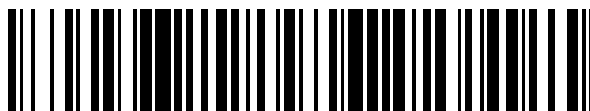


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 355**

51 Int. Cl.:

A61K 31/401 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

A61P 25/02 (2006.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2015** **PCT/GB2015/052886**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016** **WO16051195**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2015** **E 15790623 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019** **EP 3200784**

54 Título: **Tratamiento de la neuropatía de fibras pequeñas**

30 Prioridad:

03.10.2014 GB 201417499

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2020

73 Titular/es:

CONVERGENCE PHARMACEUTICALS LIMITED
(100.0%)

90 High Holborn
London WC1V 6XX , GB

72 Inventor/es:

MORISSET, VALERIE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 750 355 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 la neuropatía de fibras pequeñas

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al tratamiento de la eritromelalgia que comprende administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva de 5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

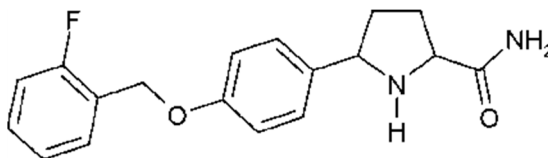
10

ANTECEDENTES

La neuropatía de fibras pequeñas es provocada por una anomalía estructural en las fibras pequeñas que resulta en una degeneración en las terminaciones nerviosas de las fibras pequeñas. Las fibras pequeñas son un tipo de fibra nerviosa del sistema nervioso periférico con un diámetro estrecho que puede mielinizarse (A δ) o desmielinizarse (C). Los síntomas de la neuropatía de fibras pequeñas varían entre los pacientes, pero la mayoría de los pacientes experimenta alguna forma de dolor que puede ser agudo y debilitante y puede caracterizarse por el dolor neuropático en curso con episodios paroxísticos y síntomas autónomos. El diagnóstico de la neuropatía de fibras pequeñas puede confirmarse mediante la demostración de la densidad reducida de las fibras nerviosas en una biopsia cutánea y/o pruebas sensoriales cuantitativas anormales. Existe una fuerte asociación con la diabetes y un enlace claro con la mutación con ganancia de función de Nav1.7 en aproximadamente el 30% de las neuropatías de fibras pequeñas idiopáticas (Faber y col. (2012) *Ann Neurol.* 71,26-39; Dib-Hajj y col. (2013) *Nature Reviews Neuroscience* 14,49-62). Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un tratamiento efectivo para la neuropatía de fibras pequeñas para ayudar a los pacientes a tratar sus síntomas.

25

El documento WO 2007/042239 describe 5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-prolinamida que tiene la siguiente fórmula:



30 y sales, solvatos o profármacos farmacéuticamente aceptables de la misma.

Themistocleous y col. (2014) *Pract. Neurol.* 0:1-12 describe que la neuropatía de fibras pequeñas se ha asociado a las mutaciones de ganancia de función en los canales de sodio voltaje dependientes Na_v1.7 y Na_v1.8.

35

EL-DOLKA A y col. (2012) "What's in the literature?", *JOURNAL OF CLINICAL NEUROMUSCULAR DISEASE*, Volumen 13, No. 4, págs. 246-252 y CATHARINA G. FABER y col. (2011) "Gain of function Na_v1.7 mutations in idiopathic small fiber neuropathy", *ANNALS OF NEUROLOGY*, Volumen 71, No. 1, págs. 26-39, ambos sugieren el uso de bloqueadores selectivos de Na_v1.7 para el tratamiento de la neuropatía de fibras pequeñas.

40

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de la neuropatía de fibras pequeñas.

45

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto para su uso en un método para el tratamiento de la neuropatía de fibras pequeñas que comprende administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva de (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

50

También se describe el uso de (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de la misma, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la neuropatía de fibras pequeñas.

55

En una realización, el sujeto a tratar es un ser humano.

Una referencia a (5R)-5-(4-[[2-fluorofenil]metil]oxi}fenil)-L-prolinamida también incluye formas iónicas, sales, solvatos, isómeros estereoquímicos, tautómeros e isótopos de la misma; preferiblemente las sales o tautómeros o solvatos de la misma. También se describen isómeros tales como isómeros geométricos, N-óxidos, ésteres, profármacos y formas

5 protegidas.

(5R)-5-(4-[[2-fluorofenil]metil]oxi}fenil)-L-prolinamida puede existir en forma de una sal, por ejemplo, una sal de adición de ácidos o, en ciertos casos, una sal de bases orgánicas e inorgánicas tales como una sal de carboxilato, sulfonato y fosfato. Todas estas sales están dentro del alcance de esta invención, y las referencias a (5R)-5-(4-[[2-fluorofenil]metil]oxi}fenil)-L-prolinamida incluyen las formas de sal de este compuesto.

10

Las sales farmacéuticamente aceptables de (5R)-5-(4-[[2-fluorofenil]metil]oxi}fenil)-L-prolinamida son, por ejemplo, sales de adición de ácidos no tóxicas formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico y fosfórico, con ácidos carboxílicos o con ácidos organosulfónicos. Los ejemplos incluyen sales HCl, HBr, HI, sulfato o bisulfato, nitrato, fosfato o hidrogenofosfato, acetato, benzoato, succinato, sacarato, fumarato, maleato, lactato, citrato, tartrato, gluconato, camsilato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato. Para revisiones sobre sales farmacéuticas adecuadas, véanse Berge y col., *J. Pharm. Sci.*, 66, 1-19, 1977; P L Gould, *Int. J. Pharma.*, 33 (1986), 201-217; y Bighley y col., *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker Inc, Nueva York 1996, Volumen 13, página 453-497.

20

Las sales descritas en la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto precursor que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales, tales como los métodos descritos en *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Tapa dura, 388 páginas, agosto de 2002. Generalmente, dichas sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con la base o ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se utilizan medios no acuosos, tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo.

25

Las sales de adición de ácidos (mono- o di-sales) pueden formarse con una amplia diversidad de ácidos, tanto inorgánicos como orgánicos. Los ejemplos de sales de adición de ácidos incluyen mono- o di-sales formadas con un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, 2,2-dicloroacético, adípico, algínico, ascórbico (por ejemplo, L-ascórbico), L-aspártico, bencenosulfónico, benzoico, 4-acetamidobenzoico, butanoico, (+) canfórico, canfor-sulfónico, (+)-(1S)-canfor-10-sulfónico, cáprico, caproico, caprílico, cinnámico, cítrico, ciclámico, dodecilsulfúrico, etan-1,2-disulfónico, etanosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, fórmico, fumárico, galactárico, gentísico, glucoheptónico, D-glucónico, glucurónico (por ejemplo, D-glucurónico), glutámico (por ejemplo, L-glutámico), α -oxoglutarico, glicólico, hipúrico, hidrohálidos (por ejemplo, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico), isetiónico, láctico (por ejemplo, (+)-L-láctico, ($\pm$)-DL-láctico), lactobiónico, maleico, málico, (-)-L-málico, malónico, ($\pm$)-DL-mandélico, metanosulfónico, naftalen-2-sulfónico, naftalen-1,5-disulfónico, 1-hidrox-2-naftoico, nicotínico, nítrico, oleico, orótico, oxálico, palmítico, pamoico, fosfórico, propiónico, pirúvico, L-piroglutámico, salicílico, 4-amino-salicílico, sebácico, esteárico, succínico, sulfúrico, tánico, (+)-L-tartárico, tiocianico, p-toluenosulfónico, undecilénico y valérico, así como aminoácidos acilados y resinas de intercambio catiónico.

40

Un grupo particular de sales consiste en sales formadas a partir de ácido acético, clorhídrico, yodhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, cítrico, láctico, succínico, maleico, málico, isetiónico, fumárico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, metanosulfónico (mesilato), etanosulfónico, naftalensulfónico, valérico, acético, propanoico, butanoico, malónico, glucurónico y lactobiónico. Una sal particular es la sal clorhidrato.

45

Los compuestos de la invención pueden existir como mono- o di-sales dependiendo de la pK_a del ácido a partir del cual se forma la sal.

50

Se apreciará que para su uso en medicina, las sales de los compuestos deben ser farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas serán evidentes para los expertos en la materia. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las descritas por Berge, Bighley y Monkhouse, *J. Pharm. Sci.* (1977) 66, págs. 1-19. Dichas sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácidos formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico o fosfórico, y ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido succínico, maleico, acético, fumárico, cítrico, tartárico, benzoico, p-toluenosulfónico, metanosulfónico o naftalensulfónico. Otras sales, por ejemplo, oxalatos o formatos, se pueden usar, por ejemplo, en el aislamiento de los compuestos descritos en la presente invención, y se incluyen dentro del alcance de esta invención. Sin embargo, las sales que no son farmacéuticamente aceptables también pueden prepararse como formas intermedias que después pueden convertirse en sales farmacéuticamente aceptables. Dichas formas de sales no farmacéuticamente aceptables, que pueden ser útiles, por ejemplo, en la purificación o separación de los compuestos de la invención, también forman parte de la invención.

60

En una realización, la (5R)-5-(4-(((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, se selecciona de clorhidrato de (5R)-5-(4-(((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida o metanosulfonato de (5R)-5-(4-(((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida. En una realización adicional, la (5R)-5-(4-
 5 (((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, es clorhidrato de (5R)-5-(4-(((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida.

Algunos de los compuestos descritos en la presente invención pueden formar sales de adición de ácidos con uno o más equivalentes del ácido. La presente invención incluye dentro de su alcance todas las formas estequiométricas y
 10 no estequiométricas posibles.

Los expertos en la materia de la química orgánica apreciarán que muchos compuestos orgánicos pueden formar complejos con disolventes donde se hace reaccionar o a partir de los cuales precipitan o cristalizan. Estos complejos son conocidos como "solvatos". Por ejemplo, un complejo con agua se conoce como "hidrato". Los solvatos
 15 farmacéuticamente aceptables del compuesto de la invención están dentro del alcance de la invención. En una realización, los solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen el hidrato de los mismos.

Se apreciará por los expertos en la materia que ciertos derivados protegidos de (5R)- 5-(4-(((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, que pueden prepararse antes de una etapa de desprotección final, pueden no poseer actividad farmacológica como tal, pero, en ciertos casos, pueden administrarse por vía oral o parenteral y después metabolizarse en el cuerpo para formar compuestos de la invención que son farmacológicamente activos. Por lo tanto, dichos derivados pueden describirse como "profármacos".

Ejemplos de profármacos adecuados para los compuestos de la presente invención se describen en *Drugs of Today*, Volumen 19, Número 9, 1983, págs. 499 - 538, en *Topics in Chemistry*, Chapter 31, págs. 306 - 316 y en "*Design of Prodrugs*" de H. Bundgaard, Elsevier, 1985, Capítulo 1. Además, los expertos en la materia apreciarán que ciertos restos, conocidos por los expertos en la materia como "pro-restos", por ejemplo, como se describe por H. Bundgaard en "*Design of Prodrugs*", se pueden colocar en funcionalidades apropiadas cuando dichas funcionalidades están
 25 presentes dentro de los compuestos.

Los expertos en la materia de la química orgánica apreciarán que muchos compuestos orgánicos pueden formar complejos con disolventes donde se hace reaccionar o a partir de los cuales precipitan o cristalizan. Estos complejos son conocidos como "solvatos". Por ejemplo, un complejo con agua se conoce como "hidrato". Los solvatos
 35 farmacéuticamente aceptables del compuesto de la invención están dentro del alcance de la invención.

Como se usa en la presente invención, a menos que se indique de otro modo, el término "neuropatía de fibras pequeñas" (también conocida como "neuropatía periférica de fibras pequeñas" o "SFN") significará cualquier trastorno donde el paciente sufre de dolor, especialmente en sus manos y/o pies) debido a la degeneración de las terminaciones
 40 nerviosas de las fibras pequeñas.

La neuropatía de fibras pequeñas puede ser una neuropatía de fibras pequeñas primaria (es decir, un trastorno en sí mismo) o una neuropatía de fibras pequeñas secundaria (es decir, un síntoma de otra condición). La neuropatía de fibras pequeñas primaria se ha asociado a las mutaciones de ganancia de función en los canales de sodio voltaje
 45 dependientes $Na_v1.7$ y $Na_v1.8$. Existen muchas causas potenciales de la neuropatía de fibras pequeñas secundaria, incluyendo: trastornos metabólicos, como la diabetes mellitus, la intolerancia a la glucosa, el control glucémico rápido, la deficiencia de la vitamina B12, la dislipidemia, el hipotiroidismo o la enfermedad renal crónica; infecciones, como el VIH, la hepatitis C, la influenza; medicamentos, como los antirretrovíricos, los antibióticos (por ejemplo, metronidazol, nitrofurantoína, linezolid), la quimioterapia (por ejemplo, bortezomib), la flecainida, la estatina, el alcohol, la toxicidad
 50 de la vitamina B6; trastornos mediados por el sistema inmunitario, como la celiaquía, la sarcoidosis, el síndrome de Sjogren, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico (SLE), la vasculitis, la enfermedad del intestino irritable, la paraneoplasia, la gammopatía monoclonal/amiloidosis. En muchos pacientes, no se identifica una causa específica y al síndrome se lo denomina como "idiopático".

En una realización, el trastorno se selecciona de la neuropatía de fibras pequeñas primaria o neuropatía de fibras pequeñas secundaria. En una realización adicional, el trastorno es la neuropatía de fibras pequeñas primaria. En una realización alternativa, el trastorno es neuropatía de fibras pequeñas secundaria.

El término "sujeto", como se usa en la presente invención, se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, mucho
 60 más preferiblemente un adulto, niño o bebe humano, que ha sido objeto de tratamiento, observación o experimento. En una realización, el sujeto es un paciente con diabetes mellitus o intolerancia a la glucosa, en especial, diabetes mellitus.

Se apreciará que las referencias en la presente invención al “tratamiento” se extienden a la profilaxis, la prevención de la recidiva y la supresión o la mejora de los síntomas (ya sean leves, moderados o graves), así como al tratamiento de afecciones establecidas.

5

El término “cantidad terapéuticamente efectiva”, como se usa en la presente invención, significa la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sistema de tejido, animal o humano, que busca un investigador, veterinario, médico u otro clínico, que incluye el alivio de uno o más de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se trata; y/o la reducción de la gravedad de uno o más de los síntomas de

10 la enfermedad o trastorno que se trata.

(5R)-5-(4-((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, también se puede usar en combinación con otros agentes terapéuticos. Por lo tanto, la invención proporciona, en un aspecto adicional, una combinación que comprende (5R)-5-(4-((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con un agente terapéutico adicional para su uso en el

15 tratamiento de la neuropatía de fibras pequeñas.

Puede usarse (5R)-5-(4-((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con otros medicamentos indicados como útiles en el tratamiento o profilaxis del dolor (es decir, analgésicos). Dichos agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, inhibidores de la COX-2 (ciclooxigenasa-2), tales como celecoxib, deracoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, COX-189 o 2-(4-etoxi-fenil)-3-(4-metanosulfonil-fenil)-pirazolo[1,5-b]piridazina (documento WO 99/012930); inhibidores de 5-lipoxigenasa; AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos), tales como diclofenaco, indometacina, nabumetona o ibuprofeno; bifosfonatos, antagonistas de los receptores de leucotrienos; FAME (fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad),

20 tales como metotrexato; agonistas del receptor de adenosina A1; bloqueadores de los canales de sodio, tales como lamotrigina; moduladores del receptor de NMDA (N-metil-D-aspartato), tales como antagonistas de los receptores de glicina o memantina; ligandos para la subunidad $\alpha 2\delta$ de los canales de calcio dependientes de voltaje, tales como gabapentina, pregabalina y solzira; antidepresivos tricíclicos, tal como amitriptilina; fármacos antiepilépticos estabilizadores de neuronas; inhibidores de la colinesterasa, tal como galantamina; inhibidores de la captación monoaminérgica, tal como venlafaxina; analgésicos opioides; anestésicos locales; agonistas de 5HT1, tales como triptanos, por ejemplo, sumatriptán, naratriptán, zolmitriptán, eletriptán, frovatriptán, almotriptán o rizatriptán; moduladores del receptor nicotínico de acetilcolina (nACh); moduladores del receptor de glutamato, por ejemplo, moduladores del subtipo NR2B; ligandos del receptor EP₄; ligandos del receptor EP₂; ligandos del receptor EP₃; agonistas de EP₄ y agonistas de EP₂; antagonistas de EP₄; antagonistas de EP₂ y antagonistas de EP₃; ligandos del

25 receptor cannabinoide; ligandos del receptor de bradiquinina; receptor vaniloide o ligandos de potencial del receptor transitorio (TRP); y ligandos de receptores purinérgicos, incluyendo antagonistas en P2X3, P2X2/3, P2X4, P2X7 o P2X4/7; abridores de canal KCNQ/Kv7, tal como retigabina; se describen inhibidores de la COX-2 adicionales en las Patentes de EE.UU. No. 5.474.995, No. 5.633.272, No. 5.466.823, No. 6.310.099 y No. 6.291.523; y en los documentos WO 96/25405, WO 97/38986, WO 98/03484, WO 97/14691, WO 99/12930, WO 00/26216, WO 00/52008, WO

30 00/38311, WO 01/58881 y WO 02/18374.

40

En una realización, la presente invención se refiere a la terapia conjunta, terapia complementaria o terapia de combinación, que comprende la administración de (5R)-5-(4-((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y uno o más analgésicos (por ejemplo, tramadol o amitriptilina),

45 fármacos anticonvulsivos (por ejemplo, gabapentina, neurontin o pregabalina (es decir, Lyrica)), o fármacos antidepresivos (por ejemplo, duloxetine (es decir, Cymbalta) o venlafaxina).

45

En esta realización, la cantidad terapéuticamente efectiva significará que la cantidad de la combinación de agentes se toma en conjunto para que el efecto combinado provoque la respuesta biológica o medicinal deseada. Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente efectiva de terapia conjunta que comprende la administración de (5R)-5-(4-((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y al menos un fármaco analgésico, anticonvulsivo o antidepresivo adecuado sería la cantidad de (5R)-5-(4-((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y la cantidad de fármacos analgésicos, anticonvulsivos o antidepresivos adecuados que, cuando se toman juntos o

50 secuencialmente, tienen un efecto combinado que es terapéuticamente efectivo. Además, un experto en la materia reconocerá que, en el caso de la terapia conjunta con una cantidad terapéuticamente efectiva, la cantidad de (5R)-5-(4-((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y/o la cantidad de fármacos analgésicos, anticonvulsivos o antidepresivos adecuados individualmente pueden o no ser terapéuticamente efectivos.

60

Como se usan en la presente invención, los términos “terapia conjunta”, “terapia auxiliar” y “terapia de combinación” significarán el tratamiento de un sujeto que lo necesite mediante la administración de uno o más agentes analgésicos,

anticonvulsivos o antidepresivos y (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, donde (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, el agente o agentes analgésicos, anticonvulsivos o antidepresivos se administran por cualquier medio adecuado, simultáneamente, secuencialmente, por separado o en una única formulación farmacéutica.

Cuando la administración es secuencial, se puede administrar primero el compuesto de la invención o el segundo agente terapéutico. Cuando la administración es simultánea, la combinación puede administrarse en la misma composición farmacéutica o en una diferente.

Cuando se combina en la misma formulación, se apreciará que los dos compuestos deben ser estables y compatibles entre sí y con los demás componentes de la formulación. Cuando se formulan por separado, pueden proporcionarse en cualquier formulación conveniente, convenientemente de la manera que se conoce para dichos compuestos en la técnica.

Cuando (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y el agente o agentes analgésicos, anticonvulsivos o antidepresivos se administran en formas de dosificación separadas, el número de dosis administradas al día para cada compuesto puede ser igual o diferente. Pueden administrarse (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma y el agente o agentes analgésicos, anticonvulsivos o antidepresivos a través de las mismas o diferentes rutas de administración. Los ejemplos de métodos de administración adecuados incluyen, oral, intravenoso (iv), intramuscular (im), subcutáneo (sc), intranasal, transdérmico y rectal. Los compuestos también pueden administrarse directamente al sistema nervioso, incluyendo las rutas de administración intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intraespinal y/o peri-espinal mediante la administración a través de agujas intracraneanas o intravertebrales, y/o catéteres con o sin dispositivos de bomba. Pueden administrarse (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y el agente o agentes analgésicos, anticonvulsivos o antidepresivos según regímenes simultáneos o alternos, en el mismo o en diferentes momentos durante el transcurso de la terapia, simultáneamente en formas divididas o individuales.

Ventajosamente, puede administrarse (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en una sola dosis diaria, o la dosificación diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día.

También se describen métodos para tratar la neuropatía de fibras pequeñas que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva de (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de la misma, como se describe en la presente invención.

Puede administrarse (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, como producto químico en bruto, pero el principio activo se presenta preferiblemente como una composición farmacéutica.

Como se usa en la presente invención, el término "composición" pretende abarcar un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que sea resultado, directa o indirectamente, de combinaciones de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

Dado que los compuestos descritos en la presente invención están destinados a ser utilizados en composiciones farmacéuticas, se entenderá fácilmente que cada uno se proporciona preferiblemente en forma sustancialmente pura, por ejemplo, al menos un 60 % pura, más adecuadamente al menos un 75 % pura, y preferiblemente al menos un 85 %, especialmente al menos un 98 % pura (los % se dan en una base de peso por peso). Las preparaciones impuras de los compuestos se pueden usar para preparar las formas más puras usadas en las composiciones farmacéuticas.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona a composición farmacéutica que comprende (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de la neuropatía de fibras pequeñas.

En una realización, la composición farmacéutica comprende uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. El vehículo, diluyente y/o excipiente deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la composición y no ser perjudiciales para el receptor.

Las composiciones farmacéuticas que contienen (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, como principio activo, se pueden preparar mezclando íntimamente el compuesto con un vehículo farmacéutico según las técnicas de composición farmacéutica convencionales. Estos

procedimientos pueden implicar mezclar, granular y comprimir o disolver los ingredientes según sea apropiado para la preparación deseada.

Los compuestos de la invención pueden administrarse en formas de dosificación convencionales preparadas combinando un compuesto de la invención con vehículos o diluyentes farmacéuticos convencionales según los procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica. Estos procedimientos pueden implicar mezclar, granular y comprimir o disolver los ingredientes según sea apropiado para la preparación deseada.

Los compuestos o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden administrarse por cualquier método conveniente, por ejemplo, por administración oral, parenteral, bucal, sublingual, nasal, rectal o transdérmica, y las composiciones farmacéuticas se adaptan en consecuencia, para su administración a mamíferos, incluidos seres humanos.

Los compuestos o sus sales farmacéuticamente aceptables que son activos cuando se administran por vía oral pueden formularse como líquidos o sólidos, por ejemplo, como jarabes, suspensiones, emulsiones, comprimidos, cápsulas o pastillas.

Las formulaciones tópicas de la presente invención pueden presentarse como, por ejemplo, ungüentos, cremas o lociones, ungüentos para los ojos y gotas para los ojos o los oídos, vendajes impregnados y aerosoles, y pueden contener aditivos convencionales apropiados tales como conservantes, disolventes, para ayudar a la penetración del fármaco y emolientes en ungüentos y cremas.

Las formulaciones también pueden contener vehículos convencionales compatibles, tales como bases en cremas o pomada y etanol o alcohol oleílico para lociones. Dichos vehículos pueden estar presentes desde aproximadamente el 1 % hasta aproximadamente el 98 % de la formulación. Más usualmente formarán hasta aproximadamente el 80 % de la formulación.

Una formulación líquida generalmente consistirá en una suspensión o solución del principio activo en un vehículo líquido adecuado, por ejemplo, un disolvente acuoso tal como agua, etanol o glicerina, o un disolvente no acuoso, tal como polietilenglicol o un aceite. La formulación también puede contener un agente de suspensión, conservante, saporífero y/o colorante.

Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden estar en forma de presentación de dosis unitaria, y pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para comprimidos, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; desintegrantes, por ejemplo, almidón de patata; o agentes humectantes aceptables, tales como lauril sulfato sódico. Los comprimidos pueden recubrirse según los métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal. Las preparaciones orales líquidas pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, por ejemplo, sorbitol, metil celulosa, jarabe de glucosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas, agentes emulsionantes, por ejemplo, lecitina, monooleato de sorbitán, o acacia; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos tales como glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo, p hidroxibenzoato de metilo o propilo, o ácido sórbico y, si se desea, agentes saporíferos o colorantes convencionales.

Las composiciones parenterales típicas consisten en una solución o suspensión del principio activo en un vehículo estéril, prefiriéndose el agua, o un aceite parenteralmente aceptable, por ejemplo, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, lecitina, aceite de cacahuete o aceite de sésamo. Como alternativa, la solución puede liofilizarse y después reconstituirse con un disolvente adecuado justo antes de la administración. El compuesto, dependiendo del vehículo y la concentración utilizada, puede suspenderse o disolverse en el vehículo. En la preparación de soluciones, el compuesto puede disolverse en agua para inyección y esterilizarse por filtración antes de rellenar un vial o ampolla adecuado y sellar.

Ventajosamente, agentes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes tamponantes pueden disolverse en el vehículo. Para mejorar la estabilidad, la composición se puede congelar después de rellenar el vial y el agua se elimina al vacío. El polvo liofilizado seco se sella entonces en el vial y se puede suministrar un vial adjunto de agua para inyección para reconstituir el líquido antes del uso. Las suspensiones parenterales se preparan sustancialmente de la misma manera, excepto que el compuesto se suspende en el vehículo en lugar de disolverse y la esterilización no se puede lograr por filtración. El compuesto se puede esterilizar por exposición a óxido de etileno antes de la suspensión en el vehículo estéril. Ventajosamente, se incluye un agente tensioactivo o humectante en la composición

para facilitar la distribución uniforme del compuesto.

Las composiciones para administración nasal pueden formularse convenientemente como aerosoles, gotas, geles y polvos. Las formulaciones de aerosol comprenden típicamente una solución o suspensión fina del principio activo en un disolvente acuoso o no acuoso farmacéuticamente aceptable y usualmente se presentan en cantidades simples o multidosas en forma estéril en un recipiente sellado que puede adoptar la forma de un cartucho o relleno para su uso con un dispositivo de atomización. Como alternativa, el recipiente sellado puede ser un dispositivo dispensador desechable tal como un inhalador nasal de dosis única o un dispensador de aerosol equipado con una válvula dosificadora. Cuando la forma de dosificación comprende un dispensador de aerosol, contendrá un propulsor que puede ser un gas comprimido, por ejemplo, aire, o un propulsor orgánico tal como fluoro-cloro-hidro-carbono o hidrofluorocarbono. Las formas de dosificación de aerosol también pueden tomar la forma de atomizadores de bomba.

Las composiciones adecuadas para la administración bucal o sublingual incluyen comprimidos, pastillas masticables y pastillas donde el principio activo se formula con un vehículo tal como azúcar y acacia, tragacanto, o gelatina y glicerina. Las composiciones para administración rectal están convenientemente en forma de supositorios que contienen una base de supositorio convencional tal como manteca de cacao. Las composiciones adecuadas para administración transdérmica incluyen pomadas, geles y parches.

En una realización, la composición está en forma de dosis unitaria tal como un comprimido, cápsula o ampolla.

La dosis del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, utilizada en el tratamiento de los trastornos o enfermedades mencionados anteriormente, variará de la manera habitual con el trastorno o enfermedad particular que se está tratando, el peso del sujeto y otros factores similares. Sin embargo, como regla general, las dosis unitarias adecuadas pueden contener del 0,1 % al 100 % en peso, por ejemplo, del 10 al 60 % en peso, del material activo, dependiendo del método de administración. La composición puede contener del 0 % al 99 % en peso, por ejemplo, del 40 % al 90 % en peso, del vehículo, dependiendo del método de administración. La composición puede contener de 0,05 mg a 1000 mg, por ejemplo, de 1,0 mg a 500 mg, del material activo, dependiendo del método de administración. La composición puede contener de 50 mg a 1000 mg, por ejemplo, de 100 mg a 400 mg del vehículo, dependiendo del método de administración. La dosis del compuesto utilizado en el tratamiento de los trastornos mencionados anteriormente variará de la forma habitual con la gravedad de los trastornos, el peso del paciente y otros factores similares. Sin embargo, como una guía general, las dosis unitarias adecuadas pueden estar en el intervalo de 50 mg a 1500 mg al día, por ejemplo, de 120 mg a 1000 mg al día. Dicha terapia puede extenderse durante varias semanas o meses.

Un experto en la materia reconocerá que la cantidad y el espaciado óptimos de las dosis individuales de (5R)-5-(4-(((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, se determinará por la naturaleza y el alcance de la afección que se está tratando, la forma, la ruta y el sitio de administración, y el mamífero particular que se está tratando, y que dichos óptimos pueden determinarse mediante técnicas convencionales. Además, los factores asociados con el paciente en particular que se está tratando, incluyendo la edad del paciente, el peso, la dieta y el tiempo de administración, tendrán como resultado la necesidad de ajustar las dosis. También se apreciará por un experto en la materia que el transcurso óptimo de tratamiento, es decir, el número de dosis de un compuesto de la invención administradas al día durante un número definido de días puede determinarse por los expertos en la materia usando el transcurso convencional de las pruebas de determinación de tratamiento.

45 **Diagnóstico**

También se describe un método para diagnosticar la neuropatía de fibras pequeñas en un sujeto humano donde dicho método comprende detectar la presencia de una o más variaciones genéticas en el gen *CACNA1A* y/o el gen *CACNA1B* de dicho sujeto.

En esta invención, cuando se habla del "gen *CACNA1A*" se hace referencia al gen de la subunidad alfa 1A del canal de calcio, dependiente de voltaje, de tipo P/Q (también conocido como Cav2.1). El gen *CACNA1A* pertenece a una familia de genes que codifican las subunidades alfa formadoras de poros de los canales de calcio. Estos canales, que transportan átomos de calcio cargados positivamente (iones de calcio) a través de las membranas celulares, desempeñan un papel clave en la capacidad de una célula para generar y transmitir señales eléctricas. Los iones de calcio participan en muchas funciones celulares diferentes, incluida la comunicación de célula a célula, la tensión de las fibras musculares (contracción muscular), y la regulación de ciertos genes.

El gen *CACNA1A* proporciona instrucciones para hacer una parte (la subunidad alfa-1) de un canal de calcio llamado Cav2.1. Esta subunidad forma el orificio (poro) a través del cual pueden fluir los iones de calcio. Los canales Cav2.1 desempeñan un papel esencial en la comunicación entre las células nerviosas (neuronas) en el cerebro y la médula

espinal. Estos canales ayudan a controlar la liberación de neurotransmisores, que son sustancias químicas que transmiten señales de una neurona a otra. Se cree que los canales Cav2.1 también están involucrados en la supervivencia de las neuronas y la capacidad de estas células para cambiar y adaptarse con el tiempo (plasticidad).

- 5 Cerca de un extremo del gen *CACNA1A*, un segmento de tres componentes básicos de ADN (nucleótidos) se repite varias veces. Esta secuencia, que se escribe como CAG, se denomina triplete o repetición de trinucleótido. En la mayoría de las personas, el número de repeticiones de CAG en este gen varía de 4 a 18.

10 El gen *CACNA1A* está ubicado en el brazo corto (p) del cromosoma 19 en la posición 13 (19p13). Más precisamente, la ubicación molecular del gen *CACNA1A* está en el cromosoma 19: pares de bases 13.206.441 a 13.506.459.

El *CACNA1A* se ha relacionado previamente con ataxia episódica, migraña hemipléjica familiar, ataxia espinocerebelosa tipo 6 y migraña hemipléjica esporádica.

- 15 En esta invención, cuando se habla del "gen *CACNA1B*" se hace referencia al gen de la subunidad alfa 1B del canal de calcio, dependiente de voltaje, de tipo N (también conocido como Cav2.2). La proteína codificada por este gen es la subunidad formadora de poros de un canal de calcio dependiente del voltaje de tipo N, que controla la liberación de neurotransmisores de las neuronas. La proteína codificada forma un complejo con subunidades alfa-2, beta y delta para formar el canal activado de alto voltaje. Este canal es sensible a omega-conotoxina-GVIA y omega-agatoxina-
20 IIIA pero insensible a las dihidropiridinas. Se han encontrado dos variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas para este gen.

El gen *CACNA1B* está ubicado en el brazo largo (q) del cromosoma 9 en la posición 34 (9q34). Más precisamente, la ubicación molecular del gen *CACNA1B* está en el cromosoma 9: pares de bases 140.772.241 a 141.019.076.

- 25 Las enfermedades asociadas con *CACNA1B* incluyen carcinoma de krukemberg y la corea fibrilar de Morvan, y entre sus supervías relacionadas se encuentran la vía de la vesícula sináptica y el arrastre circadiano.

- En esta invención, cuando se habla de "variación genética" se hace referencia a una diferencia o variación entre el
30 código genético o la secuencia de un sujeto humano cuando se compara con un código o secuencia genética de tipo silvestre o nativa. Se apreciará que las variaciones genéticas incluyen cualquier variación en el código genético de tipo silvestre o nativo del genoma de dicho sujeto humano bajo análisis. Los ejemplos de dichas variaciones genéticas incluyen: mutaciones (por ejemplo, mutaciones puntuales), inserciones, sustituciones, deleciones, cambios de marco, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), haplotipos, anomalías cromosómicas, variación del número de copias
35 (CNV), epigenética e inversiones de ADN. En una realización, las variaciones genéticas se seleccionan entre sustituciones, inserciones, eliminaciones y cambios de marco.

- En esta invención, cuando se usa el término "polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)" se pretende hacer referencia a la variación de la secuencia de ADN que se produce cuando un solo nucleótido en el genoma (u otra secuencia
40 compartida) difiere entre los miembros de una especie o entre los cromosomas emparejados en un individuo.

- En esta invención, cuando se usa el término "haplotipo" se pretende hacer referencia a un conjunto de marcadores genéticos que se heredan juntos como consecuencia de su colocación cromosómica. El haplotipo puede referirse a tan solo dos variantes genéticas o a un cromosoma completo, dependiendo del número de eventos de recombinación
45 que hayan ocurrido entre un conjunto dado de variantes.

- En una realización, las variaciones genéticas se detectan dentro del gen *CACNA1A*. En una realización adicional, las variaciones genéticas están dentro del gen *CACNA1A* y son entre 13.300.000 pb y 13.450.000 pb en el cromosoma 19, tal como entre 13.318.000 pb y 13.412.000 pb en el cromosoma 19.

- 50 Los métodos de diagnóstico pueden usarse para detectar variaciones genéticas utilizando una muestra biológica obtenida del sujeto humano. Por lo tanto, en una realización, el método comprende inicialmente la etapa de obtener una muestra biológica del sujeto humano.

- 55 El ácido nucleico puede aislarse de la muestra según cualquiera de los métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen muestras de tejido o cualquier biomaterial que contenga células o un material celular (es decir, una muestra de fluido corporal o de cabello). Las muestras biológicas se pueden obtener mediante procedimientos estándar y se pueden usar inmediatamente o almacenarse, en condiciones adecuadas para el tipo de muestra biológica, para su uso posterior.

- 60 Los métodos para obtener muestras biológicas se conocen bien por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, aspiraciones, secciones tisulares, extracción de sangre u otros fluidos, biopsias quirúrgicas o con agujas y

similares. Los ejemplos de muestras biológicas adecuadas incluyen: sangre entera, suero sanguíneo, plasma, orina, saliva u otro líquido corporal (heces, líquido lacrimógeno, líquido sinovial, esputo), cabello, líquido cefalorraquídeo (LCR), o un extracto o purificación de los mismos, o una dilución de los mismos. Las muestras biológicas también incluyen homogeneizados de tejido, cortes de tejido y muestras de biopsia de un sujeto vivo. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, cuando sea apropiado diluirse o concentrarse, y almacenarse de la manera habitual. En una realización, la muestra biológica es sangre o suero. En una realización adicional, la muestra biológica es sangre.

Si es necesario, la muestra se puede recoger o concentrar por centrifugación y similares. Las células de la muestra pueden someterse a lisis, tal como mediante tratamientos con enzimas, calor, tensioactivos, ultrasonidos o una combinación de los mismos. El tratamiento de lisis se realiza para obtener una cantidad suficiente de ácido nucleico derivado de las células del sujeto humano para detectar el uso de la reacción en cadena de la polimerasa.

Los métodos de preparación de plasma y suero son bien conocidos en la técnica. Se puede usar plasma o suero sanguíneo “fresco”, o plasma o suero congelado (almacenado) y posteriormente descongelado. El plasma o suero congelado (almacenado) se deben mantener de manera óptima en condiciones de almacenamiento de -20 a -70 °C hasta que se descongelan y se usan. El plasma o suero “frescos” deben refrigerarse o mantenerse en hielo hasta que se usen, y la extracción del ácido nucleico (por ejemplo, ARN, ADN o ácido nucleico total) se realiza lo antes posible. A continuación se describen métodos ejemplares.

La sangre se puede extraer mediante métodos estándar en un tubo de recolección, típicamente vidrio siliconado, ya sea sin anticoagulante para la preparación de suero, o con EDTA, citrato de sodio, heparina o anticoagulantes similares para la preparación de plasma. Si se prepara plasma o suero para el almacenamiento, aunque no es un requisito absoluto, el plasma o el suero se fracciona primero de la sangre total antes de congelarlo. Esto reduce la carga de ARN intracelular extraño liberado de la lisis de células congeladas y descongeladas que podría reducir la sensibilidad del ensayo de amplificación o interferir con el ensayo de amplificación a través de la liberación de inhibidores a la PCR, tales como porfirinas y hematina. El plasma o suero “fresco” se puede fraccionar de la sangre entera mediante centrifugación, usando una centrifugación suave a 300-800 veces la gravedad durante cinco a diez minutos, o fraccionarse por otros métodos estándar. Se deben evitar las altas tasas de centrifugación capaces de fraccionar los cuerpos apoptóticos.

Se apreciará que la etapa de detectar una o más variaciones genéticas dentro de las regiones definidas en la presente invención comprenderá cualquier técnica adecuada para el análisis genético.

El volumen de plasma o suero utilizado en la extracción puede variar, pero usualmente son suficientes volúmenes de 1 a 100 ml de plasma o suero.

Diversos métodos de extracción son adecuados para aislar el ácido nucleico. Los métodos adecuados incluyen la extracción con fenol y cloroformo. Véase Maniatis y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d, Cold Spring Harbor Laboratory Press, página 16.54 (1989).

Numerosos kits comerciales también producen ADN y ARN adecuados incluyendo, pero sin limitación, el kit QIAamp™ mini blood, Agencourt Genfind™, Roche Cobas® Roche MagNA Pure® o fenol: extracción de cloroformo usando Eppendorf Phase Lock Gels®, y el kit de extracción NucliSens (Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francia). En otros métodos, el ARNm se puede extraer de muestras de sangre/médula ósea utilizando el kit HS de ARNm MagNA Pure LC y el instrumento Mag NA Pure LC (Roche Diagnostics Corporation, Roche Applied Science, Indianapolis, IN).

El ácido nucleico extraído de tejidos, células, plasma, suero o cabello puede amplificarse utilizando técnicas de amplificación de ácido nucleico bien conocidas en la técnica. Muchos de estos métodos de amplificación también se pueden usar para detectar la presencia de variaciones genéticas simplemente diseñando cebadores o sondas oligonucleotídicas para interactuar o hibridar con una secuencia diana particular de una manera específica. A modo de ejemplo, pero no a modo de limitación, estas técnicas pueden incluir la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), la PCR anidada, la reacción en cadena de la ligasa. Véanse Abravaya, K., y col., *Nucleic Acids Research*, 23:675-682, (1995), amplificación de señal de ADN ramificada, Urdea, M. S., y col., *AIDS*, 7 (Suplemento 2):S11-S 14, (1993), indicadores de ARN amplificable, replicación Q-beta, amplificación basada en transcripción, amplificación de ADN boomerang, activación de desplazamiento de cadena, tecnología de sonda de ciclado, amplificación basada en secuencia de ácido nucleico isotérmica (NASBA). Véase Kievits, T. y col., *J Virological Methods*, 35:273-286, (1991), *Invader Technology*, u otros ensayos de replicación de secuencias o ensayos de amplificación de señales. Estos métodos de amplificación se describen cada uno brevemente a continuación y se conocen bien en la técnica.

Algunos métodos emplean la transcripción inversa de ARN a ADNc. Se pueden usar varias transcriptasas inversas, incluyendo, pero sin limitación, MMLV RT, mutantes de RNasa H de MMLV RT, tales como Superscript y Superscript

II (Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, Md.), AMV RT, y transcriptasa inversa termoestable de *Thermus Thermophilus*. Por ejemplo, un método, pero no el único, que se puede usar para convertir el ARN extraído de plasma o suero en ADNc es el protocolo adaptado del sistema de preamplificación Superscript II (Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, Md.; catálogo No. 18089-011), como se describe por Rashtchian, A., PCR Methods Applic, 4: S83-S91, (1994).

Una diversidad de enzimas de amplificación se conoce bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa, Q-beta replicasa, ADN y ARN polimerasas termoestables. Debido a que estas y otras reacciones de amplificación son catalizadas por enzimas, en un ensayo de una sola etapa, los reactivos liberadores de ácido nucleico y los reactivos de detección no deben ser inhibidores potenciales de las enzimas de amplificación si la detección definitiva debe basarse en la amplificación. Los métodos de amplificación adecuados para su uso con los presentes métodos incluyen, por ejemplo, amplificación por desplazamiento de cadena, amplificación de círculo rodante, preamplificación de extensión de cebador, o PCR de oligonucleótido degenerado (DOP).

En una realización, la PCR se utiliza para amplificar una secuencia de interés o marcador de interés. El experto en la materia es capaz de diseñar y preparar cebadores que sean apropiados para amplificar una secuencia diana. La longitud de los cebadores de amplificación depende de varios factores, incluida la identidad de la secuencia de nucleótidos y la temperatura a la que estos ácidos nucleicos se hibridan o se utilizan durante la amplificación in vitro de ácidos nucleicos. Las consideraciones necesarias para determinar una longitud preferida para un cebador de amplificación de una identidad de secuencia particular se conocen bien por el experto en la materia. Por ejemplo, la longitud de un ácido nucleico u oligonucleótido corto puede relacionarse con su especificidad o selectividad de hibridación.

Para analizar SNP y otras variantes de ácidos nucleicos, puede ser apropiado usar oligonucleótidos específicos para alelos alternativos. Dichos oligonucleótidos que detectan variaciones de un solo nucleótido en secuencias diana pueden denominarse por términos como "sondas específicas de alelo" o "cebadores específicos de alelo". El diseño y el uso de sondas específicas de alelo para analizar polimorfismos se describen, por ejemplo, en Mutation Detection A Practical Approach, ed. Cotton y col. Oxford University Press, 1998; Saiki y col., Nature, 324: 163-166 (1986); Dattagupta, EP235.726; y Saiki, documento WO 89/11548. En una realización, una sonda o cebador puede diseñarse para hibridarse con un segmento de ADN diana de manera que el SNP se alinee con el extremo más 5' o el extremo más 3' de la sonda o cebador.

En algunas realizaciones, la amplificación puede incluir un cebador marcado, permitiendo así la detección del producto de amplificación de ese cebador. En realizaciones particulares, la amplificación puede incluir una multiplicidad de cebadores marcados; típicamente, dichos cebadores están marcados de manera distintiva, lo que permite la detección simultánea de múltiples productos de amplificación.

En un tipo de ensayo basado en PCR, un cebador específico de alelo se hibrida a una región en una molécula de ácido nucleico diana que se superpone a una posición de SNP y solo ceba la amplificación de una forma alélica a la que el cebador muestra una complementariedad perfecta (Gibbs, 1989, Nucleic Acid Res., 17:2427-2448). Típicamente, el nucleótido más 3' del cebador está alineado con y es complementario a la posición de SNP de la molécula de ácido nucleico diana. Este cebador se utiliza junto con un segundo cebador que se hibrida en un sitio distal. La amplificación procede de los dos cebadores, produciendo un producto detectable que indica qué forma alélica está presente en la muestra de prueba. Un control se realiza usualmente con un segundo par de cebadores, uno de los cuales muestra un único emparejamiento incorrecto de bases en el sitio polimórfico y el otro de los cuales presenta una complementariedad perfecta con un sitio distal. El emparejamiento incorrecto de una sola base evita la amplificación o reduce sustancialmente la eficiencia de la amplificación, de manera que no se forme ningún producto detectable o se forme en cantidades inferiores o a un ritmo más lento. El método generalmente funciona de manera más efectiva cuando el emparejamiento incorrecto está en la posición más 3' del oligonucleótido (es decir, la posición más 3' del oligonucleótido se alinea con la posición de SNP diana) porque esta posición es la más desestabilizadora con respecto al alargamiento del cebador (véase, por ejemplo, el documento WO 93/22456).

En una realización específica, un cebador contiene una secuencia sustancialmente complementaria a un segmento de una molécula de ácido nucleico que contiene SNP diana, excepto que el cebador tiene un nucleótido de emparejado incorrecto en una de las tres posiciones de nucleótidos en el extremo más 3' del cebador, de modo que el nucleótido de emparejamiento incorrecto no se empareje en bases con un alelo particular en el sitio de SNP. En una realización, el nucleótido de emparejamiento incorrecto en el cebador es el segundo desde el último nucleótido en la posición más 3' del cebador. En otra realización, el nucleótido de emparejamiento incorrecto en el cebador es el último nucleótido en la posición más 3' del cebador.

En una realización, el cebador o la sonda se marca con un tinte indicador fluorogénico que emite una señal detectable. Si bien un tinte indicador adecuado es un tinte fluorescente, cualquier tinte indicador que pueda unirse a un reactivo

de detección, tal como una sonda o cebador de oligonucleótidos, es adecuado para su uso en la invención. Dichos tintes incluyen, pero sin limitación, acridina, AMCA, BODIPY, Cascade Blue, Cy2, Cy3, Cy5, Cy7, Dabcyl, Edans, Eosina, Eritrosina, Fluoresceína, 6-Fam, Tet, Joe, Hex, Oregon Green, Rodamina, verde Rodol, Tamra, Rox, y rojo Texas.

5

También se describen reactivos que no contienen (o que son complementarios a) un nucleótido de SNP identificado en la presente invención pero que se usan para ensayar uno o más SNP descritos en la presente invención. Por ejemplo, los cebadores que flanquean, pero no hibridan directamente con una posición de SNP diana proporcionada en la presente invención, son útiles en las reacciones de extensión de cebadores donde los cebadores hibridan con una región adyacente a la posición de SNP diana (es decir, dentro de uno o más nucleótidos del sitio de SNP diana). Durante la reacción de extensión del cebador, un cebador típicamente no puede extenderse más allá de un sitio de SNP diana si un nucleótido particular (alelo) está presente en ese sitio de SNP diana, y el producto de extensión del cebador puede detectarse fácilmente para determinar qué alelo de SNP está presente en el sitio de SNP diana. Por ejemplo, los ddNTP particulares se usan típicamente en la reacción de extensión del cebador para terminar la extensión del cebador una vez que se incorpora un ddNTP en el producto de extensión. Por lo tanto, también se describen reactivos que se unen a una molécula de ácido nucleico en una región adyacente a un sitio de SNP, aunque las secuencias unidas no incluyen necesariamente el sitio de SNP en sí.

Los ácidos nucleicos variantes pueden amplificarse antes de la detección o pueden detectarse directamente durante una etapa de amplificación (es decir, métodos "en tiempo real"). En algunas realizaciones, la secuencia diana se amplifica y el amplicón resultante se detecta por electroforesis. En algunas realizaciones, la mutación o variante específica se detecta mediante la secuenciación del ácido nucleico amplificado. En algunas realizaciones, la secuencia diana se amplifica utilizando un cebador marcado de manera que el amplicón resultante se marque de manera detectable. En algunas realizaciones, el cebador está marcado por fluorescencia.

25

En una realización, la detección de una variante de ácido nucleico, tal como SNP, se realiza utilizando el ensayo TaqMan®, que también se conoce como el ensayo de nucleasa 5' (Patente de los EE. UU. No. 5.210.015 y 5.538.848) o una sonda de baliza molecular (Patente de los EE.UU. No. 5.118.801 y 5.312.728), u otra sonda de baliza sin tallo o lineal (Livak y col., 1995, PCR Method Appl., 4:357-362; Tyagi y col., 1996, Nature Biotechnology, 14:303-308; Nazarenko y col., 1997, Nucl. Acids Res., 25:2516-2521; Patente de los EE.UU. No. 5.866.336 y 6.117.635). El ensayo TaqMan® detecta la acumulación de un producto amplificado específico durante la PCR. El ensayo TaqMan® utiliza una sonda oligonucleotídica marcada con un tinte indicador fluorescente y un tinte inactivador. El tinte indicador se excita mediante la irradiación a una longitud de onda apropiada, transfiere energía al tinte inactivador en la misma sonda a través de un procedimiento llamado transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Cuando se fija a la sonda, el tinte indicador excitado no emite una señal. La proximidad del tinte inactivador al tinte indicador en la sonda intacta mantiene una fluorescencia reducida para el indicador. El tinte indicador y el tinte inactivador pueden estar en los extremos más 5' y los extremos más 3', respectivamente o viceversa. Como alternativa, el tinte indicador puede estar en el extremo más 5' o 3' mientras que el tinte inactivador está unido a un nucleótido interno, o viceversa. En otra realización más, tanto el indicador como el inactivador pueden unirse a nucleótidos internos a una distancia entre sí de tal manera que se reduzca la fluorescencia del indicador.

Durante la PCR, la actividad nucleasa 5' de la ADN polimerasa escinde la sonda, separando así el tinte indicador y el tinte inactivador y dando como resultado un aumento de la fluorescencia del indicador. La acumulación de producto de PCR se detecta directamente monitorizando el aumento de la fluorescencia del tinte indicador. La ADN polimerasa escinde la sonda entre el tinte indicador y el tinte inactivador solo si la sonda hibrida con la plantilla que contiene SNP diana que se amplifica durante la PCR, y la sonda está diseñada para hibridar con el sitio de SNP diana solo si un alelo de SNP particular está presente.

Las secuencias de cebadores y sondas TaqMan® se pueden determinar fácilmente utilizando la variante y la información de secuencia de ácido nucleico asociada que se proporciona en la presente invención. Se pueden usar varios programas informáticos, tales como Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, California) para obtener rápidamente conjuntos óptimos de cebadores/sondas. Será evidente para un experto en la materia que dichos cebadores y sondas para detectar las variaciones genéticas son útiles en el diagnóstico de la neuropatía de fibras prequeñas, y pueden incorporarse fácilmente en un formato de kit. El método de diagnóstico también incluye modificaciones del ensayo TaqMan® bien conocido en la técnica, tal como el uso de sondas de baliza molecular (Patente de los EE. UU. No. 5.118.801 y 5.312.728) y otros formatos de variante (Patente de los EE.UU. No. 5.866.336 y 6.117.635).

Se pueden usar otros métodos de hibridación de sonda detectados en tiempo real para detectar la amplificación de una diana o secuencia de marcador que flanquea una región de repetición en tándem. Por ejemplo, se pueden usar las sondas MGB Eclipse™ disponibles comercialmente (Epoch Biosciences), que no se basan en una degradación de la sonda. Las sondas MGB Eclipse™ funcionan mediante un mecanismo de fluorescencia activado por hibridación.

Las sondas MGB Eclipse™ tienen el inactivador oscuro Eclipse™ y el MGB posicionados en el extremo 5' de la sonda. El fluoróforo se encuentra en el extremo 3' de la sonda. Cuando la sonda está en solución y no está hibridada, la conformación tridimensional pone el inactivador en estrecha proximidad del fluoróforo, y la fluorescencia se inactiva. Sin embargo, cuando la sonda se hibrida a una diana o secuencia marcadora, la sonda se despliega, el inactivador se

5 mueve del fluoróforo, y se puede detectar la fluorescencia resultante.

Se pueden diseñar sondas oligonucleotídicas que tienen entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud e hibridan con la región amplificada. Las sondas de oligonucleótidos tienen preferiblemente de 12 a 70 nucleótidos; más preferiblemente 15-60 nucleótidos de longitud; y mucho más preferiblemente 15-25

10 nucleótidos de longitud. La sonda puede estar etiquetada. Los fragmentos amplificados se pueden detectar utilizando métodos estándar de electroforesis en gel. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, las fracciones amplificadas se separan en un gel de agarosa y se tiñen con bromuro de etidio por métodos conocidos en la técnica para detectar fragmentos amplificados.

15 Otra metodología de detección adecuada incluye el diseño y el uso de combinaciones de cebador/sonda bipartitas tales como sondas Scorpion™. Estas sondas realizan un cebado específico de secuencia y la detección del producto de PCR se logra utilizando una sola molécula. Las sondas Scorpion™ comprenden un cebador 3' con una cola de sonda extendida 5' que comprende una estructura de horquilla que posee un par de fluoróforo/inactivador. La cola de la sonda está "protegida" de la replicación en la dirección 5' a 3' mediante la inclusión de hexetilenglicol (HEG) que

20 impide que la polimerasa replique la sonda. El fluoróforo está unido al extremo 5' y se detiene por un resto acoplado al extremo 3'. Después de la extensión del cebador Scorpion™, la secuencia de sonda específica es capaz de unirse a su complemento dentro del amplicón extendido, abriendo así el bucle en horquilla. Esto evita que la fluorescencia se inactive y se observa una señal. Una diana específica se amplifica por el cebador inverso y la porción de cebador del Scorpion™, lo que da como resultado un producto de extensión. Se genera una señal fluorescente debido a la

25 separación del fluoróforo del inactivador resultante de la unión del elemento de sonda del Scorpion™ al producto de extensión. Dichas sondas se describen en Whitcombe y col., Nature Biotech 17: 804-807 (1999).

También se describe un kit para diagnosticar la neuropatía de fibras pequeñas que comprende instrucciones para usar dicho kit según los métodos definidos en la presente invención.

30 Los kits se pueden preparar para poner en práctica los métodos descritos en la presente invención. Típicamente, los kits incluyen al menos un componente o una combinación empaquetada de componentes. Típicamente, los kits incluyen al menos una sonda específica para la una o más regiones definidas en el presente en al menos un recipiente. Estos componentes pueden incluir, entre otros, sondas de ácido nucleico, cebadores de ácido nucleico para la

35 amplificación de una o más regiones definidas en la presente invención, tampones, instrucciones de uso, y similares.

Se apreciará que una vez que se haya identificado a un individuo con probabilidad de padecer de neuropatía de fibras pequeñas, a dicho individuo se le prescribirá un tratamiento adecuado, tal como (5R)-5-(4-(((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

40 Por lo tanto, según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto para su uso en un método para tratar la neuropatía de fibras pequeñas en un sujeto humano donde dicho método comprende:

45 (a) detectar la presencia de una o más variaciones genéticas dentro del gen *CACNA1A* y/o el gen *CACNA1B* de dicho sujeto; y

(b) administrar (5R)-5-(4-(((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, a dicho paciente identificado como que tiene dicha una o más variaciones genéticas.

50 Como se analiza anteriormente en la presente invención, el tratamiento actual para la neuropatía de fibras pequeñas se asocia con una baja tolerabilidad y da como resultado un control del dolor subóptimo. Por lo tanto, existe una gran necesidad de identificar a los individuos con mayor probabilidad de responder a dicha terapia.

También se describe un método para predecir si un paciente con neuropatía de fibras pequeñas responderá al

55 tratamiento con (5R)-5-(4-(((2-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-L-prolinamida, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de la misma, donde dicho método comprende las etapas de:

(a) obtener una muestra biológica de un paciente; y

60 (b) detectar la presencia de una o más variaciones genéticas dentro del gen *CACNA1A* y/o el gen *CACNA1B* de dicho sujeto;

de tal manera que la presencia de una o más de dichas variaciones genéticas es indicativa de que un paciente con una neuropatía de fibras pequeñas responderá al tratamiento con (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de la misma.

- 5 Se apreciará que una vez que se haya identificado un "respondedor", al paciente se le administrará adecuadamente (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de la misma.

Así, en una realización, el método comprende adicionalmente:

10

(c) administrar (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de la misma, a dicho paciente con una neuropatía de fibras pequeñas identificado como que tiene una o más variaciones genéticas.

- 15 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de la neuropatía de fibras pequeñas en un paciente, caracterizada por que dicho paciente se ha seleccionado por tener una o más variaciones genéticas dentro del gen *CACNA1A* y/o el gen *CACNA1B*.

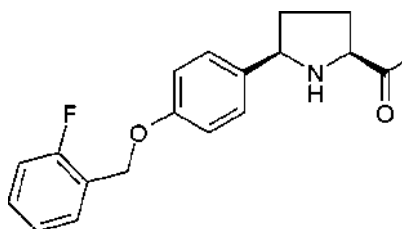
- 20 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto para su uso en un método para tratar la neuropatía de fibras pequeñas en un paciente donde dicho método comprende las etapas de seleccionar un paciente que tenga una o más variaciones genéticas dentro del gen *CACNA1A* y/o el gen *CACNA1B* seguido de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, a dicho paciente.

25

EJEMPLOS

La invención se ilustra mediante los Ejemplos que se describen a continuación:

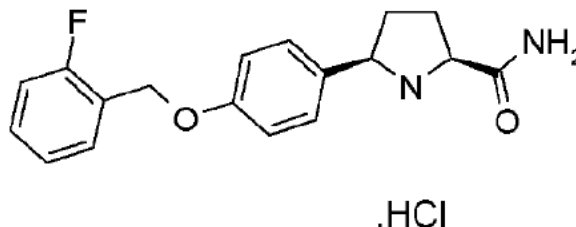
- 30 **Ejemplo 1: (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida (E1)**



- El compuesto del Ejemplo 1 puede prepararse como se describe en el Ejemplo 1, Procedimientos 1 y 2 del documento WO 2007/042239.

35

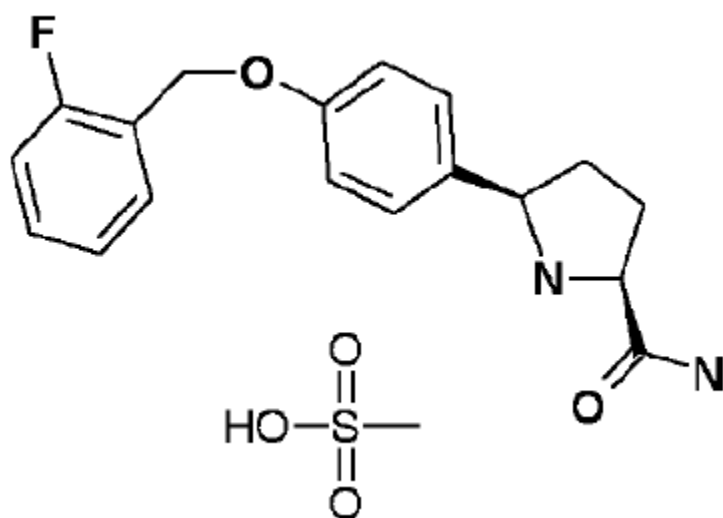
- Ejemplo 2: Clorhidrato de (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida (E2)**



40

El compuesto del Ejemplo 2 puede prepararse como se describe en el Ejemplo 2, Procedimientos 1 a 5 del documento WO 2007/042239.

- Ejemplo 3: Metanosulfonato de (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida (E3)**



El compuesto del Ejemplo 3 puede prepararse como se describe en el Ejemplo 6 del documento WO 2007/042239.

REIVINDICACIONES

1. (5R)-5-(4-((2-fluorofenil)metil]oxi}fenil)-L-prolinamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de la neuropatía de fibras pequeñas.
- 5 2. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, donde la (5R)-5-(4-((2-fluorofenil)metil]oxi}fenil)-L-prolinamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, es clorhidrato de (5R)-5-(4-((2-fluorofenil)metil]oxi}fenil)-L-prolinamida.
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende (5R)-5-(4-((2-fluorofenil)metil]oxi}fenil)-L-prolinamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de la neuropatía de fibras pequeñas.
4. La composición para su uso según la reivindicación 3, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que comprende adicionalmente uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente
- 15 aceptables.
5. (5R)-5-(4-((2-fluorofenil)metil]oxi}fenil)-L-prolinamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de la neuropatía de fibras pequeñas en un paciente, caracterizada porque dicho paciente se ha seleccionado por tener una o más variaciones genéticas en el gen *CACNA1A* y/o el gen *CACNA1B*.
- 20 6. El compuesto o composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha neuropatía de fibras pequeñas es una neuropatía de fibras pequeñas primaria.
7. El compuesto o composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha
- 25 neuropatía de fibras pequeñas es una neuropatía de fibras pequeñas secundaria.