddad H et ál., Riluzole attenuates spinal muscular atrophy disease progression in a mouse model, 2003. 28 (4): 432-437; Y Wadman RI et ál., 2012. Drug treatment for spinal muscular atrophy type I, Cochrane Database Syst Rev. 4: CD006281);
- hidroxíurea (Chen TH et ál., Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of hydroxyurea in spinal muscular

50

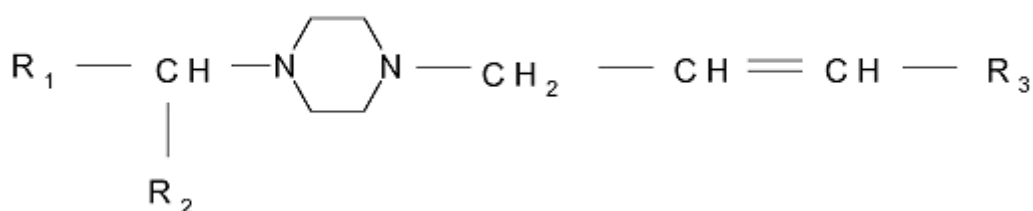
- atrophy, *Neurology*, 2010 75: 2190-21);
- 5 - inhibidores de la ubiquitina/proteasoma (Chang HC et ál., Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway, *Neurochem Int.*, 2004, 45: 1107-1112; y Kwon DY et ál., Increasing expression and decreasing degradation of SMN ameliorate the spinal muscular atrophy phenotype in mice, *Hum Mol Genet.*, 2011, 20: 3667-3677);
 - 10 - inhibidores de las histona desacetilasas (Lunke S et ál., The emerging role of epigenetic modifications and chromatin remodeling in spinal muscular atrophy. *J Neurochem*, 2009, 109 (6): 1557-1569);
 - 15 - inhibidores de las proteínas fosfatasa as phosphatases (Novoyatleva T et ál., Protein phosphatase 1 binds to the RNA recognition motif of several splicing factors and regulates alternative pre-mRNA processing, *Hum. Mol. Genet.*, 2008, 17, 52-70);
 - 20 - olesoxima (TRO19622), Bordet T et ál., Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis, *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 322 (2): 709-720.);
 - aminoglucósidos (Mattis VB et ál., Analysis of a read-through promoting compound in a severe mouse model of spinal muscular atrophy, 2012, 525 (1): 72-75);
 - salbutamol (Pane M et ál., Daily salbutamol in young patients with SMA type II, *Neuromuscul Disord.*, 2008, 18: 536-540);
 - 25 - isoindolin (solicitud US 2010/0267712);
 - ibudilast (solicitud US 2009/0062330);
 - 30 - moduladores de las quinasas (Burnett BG, et ál., Regulation of SMN protein stability, *Mol Cell Biol.*, 2009, 29 (5): 1107-1115);
 - variantes de IGF-1 (Murdocca M et ál., IPLEX administration improves motor neuron survival and ameliorates motor functions in a severe mouse model of SMA, *Mol Med.* 29 de mayo de 2012. doi: 10.2119/molmed.2012.00056);
 - 35 - factores de crecimiento humanos (solicitud US 2008/0187512);
 - pirimidinas bicíclicas que inhiben la PTK (Hastings ML et ál., Tetracyclines that promote SMN2 exon 7 splicing as therapeutics for spinal muscular atrophy, *Sci Transl Med.*, 2009, 1 (5): 5ra12);
 - 40 - quinazolina que inhibe el EGFR (Butchbach ME et ál., Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy, *Hum Mol Genet.*, 2010, 19 (3): 454-467);
 - 45 - inhibidores de tirosina quinasas (solicitud US 2010/0305036);
 - inhibidores de VEGFR (solicitud US 2010/0331296);
 - 50 - inhibidores de HSP90 (Suzuki K et ál., Pathogenesis-targeting therapeutics for spinal and bulbar muscular atrophy. (SBMA), *Neuropathology*, 2009, 29 (4): 509-516);
 - antagonistas de la miostatina (Rose FF Jr et ál., Delivery of recombinant follistatin lessens disease severity in a mouse model of spinal muscular atrophy, *Hum Mol Genet.*, 2009, 18 (6): 997-1005);
 - 55 - heparina de bajo peso molecular (solicitud US 2002/0040013);
 - neramexano (solicitud US 2010/0234402);
 - nicergolina (solicitud US 2003/0134869);
 - 60 - inhibidores de la proteína quinasa G3SKB (Makhortova NR et ál., A screen for regulators of survival of motor neuron protein levels, *Nat Chem Biol.*, 2011, 7 (8): 544-552);
 - 65 - inhibidores de RhoA y de quinasa asociada a Rho (ruta de ROCK) (Bowerman M et ál., *Mol Cell Neurosci*, 2009, 42: 66-74 y Bowerman M et ál., *Hum Mol Genet* 2010, 19: 1468-1478);

- antioxidantes (Wan L et ál., Inactivation of the SMN complex by oxidative stress, Mol Cell., 2008 31 (2): 244-254);
- inhibidores de la apoptosis (Sareen D et ál., Inhibition of apoptosis blocks human motor neuron cell death in a stem cell model of spinal muscular atrophy. PLoS One. 7 (6): e39113. 2012); o incluso
- moduladores de las vías de ERK y PI3K/AKT quinasas. (Biondi O et ál., In vivo NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and enhances SMN2 gene expression in severe spinal muscular atrophy mice, J Neurosci., 2010 30: 11288-11299.)

Además, en el presente documento también se describe una composición que comprende al menos un antagonista cálcico elegido entre el grupo formado por:

- antagonistas cálcicos de la familia de las fenilalquilaminas de fórmula I y sus sales,

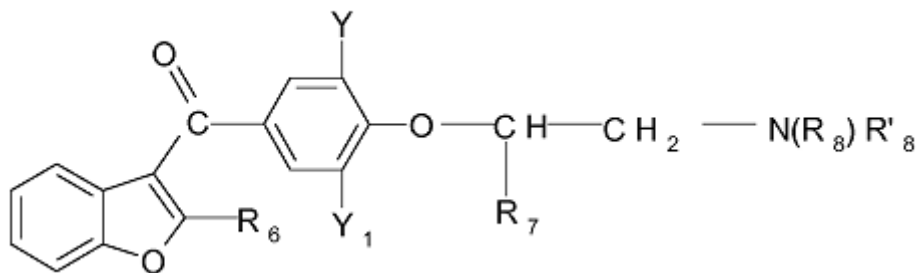
Fórmula I



en la que:

- los grupos R₁, R₂ y R₃ son idénticos o diferentes y se eligen entre los radicales fenilo y fluorofenilo, con la condición de que al menos uno de los grupos R₁, R₂ y R₃ sea un radical fluorofenilo;
- antagonistas cálcicos de la familia de los benzofuranos de fórmula III y sus sales

Fórmula III



en la que:

- el grupo R₆ representa un radical alquilo inferior de cadena lineal o ramificada que contiene hasta 6 átomos de carbono,
- el grupo R₇ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo,
- el grupo N(R₈)R'₈ representa un grupo dimetilamino, dietilamino, dipropilamino, piperidino, pirrolidino o morfolino, y
- los grupos Y e Y₁ son idénticos y representan un átomo de hidrógeno, de yodo o de bromo;

al menos un agente activo elegido entre riluzol, hidroxurea, inhibidores de ubiquitina/proteasoma, inhibidores de las histona desacetilasas, inhibidores de las proteínas fosfatasa, olesoxima, aminoglucósidos, salbutamol, isoindolina, ibudilast, moduladores de las quinasas, variantes de IGF-1, factores de crecimiento humano, pirimidinas bicíclicas que inhiben la PTK, quinazolina que inhibe EGFR, inhibidores de tirosina quinasas, inhibidores de HSP90, antagonistas de la miostatina, heparina de bajo peso molecular, neramexano, inhibidores de la proteína quinasa G3SKB, inhibidores de RhoA y de quinasa asociada a Rho (ruta de ROCK), antioxidantes, inhibidores de la apoptosis y moduladores de las vías de ERK y PI3K/AKT quinasas.

Preferentemente, dicho antagonista cálcico es la flunarizina o una de sus sales.

Por lo general, la asociación de los antagonistas cálcicos de la invención y de dicho agente activo puede ser simultánea, separada, o escalonada en el tiempo.

5 Por lo general, los antagonistas cálcicos de la invención se pueden asociar al Riluzol para su utilización en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica.

Descripción de las figuras

10 **Figura 1:** Efecto de sinergia entre el diclorhidrato de flunarizina y el clorhidrato de amiodarona en la distribución de la proteína SMN en los CB.

Esta figura muestra los efectos en los fibroblastos de SMA inmortalizados:

- 15
- del DMSO (control para el que se atribuyó de forma arbitraria un valor de inducción de un factor igual a 1),
 - del diclorhidrato de flunarizina solo,
 - del clorhidrato de amiodarona solo, y
 - de la combinación del diclorhidrato de flunarizina y del clorhidrato de amiodarona.

20 Descripción detallada de la invención

Ejemplos

1. Ensayo de los antagonistas cálcicos de la invención en los fibroblastos de SMA inmortalizados

25 Los inventores han mostrado un efecto beneficioso de los antagonistas cálcicos de la familia de las fenilalquilaminas, de la familia de los aminoácidos y los de la familia de los benzofuranos con el nombre de Cuerpos de Cajal de fibroblastos de SMA inmortalizados. Para esta realización, sometieron al ensayo moléculas características que presentan del mejor modo a cada una de estas familias:

- 30
- diclorhidrato de flunarizina,
 - gabapentina,
 - pregabalina, y
 - clorhidrato de amiodarona.

35 La inmortalización con la ayuda del antígeno grande T del virus SV40 de fibroblastos aislados a partir de un niño afectado con una forma grave de la enfermedad permitió establecer condiciones de cultivo celular particularmente resistentes. Esta inmortalización se describe en la publicación de Lefebvre S, Bulet P, Viollet L, Bertrand S, Huber C, Belser C et Munnich A. A novel association of the SMN protein with major non-ribosomal nucleolar proteins and its implication in spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet (2002) 11 (9) : 1017-1027.

40 El aumento del número de CB en los fibroblastos de SMA inmortalizados (de 10000 a 12000 células por pocillo de 0,8 a 1 cm cuadrado en medio de cultivo controlado) se evaluó después de 24 horas de tratamiento para cada uno de los antagonistas cálcicos a una concentración de 2 microgramos/ml (es decir, entre 2 y 10 micromolar, siguiendo la masa molecular de una sustancia). Los antagonistas de la invención están disponibles en el mercado (por ejemplo en Sigma-Aldrich) y se comercializan en placas de 96 pocillos, a 2 miligramos por molécula por pocillo a disolver en 1 ml de DMSO.

50 La concentración de 2 microgramos/ml (es decir, una dilución a 1:1000 de la solución madre) corresponde a una acción máxima para todos los antagonistas. El análisis mediante inmunomarcado con la ayuda de anticuerpos dirigidos contra la proteína SMN (comercializados y producidos de forma personalizada) muestra que esta proteína se localiza ocasionalmente a nivel de los CB en un 3 a un 6 % de las células no tratadas o tratadas con DMSO solo (excipiente de control).

55 Para determinar si los antagonistas cálcicos ejercían un efecto positivo, los inventores hicieron el recuento de las células que tenían la proteína SMN localizada en los CB en 100 células elegidas al azar para cada experimento.

60 Este experimento se repitió tres veces. Los resultados obtenidos a partir de la media de los destinos experimentos desvelaron que las moléculas sometidas a ensayo aumentaban de manera significativa el número de los CB que contenían la proteína SMN después de 24 horas de tratamiento a 2 gramos/ml (khi-2, $p < 0,001$, $n = 300$, 100 células por experimento).

65 Un valor de inducción de un factor igual a 1 se atribuyó de forma arbitraria al DMSO. Los resultados muestran que las 4 moléculas ejercían una inducción significativa de un factor igual a al menos 1,7.

De forma más precisa, los inventores también mostraron que la pregabalina ejerce una inducción significativa de un

factor igual a 1,7 (khi-2, $0,001 < p < 0,01$, $n = 2300$ células). El clorhidrato de amiodarona ejerce una inducción significativa de aproximadamente 2,8. La gabapentina ejerce la inducción significativa de aproximadamente 3,3. Por último, el clorhidrato de flunarizina ejerce la inducción significativa de aproximadamente 4,8.

5 Los inventores verificaron a continuación que estas moléculas ejercían siempre el mismo efecto beneficioso después de 78 horas de tratamiento con una sola dosis inicial.

10 El análisis estadístico a partir de estos experimentos permitió concluir que estas moléculas eran capaces de aumentar de manera significativa la distribución de la proteína SMN en los CB en la línea inmortalizada de fibroblastos de SMA (khi-2, $p < 0,0001$, $n > 3000$ células). El análisis mediante inmunomarcado de las proteínas SMN y de coilina (otro marcador de los CB detectado con la ayuda de un anticuerpo comercial) confirmó que estas dos proteínas estaban bien colocalizadas en los CB en las células tratadas con cada una de las 4 moléculas.

15 Por lo tanto los inventores han tenido éxito al mostrar que estos 4 compuestos son particularmente relevantes en el tratamiento de neuronopatías motoras.

2. Verificación de los efectos ejercidos en fibroblastos de pacientes con SMA

20 Se analizó la distribución de la proteína SMN en los Cuerpos de Cajal en una serie de cultivos primarios de fibroblastos de la piel de pacientes afectados con la forma grave (tipo I), intermedia (Tipo II) inmoderada de la enfermedad (tipo III) inducida por la acción de los antagonistas cálcicos de la invención. El valor medio se calcula a partir de 3 a 7 experimentos ($n = 300$ a 700 células). El valor de khi-2 se indica en la tabla 1.

25 Para confirmar el efecto de los antagonistas cálcicos de la invención, los inventores analizaron la distribución de la proteína SMN en los Cuerpos de Cajal en una serie de cultivos primarios de fibroblastos de la piel de pacientes afectados con la forma grave (tipo I), intermedia (Tipo II) inmoderada de la enfermedad (tipo III) inducida por la acción de los antagonistas cálcicos de la invención.

Estos fibroblastos se obtienen a partir de:

- 30
- 2 individuos afectados con la forma grave (tipo I),
 - 2 individuos afectados con la forma intermedia (tipo II), y que
 - 1 individuo afectado con la forma moderada (tipo III).

35 El análisis estadístico de los resultados para el ensayo de khi-2 se resume en la tabla 1.

Tabla 1: Análisis estadístico mediante ensayo de khi-2 de la acción de los antagonistas cálcicos de la invención en la distribución de la proteína SMN en los CB en cultivos primarios de fibroblastos de la piel de pacientes afectados con la forma grave (tipo I), intermedia (tipo II), inmoderada de la enfermedad (tipo III)

Compuesto	Tipo I		Tipo II		Tipo III
	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5
Diclorhidrato de flunarizina	2,87	27,44	6,09	10,99	12,38
Gabapentina	5,38	36,85	3,1	0,78	5,85
Clorhidrato de amiodarona	0,46	7,16	0	1,2	2,72

40 La acción de los antagonistas cálcicos de la invención es más baja en cultivos primarios de fibroblastos de SMA. Esto se explica por un metabolismo celular más lento de los cultivos primarios, mientras que la línea inmortalizada se divide más rápidamente.

45 El análisis detallado desvela que los 2 cultivos de tipo I no reaccionan de la misma manera. Uno de los cultivos (paciente 2) responde de forma positiva a los compuestos de la invención en las células inmortalizadas de tipo I, mientras que el segundo (paciente 1) responde de manera significativa nada más que a la molécula de gabapentina (ensayo de khi-2, $0,02 < p < 0,05$). Esta última es la línea GM03813 obtenida en Coriell Cell Repositories (USA); es muy utilizada en la comunidad científica para realizar estudios sobre la acción de moléculas en el campo de la SMA.

50 Los cultivos de tipo II e III responden en conjunto de manera más baja que el cultivo de tipo I positivo. Esta diferencia está relacionada con el número de CB con la proteína SMN al principio del tratamiento, siendo este número ya más elevado en los tipos II e III que en los tipos I (Renvoisé B, Khoobarry K, Gendron MC, Cibert C, Viollet L y Lefebvre S. Distinct domains of the spinal muscular atrophy protein SMN are required for targeting to Cajal bodies in

mammalian cells. Journal of Cell Sciences (2006) 119: 680-692.

En conjunto, este estudio muestra que los antagonistas cálcicos de la invención son relevantes para el tratamiento de neuronopatías motoras, en particular la SMA. Sin embargo, parece que el diclorhidrato de flunarizina es el compuesto que ejerce una acción positiva para el mayor número de cultivos primarios de pacientes con SMA, los tres tipos mezclados.

Para evaluar la relación entre la concentración (dosis) y el efecto (respuesta) en los CB de las células de SMA inmortalizadas, los inventores construyeron una curva de dosis-respuesta para cada una de las moléculas. La concentración eficaz media (CE50) en las condiciones experimentales que se describen en el presente documento es de aproximadamente 80 ± 22 nM para el diclorhidrato de flunarizina. Los resultados se enumeran en la tabla 2.

Tabla 2: Acción de los compuestos de la invención en la distribución de la proteína SMN en los CB en la línea inmortalizada de fibroblastos de un paciente afectado con la forma grave (tipo I)

Compuesto	Concentración a 2 µg/ml (µM)	Máximo de inducción	Dilución a CE50	CE50, nM	Dilución a CE50
DMSO	1:1000	$1 \pm 0,3$	--	--	--
Diclorhidrato de flunarizina	4,2	$4,8 \pm 1,5$	1/53	80 ± 22	2,9
Gabapentina	11,6	$4,4 \pm 1,0$	1/55	210 ± 38	2,9
Clorhidrato de amidarona	3,0	$2,8 \pm 1,0$	1/50	60 ± 26	1,8

Varios informes publicados indican que la dosis eficaz media de diclorhidrato de flunarizina administrada por vía oral en el ser humano es de 10 mg al día, lo que corresponde a valores de la tasa plasmática máxima de diclorhidrato de flunarizina de aproximadamente 81 ± 16 nanogramos/ml (es decir, aproximadamente 170 ± 34 nM) en un tiempo comprendido entre 2 y 4 horas y el estado de equilibrio se alcanza en 5 a números seis semanas. Además, la distribución tisular es importante y la semivida de eliminación es larga. Por lo tanto, las concentraciones plasmáticas se sitúan en un intervalo de concentraciones compatible con las concentraciones asociadas a los efectos del diclorhidrato de flunarizina en el modelo celular de los inventores.

La proteína SMN forma parte de un gran complejo multiproteico, en el que el papel mejor estudiado es el montaje de las partículas ribonucleoproteicas del corte y empalme, las snRNP (ribonucleoproteínas nucleares pequeñas). Un defecto de este montaje se visualiza mediante una disminución notable de la localización de las snRNP al nivel de los CB en los fibroblastos de pacientes con SMA (Renvoisé B, Khoobarly K, Gendron MC, Cibert C, Viollet L y Lefebvre S. Distinct domains of the spinal muscular atrophy protein SMN are required for targeting to Cajal bodies in mammalian cells. Journal of Cell Sciences (2006) 119: 680-692). En otro modelo celular, se publicó que la presencia y el número de CB estaban directamente relacionados con la eficacia con la que se montan las snRNP (Klingauf M., Stanek, D. y Neugebauer, K.M. (2006). Enhancement of U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle association in Cajal bodies predicted by mathematical modeling. Mol. Biol. Cell., 2006, 17, 4972-4981).

En las células de SMA inmortalizadas se realizaron experimentos de coinmunomarcado similares a los precedentes con la ayuda de dos anticuerpos disponibles en el mercado, uno específico de la proteína coilina (marcador de los CB) y el otro del revestimiento de trimetilguanosinas (TMG) de los pequeños ARN nucleares de las snRNP.

Estos ensayos muestran un aumento de la proteína SMN y de las snRNP en los Cuerpos de Cajal en la línea inmortalizada de SMA de la forma grave de la enfermedad (Tipo I) inducido por los antagonistas cálcicos de la invención. El valor medio para las snRNP se calcula a partir de los 3 experimentos ($n = 300$ células). El análisis de estos inmunomarcados muestra un aumento significativo de las snRNP a nivel de los CB en las células tratadas durante 24 horas con diclorhidrato de flunarizina ($khi-2$, $0,001 < p < 0,01$), a partir de tres experimentos independientes sobre 100 células por experimento.

Este estudio muestra que el diclorhidrato de flunarizina es el compuesto que ejercería mejor un efecto beneficioso a la vez en:

- la acumulación de la proteína SMN en los CB; y
- la acumulación de las snRNP en los CB.

En conclusión, este estudio coloca:

- los antagonistas cálcicos de la familia de las fenilalquilaminas, en particular la flunarizina y sus sales,
- los antagonistas cálcicos de la familia de los aminoácidos, y
- los antagonistas cálcicos de la familia de los benzofuranos,

5 en una estrategia terapéutica de las enfermedades que implican la degeneración de las neuronas motoras, en particular la amiotrofia espinal infantil, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis lateral primaria, la enfermedad de Kennedy, y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

10 **3. Efecto de sinergia entre el diclorhidrato de flunarizina y el clorhidrato de amiodarona en la distribución de la proteína SMN en los CB**

15 Los inventores sometieron a ensayo el efecto de la combinación del diclorhidrato de flunarizina y del clorhidrato de amiodarona en fibroblastos de SMA inmortalizados aislados a partir de un niño que padece una forma grave de la enfermedad, de acuerdo con los protocolos que se han descrito en los ejemplos 1 y 2.

Para realizar esto, los inventores han observado en efecto en los fibroblastos de SMA inmortalizados:

- del DMSO (control para el que se atribuyó de forma arbitraria un valor de inducción de un factor igual a 1),
- 20 - del diclorhidrato de flunarizina solo,
- del clorhidrato de amiodarona solo, y
- de la combinación del diclorhidrato de flunarizina y del clorhidrato de amiodarona.

25 Los inventores observan que el diclorhidrato de flunarizina y el clorhidrato de amiodarona se utilizan en una dilución a 1/1000 con respecto a los ejemplos 1 y 2.

Los resultados se representan en la figura 1. La figura 1 muestra que el diclorhidrato de flunarizina y el clorhidrato de amiodarona actúan en sinergia sobre la distribución de la proteína SMN en los CB.

30 De forma más precisa, los inventores han mostrado que:

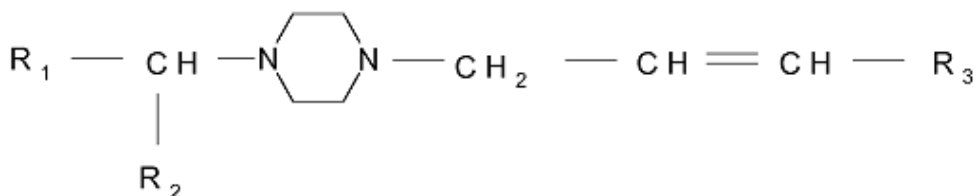
- el diclorhidrato de flunarizina solo, diluido a 1/1000, ejerce una inducción significativa de un factor igual a 1,2 (χ^2 -2, $0,001 < p < 0,01$, $n = 1072$ células);
- 35 - el clorhidrato de amiodarona solo, diluido a 1/1000, ejerce una inducción no significativa de un factor igual a 1 (χ^2 -2, $0,001 < p < 0,01$, $n = 625$ células);
- el diclorhidrato de flunarizina y el clorhidrato de amiodarona ejercen en conjunto una inducción significativa de un factor igual a 1,9 (χ^2 -2, $p < 0,001$, $n = 2625$ células).

40 Este ejemplo muestra el efecto sorprendente y ventajoso de la combinación del diclorhidrato de flunarizina y del clorhidrato de amiodarona. De este modo los inventores han desarrollado una estrategia terapéutica particularmente relevante para el tratamiento de neuropatías motoras.

REIVINDICACIONES

1. Antagonista cálcico elegido entre el grupo formado por antagonistas cálcicos de la familia de las fenilalquilaminas de fórmula I y sus sales,

5

Fórmula I

en la que:

10 - los grupos R_1 , R_2 y R_3 son idénticos o diferentes y se eligen entre los radicales fenilo y fluorofenilo, con la condición de que al menos uno de los grupos R_1 , R_2 y R_3 sea un radical fluorofenilo;

para su utilización en el tratamiento de una neuropatía motora elegida entre amiotrofia espinal infantil, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, enfermedad de Kennedy, y enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

15

2. Antagonista cálcico para su utilización de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicha neuropatía motora es amiotrofia espinal infantil.

20 3. Antagonista cálcico para su utilización de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** dicho antagonista cálcico pertenece a la familia de las fenilalquilaminas de fórmula I o una de sus sales, en la que:

- los grupos R_1 y R_2 son radicales parafluorofenilo, y
- el grupo R_3 es un radical fenilo.

25

4. Antagonista cálcico elegido entre el grupo formado por flunarizina, sus sales, y sus mezclas para su utilización en el tratamiento de una neuropatía motora elegida entre amiotrofia espinal infantil, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, enfermedad de Kennedy, y enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

30 5. Antagonista cálcico para su utilización de acuerdo con la reivindicación 4, dicho antagonista cálcico siendo flunarizina o una de sus sales.

6. Antagonista cálcico para su utilización de acuerdo con la reivindicación 4, dicho antagonista cálcico siendo diclorhidrato de flunarizina.

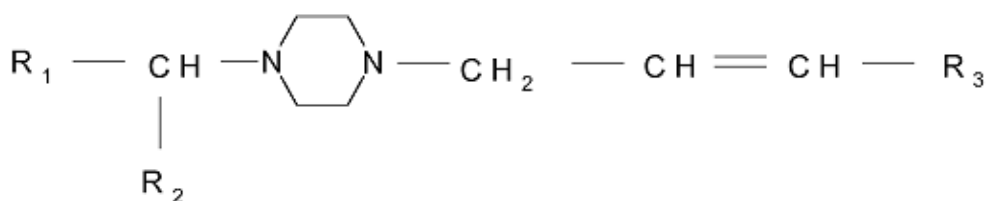
35

7. Antagonista cálcico para su utilización de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** dicho antagonista cálcico se administra a una dosis comprendida entre 5 mg y 10 mg al día.

40 8. Antagonista cálcico para su utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** permite el aumento de la distribución de la proteína SMN y de las snRNP en los Cuerpos de Cajal y/o el aumento del número de Cuerpos de Cajal.

9. Composición que comprende:

45 ➤ un antagonista cálcico de la familia de las fenilalquilaminas de fórmula I y sus sales,

Fórmula I

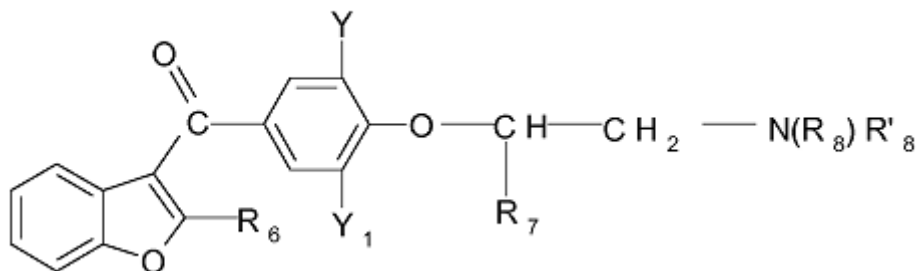
en la que:

- los grupos R₁, R₂ y R₃ son idénticos o diferentes y se eligen entre los radicales fenilo y fluorofenilo, con la condición de que al menos uno de los grupos R₁, R₂ y R₃ sea un radical fluorofenilo;

5
y

➤ un antagonista cálcico de la familia de los benzofuranos de fórmula III y sus sales

Fórmula III



10

en la que:

- el grupo R₆ representa un radical alquilo inferior de cadena lineal o ramificada que contiene hasta 6 átomos de carbono,
- el grupo R₇ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo,
- el grupo N(R₈)R'₈ representa un grupo dimetilamino, dietilamino, dipropilamino, piperidino, pirrolidino o morfolino, y
- los grupos Y e Y₁ son idénticos y representan un átomo de hidrógeno, de yodo o de bromo;

15

20

para su utilización en el tratamiento de una neuronopatía motora elegida entre amiotrofia espinal infantil, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, enfermedad de Kennedy, y enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

25

10. Composición para su utilización de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizada por que** dicho antagonista cálcico de la familia de las fenilalquilaminas de fórmula I es el diclorhidrato de flunarizina y **por que** dicho antagonista cálcico de la familia de los benzofuranos de fórmula III es el clorhidrato de amiodarona.

30

11. Composición para su utilización de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, **caracterizada por que** se administra a una dosis inferior a 5 mg al día.

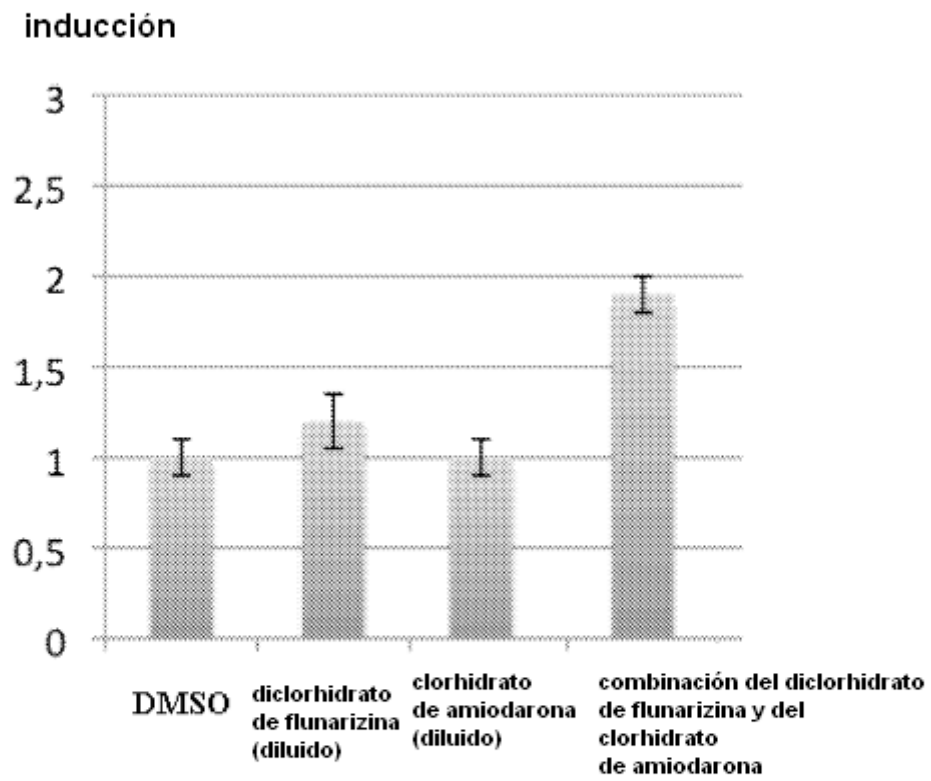


Figura 1