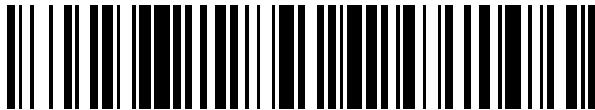


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 794 323**

(21) Número de solicitud: 201930436

(51) Int. Cl.:

A61K 31/47 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN

B2

(22) Fecha de presentación:

17.05.2019

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

17.11.2020

Fecha de concesión:

21.04.2021

(45) Fecha de publicación de la concesión:

28.04.2021

(73) Titular/es:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (77.0%)
Avda. Blasco Ibáñez, 13
46010 Valencia (Valencia) ES y
FUNDACIÓN INCLIVA (23.0%)

(72) Inventor/es:

ARTERO ALLEPUZ, Rubén;
KONIECZNY, Piotr Tadeusz;
LÓPEZ CASTEL, Arturo y
PÉREZ ALONSO, Manuel

(74) Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

(54) Título: **MOXIFLOXACINO PARA USO EN EL TRATAMIENTO DE LA ATROFIA MUSCULAR ESPINAL**

(57) Resumen:

Moxifloxacino para uso en el tratamiento de la atrofia muscular espinal.

Se describe moxifloxacino, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, así como una composición farmacéutica que lo comprende, para uso en la prevención y/o tratamiento de la atrofia muscular espinal (AME).

DESCRIPCIÓN**MOXIFLOXACINO PARA USO EN EL TRATAMIENTO DE LA ATROFIA MUSCULAR
ESPINAL****CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN**

- 5 La presente invención se refiere a moxifloxacino, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, así como a composiciones farmacéuticas que lo comprenden, para uso en la prevención y/o tratamiento de la atrofia muscular espinal.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 La atrofia muscular espinal (AME, OMIM #253300) es una enfermedad genética neuromuscular rara (con una ocurrencia de 1/6000 nacimientos) causada por la pérdida de α-motoneuronas de la médula espinal y del núcleo del tronco encefálico. Se han descrito cinco tipos clínicos de atrofia muscular espinal (0, 1, 2, 3 y 4) que van desde una ausencia completa de función motora y mortalidad infantil, a defectos menores que no reducen de manera 15 significativa la esperanza de vida. La atrofia muscular espinal está causada por mutaciones en el gen *SMN1* que codifica una proteína de 38 KDa expresada de manera muy generalizada en el citoplasma y en el núcleo.

El locus de *SMN* contiene una copia adicional, específica en humanos, denominada *SMN2*. Más del 98% de los pacientes de atrofia muscular espinal tienen una supresión, mutación u 20 otro tipo de cambio homocigótico en el gen *SMN1*, y todos los pacientes de atrofia muscular espinal portan, sin embargo, una o más copias del gen *SMN2* funcional. Los genes *SMN1* y *SMN2* son casi idénticos, con una diferencia en la región codificante de solo un nucleótido: un cambio de C- (citidina) a T- (timidina) en la posición +6 del exón 7 (Ex7) que provoca la exclusión del exón 7 en la mayoría de los transcritos de *SMN2* ($\Delta 7\text{ SMN2}$), dando lugar a un 25 *SMN* truncado en la parte C-terminal y la generación de proteína con menor estabilidad y actividad. Sin embargo, una pequeña fracción de los ARNm de *SMN2* incluye el exón 7 (FL-*SMN2*) lo que genera una proteína totalmente funcional. El cambio de nucleótido C a U se encuentra en una región potenciadora de *splicing* (término que se refiere al ayuste) exónico (*Exonic Splicing Enhancer region*, por sus siglas en inglés ESE), que en transcritos de *SMN1* 30 favorece un *splicing* normal del Ex7. Como consecuencia, el factor de *splicing* rico en serina SRSF1 (también conocido como SF2/ASF) no reconoce de manera efectiva su sitio de unión y no es capaz de eliminar el intrón 6. Además, la secuencia del ESE (CAGACAA) se transforma en un silenciador de *splicing* exónico (ESS) (UAGACAA) y se convierte en un sitio

de reconocimiento de ribonucleoproteínas heterólogas A1/A2 (hnRNP A1/A2). Estas proteínas son conocidas por inhibir el *splicing*, dado que operan en los ESSs y se unen a sitios UAGs. La reducción de los factores de inhibición del *splicing* restaura el patrón de *splicing* de *SMN1*, sugiriendo que existe una competición entre potenciadores y represores del *splicing* en los 5 lugares de regulación. Las proteínas SMN se encuentran dispersas en el citoplasma, pero en el núcleo se agregan en estructuras de tipo punto que se encuentran próximas a cuerpos de Cajal, y se denominan *gems*, que son agregados de la proteína SMN. Se cree que estos agregados de SMN nucleares tienen una función directa en la maduración de ribonucleoproteínas pequeñas (snRNP) y *splicing* del pre-ARNm. Se ha sugerido que SMN 10 juega una función en la formación de snRNPs en varios tipos celulares. Por tanto, la aparición de dichos agregados de proteína SMN está directamente relacionada con la existencia de niveles adecuados de dicha proteína.

La atrofia muscular espinal (AME) se ha descrito como una enfermedad curable con diferentes estrategias terapéuticas basadas en el aumento de los niveles de SMN, mediante la activación 15 de la transcripción de *SMN2* y/o buscando la potenciación de la inclusión del exón 7 en los transcriptos maduros, resultando en ambos casos en un aumento en la cantidad de proteína SMN. Particularmente relevante es la reciente comercialización del fármaco Spinraza (Nusinersen) por parte de la empresa Biogen, fármaco que consiste en un oligonucleótido antisentido modificado químicamente que favorece la inclusión del exón 7 de *SMN2*. Sin 20 embargo, Spinraza se administra mediante punción lumbar, lo cual es invasivo y no exento de riesgos, y los costes del fármaco oscilan los 400.000-600.000 euros por paciente y año. También es objeto de debate el grado de actividad de Nusinersen fuera del sistema nervioso central y sus consiguientes efectos secundarios.

Aunque la atrofia muscular espinal está considerada una enfermedad neuromotora, hay 25 evidencias de que no solo afecta a músculos sino también al cerebro, corazón, páncreas e incluso a los vasos sanguíneos. Hay también datos que muestran que el daño muscular aparece antes de la pérdida de motoneuronas, aunque este es un tema de discusión activa en la comunidad científica. Por tanto, la búsqueda de nuevos fármacos eficaces y con capacidad de distribuirse sistémicamente es una necesidad urgente en la búsqueda de 30 tratamientos contra la atrofia muscular espinal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a moxifloxacino, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, así como a una composición farmacéutica que lo comprende, para uso en el tratamiento de la atrofia muscular espinal.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Ensayo de toxicidad. Fibroblastos de la línea GM03813 (Coriell Cell Repository) fueron sembrados en placas de 96 pocillos con $1,0 \times 10^4$ células por pocillo y se incubaron 24 horas. Moxifloxacino fue añadido a varias concentraciones (1000 μM , 100 μM , 10 μM y 1 μM)

- 10 en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) completo y las células fueron incubadas 48 h. La viabilidad celular fue medida con la sal de tetrazolio MTS (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) que fue añadida en cada pocillo e incubada durante 4 h a 37°C en una cámara humedecida con 5% CO₂. La conversión de MTS en forma soluble, por células metabólicamente activas, fue medida por absorbancia a 490 nm.
 15 Se representa el % de inhibición de la viabilidad celular a cada una de las concentraciones de moxifloxacino ensayadas.

Figura 2. Cuantificación de niveles de proteína SMN en fibroblastos derivados de pacientes de atrofia muscular espinal, (2A) tratados con moxifloxacino a la concentración no tóxica máxima: 500 μM , durante 72 h. Los niveles de SMN se midieron por Western blot y los 20 resultados obtenidos se compararon a los de una muestra tratada con disolvente dimetilsolfóxido (DMSO 0,5%, línea punteada). (2B) Imágenes representativas procesadas con ImageJ de los resultados obtenidos por Western blot. Los valores estadísticos fueron calculados usando el test de la t-Student's (*p<0,05, **p<0,01, ****p < 0,001).

Figure 3. Niveles de las isoformas SMN2 FL y $\Delta 7$ en fibroblastos de pacientes de atrofia muscular espinal tratados con moxifloxacino. Los fibroblastos fueron tratados con cuatro concentraciones diferentes durante 48 h. (3A) Análisis semicuantitativo del porcentaje de *splice-in* (PSI) en células tratadas con DMSO 0,5% comparadas a células tratadas con moxifloxacino 500, 375, 250 y 100 μM .(3B) Imágenes representativas procesadas con ImageJ de los resultados obtenidos mediante splicing en el gel de agarosa a 2 %. Los valores 30 estadísticos fueron calculados usando el test de la t-Student's (*p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001).

Figura 4. Imagen de microscopía confocal de agregados de SMN y Cuerpos de Cajal. Se trataron células HeLa con moxifloxacino 500 μM durante 72 h y se tiñeron doblemente las

células para SMN y Coilin. Los núcleos se tintaron con Hoechst 33258 diluido en un medio de montaje (1:10.000). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal LSM 800 (Zeiss).

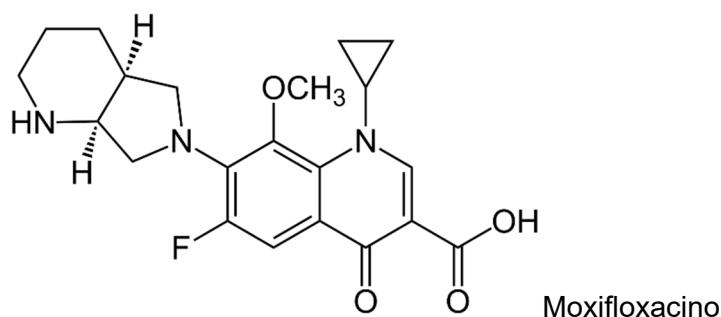
Figura 5. Co-localización de SMN y Cuerpos de Cajal (CB) en células HeLa después de ser

- 5 tratadas con moxifloxacino. (5A) Cuantificación de los agregados de SMN co-localizados con
Cuerpos de Cajal (CB) de al menos 100 células HeLa tratadas con moxifloxacino (500 µM)
durante 72 h. Los datos obtenidos se normalizaron con los de una muestra tratada con
disolvente a 0,5%. (5B) Cuantificación de la co-localización de la proteína SMN con Coilin
después de tratamiento con moxifloxacino a diferentes concentraciones (ordenadas). Los
10 resultados obtenidos se normalizaron con los de una muestra tratada con disolvente (DMSO).
Los valores estadísticos fueron calculados usando el test de la t-Student's (*p<0,05, ***p <
0,001).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

- 15 La presente invención se refiere a moxifloxacino (ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-((4aS,7aS)-hexahidro-1H-pirrolo[3,4-b]piridin-6(2H)-yl)-8-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico) para uso en la prevención y/o tratamiento de la atrofia muscular espinal.

El moxifloxacino es un antibiótico con un núcleo estructural de quinolona que presenta actividad antibacteriana.



20

Se ha encontrado que el moxifloxacino incrementa los niveles de proteína SMN de manera significativa, promoviendo la inclusión del exón 7 de SMN2 de manera dependiente de la concentración, actividad que, tal como se ha descrito anteriormente es una vía de tratamiento y cura de la atrofia muscular espinal (AME).

- 25 Moxifloxacino fue evaluado en fibroblastos de pacientes con atrofia muscular espinal, tal como se describe en el ejemplo 1, midiendo los niveles de transcripto de SMN en los fibroblastos tratados con el compuesto candidato frente a los niveles de transcripto de SMN de fibroblastos

control tratados con vehículo. Por otro lado, moxifloxacino fue evaluado además en células HeLa para determinar la existencia de agregados de SMN junto o co-localizados con Cuerpos de Cajal, dato indicativo de la presencia de SMN funcional en el organismo. Para ello se utilizó inmunofluorescencia, determinando el solapamiento de la señal correspondiente a los agregados de SMN y de la señal correspondiente a Cuerpos de Cajal, en células HeLa tratadas con moxifloxacino y en células tratadas con vehículo.

5 El ejemplo 1 (Figuras 2 y 3) muestra como moxifloxacino incrementó los niveles de la proteína SMN en fibroblastos derivados de pacientes con atrofia muscular espinal provocando la inclusión del exón 7 SMN2 de manera dependiente a la concentración, y mostró habilidad en 10 modular el *splicing* de SMN2 favoreciendo la inclusión de Ex7.

El ejemplo 2 muestra que la administración de moxifloxacino en células HeLa resultó en un incremento de casi el doble frente al control con DMSO (Figura 5). Estos resultados demuestran que el incremento de niveles de SMN tras el tratamiento con moxifloxacino es beneficioso para células que no presentan la función del gen SMN1.

15 Tal como se observa en los resultados de los ejemplos de la presente invención, moxifloxacino promueve la inclusión del exón 7 de SMN2 en fibroblastos de pacientes con atrofia muscular espinal tipo II. Además, la actividad de moxifloxacino resulta en un aumento en la expresión de la proteína SMN y en mayor expresión de SMN2 en forma de estructuras subcelulares, o agregados de SMN, manera característica en la que dicha proteína se acumula en 20 condiciones normales. La recuperación de niveles de proteína normales se pudo confirmar por la localización de agregados de SMN nucleares (o gems) junto a Cuerpos Cajal (Figura 4).

Una realización de la invención se refiere, por tanto, a moxifloxacino, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la prevención y/o tratamiento de la 25 atrofia muscular espinal.

Existen varios tipos de atrofia muscular espinal dependiendo de la edad del paciente y/o de la gravedad de los síntomas.

A efectos de la presente invención se define una atrofia muscular espinal de tipo 0 aquella que afecta a fetos. Es la forma más severa de la enfermedad y se caracteriza por movimiento 30 fetal pobre, anomalías en las articulaciones, dificultad para tragar y fallos respiratorios. Puede ser mortal antes del nacimiento y antes del primer año de vida.

Se define a efectos de la presente invención, una atrofia muscular espinal (AME) de tipo 1, como atrofia muscular espinal infantil o enfermedad de Werdnig-Hoffmann. Es el tipo de AME más común y se presenta durante el nacimiento o en los primeros meses de vida, con retrasos del desarrollo y problemas para levantar la cabeza, girar, respirar y tragar.

- 5 A efectos de la presente invención se define una atrofia muscular espinal de tipo 2, o AME intermedia, aquella que aparece entre los 7 y 18 meses de edad, apareciendo incapacidad para andar en los niños que la padecen.

Además, a efectos de la presente invención se define una atrofia muscular espinal de tipo 3,

o AME juvenil aquella que muestra síntomas evidentes antes de los tres años o incluso

- 10 durante la pubertad, y que provoca problemas para mantenerse de pie y andar, agravándose dichos síntomas con la edad.

Una atrofia muscular espinal tipo 4 aparece en adultos, después de los 30 años, y conlleva solamente síntomas suaves o moderados.

Una realización de la invención se refiere a moxifloxacino, o una sal o solvato

- 15 farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la prevención y/o tratamiento de la atrofia muscular espinal, donde dicha atrofia muscular espinal es de tipo 0, 1, 2, 3, 4.

En una realización de la invención, la atrofia muscular espinal es de tipo 0. En otra realización

de la invención, la atrofia muscular espinal es de tipo 1. En otra realización de la invención, la

20 atrofia muscular espinal es de tipo 2. En otra realización de la invención, la atrofia muscular

espinal es de tipo 3. En otra realización de la invención, la atrofia muscular espinal es de tipo 4.

El término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier sal que al ser administrada al paciente es capaz de proporcionar de manera directa o indirecta el compuesto descrito.

El término “solvato” de acuerdo con la presente invención se refiere a cualquier forma del

- 25 compuesto activo, moxifloxacino, que se encuentra unida de manera no-covalente a otra molécula (normalmente un disolvente polar), y de manera especial se refiere a hidratos y alcoholatos.

En una realización, la sal es una sal de un metal. Preferentemente una sal de un metal alcalino o de un metal alcalinotérreo, más preferentemente Na^+ , K^+ y Ca^{2+} .

- 30 En otra realización, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de amonio. Preferentemente dicha sal de amonio comprende un catión amonio sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente entre H, alquilo, alquenilo, alquinilo, hidroxialquilo,

poli(hidroxi)alquilo, cicloalquilo, alquilarilo, aminoarilo, aminoalquilo, aminoalquenilo, aminoalquinilo, arilalquilaminoalquilo y alquilaminoarilo; o es un catión amonio cíclico. En otra realización, la sal es una sal de guanidina. En otra realización, la sal farmacéuticamente es una sal de un aminoácido. Preferentemente dicho aminoácido es L-lisina o L-arginina.

- 5 En una realización, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de un ácido inorgánico, preferentemente un hidrocloruro, hidrobromuro, sulfato o fosfato. En otra realización preferente la sal farmacéuticamente aceptable de moxifloxacino para uso de acuerdo con la presente invención es una sal de un ácido orgánico, preferentemente un citrato, oxalato, salicilato, benzoato, acetato, fumarato o maleato.
- 10 En una realización preferente de la invención, la sal farmacéuticamente aceptable de moxifloxacino es una sal formada con el grupo ácido carboxílico o con una amina básica de moxifloxacino, o con ambos grupos.

En una realización el moxifloxacino para uso de acuerdo con la presente invención es una sal de adición básica. Dicha sal puede encontrarse además hidratada.

- 15 Por tanto, una realización preferente de la presente invención se refiere a una sal de moxifloxacino hidrocloruro para uso en la prevención y/o tratamiento de la atrofia muscular espinal.

Otra realización preferente de la presente invención se refiere a una sal de moxifloxacino hidrocloruro monohidrato, para uso en la prevención y/o tratamiento de la atrofia muscular

- 20 espinal.

Otra realización de la invención se refiere al uso de moxifloxacino, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para la elaboración de un medicamento para uso en el tratamiento de la atrofia muscular espinal. Preferentemente la sal es un hidrocloruro.

- 25 Una realización de la presente invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de moxifloxacino, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente o vehículo, para uso en la prevención y/o tratamiento de la atrofia muscular espinal.

Se entiende como cantidad efectiva, a efectos de la presente invención, como aquella que proporciona un efecto terapéutico sin proporcionar efectos tóxicos inaceptables en el paciente.

- 30 La cantidad o dosis efectiva del medicamento depende del compuesto y de la condición o enfermedad tratada y de, por ejemplo, la edad, peso y condición clínica del paciente tratado,

la forma de administración, el historial clínico del paciente, la gravedad de la enfermedad y la potencia del compuesto administrado.

Así, una realización preferente de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de moxifloxacino hidrocloruro, para uso en la prevención y/o tratamiento de la atrofia muscular espinal.

Otra realización preferente de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de moxifloxacino hidrocloruro monohidrato, para uso en la prevención y/o tratamiento de la atrofia muscular espinal.

Preferiblemente el moxifloxacino puede ser usado de manera individual o junto con otro compuesto, activo. A efectos de la presente invención se entiende por un compuesto activo una entidad química o un principio activo que ejerce efectos terapéuticos cuando es administrado a un humano o un animal.

Adicionalmente, la presente invención describe un método de prevención y/o tratamiento de la atrofia muscular espinal que comprende la administración de una cantidad efectiva de moxifloxacino, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o de una composición farmacéutica que lo comprende, a un paciente que lo necesite. Preferentemente la sal farmacéuticamente aceptable es un hidrocloruro.

Las composiciones de la invención incluyen, junto con los compuestos descritos en la presente invención al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, que puede ser un vehículo o diluyente. Un diluyente es tal, que no modifica la acción biológica del compuesto de interés.

Dichas composiciones pueden incluirse en cápsulas, comprimidos, saquitos o sobres o cualquier otro tipo de presentación.

Para elaborar dichas composiciones, se puede utilizar técnicas convencionales para la preparación de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, el compuesto de interés puede ser mezclado con un vehículo o diluido en un vehículo o contenido en un vehículo en forma de ampolla, cápsula, comprimido, sobre, saquito u otro recipiente. Cuando el vehículo sirve como disolvente, puede ser sólido, semi-sólido o líquido y actuar como excipiente o medio para dicho compuesto activo. El compuesto de interés puede ser adsorbido en un medio granular sólido. Algunos ejemplos de vehículos adecuados son agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, aceite de ricino polihidroxietoxilado, aceite de cacahuete, aceite de oliva, lactosa, terra alba, sacarosa, ciclodextrinas, amilosa, estearato de magnesio, talco,

gelatina, agar, pectina, acacia, ácido esteárico, éteres de alquilo de celulosa, ácido silicio, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, esteres grasos de pentaeritrol, polietileno, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Asimismo, el vehículo o soporte puede incluir materiales de liberación sostenida conocidos en el estado de la técnica, tales como gliceril monoestearato o diesterato solo o mezclado con una cera. Las formulaciones pueden también incluir agentes humectantes, emulsificadores, agentes de suspensión, preservantes, edulcorantes o saborizantes. Las composiciones pueden ser formuladas para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del agente activo después de que sea administrada al paciente empleando métodos conocidos en el estado de la técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser esterilizadas y mezcladas, si así se desea, con agentes adicionales, emulsificantes, sal para influenciar la presión osmótica, tampones y/o sustancias colorantes que no reaccionan de manera adversa con los compuestos activos.

Una realización de la invención se refiere al modo de administración, que puede ser cualquier modo que transporta de manera efectiva el compuesto de interés al lugar deseado de acción, tal como oral, rectal o parenteral, por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intrauretral, intramuscular, intranasal o como solución oftálmica.

Así, una realización de la invención se refiere a una composición de moxifloxacino, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con la presente invención, en la que dicha composición se administra por vía oral, rectal, oftálmica o parenteral.

Preferentemente, la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención es un comprimido, una solución inyectable o una solución oftálmica.

Para administración oral, se pueden preparar tanto formas de dosificación sólidas como líquidas. Para preparar composiciones sólidas como comprimidos, el compuesto de interés se mezcla en una formulación con otros ingredientes convencionales tales como talco, estearato de magnesio, fosfato bicálico, silicato de aluminio y magnesio, almidón, lactosa, acacia, metilcelulosa y materiales similares funcionalmente tales como vehículos y diluyentes farmacéuticos.

Las cápsulas pueden ser preparadas mezclando el compuesto de interés con un disolvente inerte farmacéuticamente y rellenando la mezcla en una gelatina dura de tamaño apropiado. Cápsulas blandas se preparan con máquinas de encapsulación de suspensiones del compuesto de interés con un aceite vegetal, una parafina ligera o un aceite inerte aceptables.

Pueden ser preparadas también, formas de dosificación líquidas tales como jarabes, elixires y suspensiones. Las formas solubles en agua pueden ser disueltas en un vehículo acuoso junto con azúcar, aromas saborizantes y conservantes para formar un jarabe. Un elixir es preparado usando un vehículo hidroalcohólico (p.ej. etanol) con edulcorantes adecuados tales

- 5 como azúcar o sacarina, junto con agentes aromáticos saborizantes. Las suspensiones pueden ser preparadas con un vehículo acuoso y la ayuda de un agente de suspensión tal como acacia, tragacanto, metilcelulosa y similares.

Para la administración nasal, la preparación puede contener el compuesto de interés disuelto o suspendido en un vehículo líquido, en particular un vehículo acuoso, para aplicación como 10 aerosol. El vehículo puede contener aditivos tales como agentes solubilizantes, por ejemplo, propilenglicol, tensioactivos, potenciadores de absorción tales como la lecitina (fosfatidilcolina) o ciclodextrina, o conservadores como parabenos.

Para aplicaciones oftálmicas, el compuesto de interés es formulado en soluciones, suspensiones y ungüentos apropiados para ser usados en el ojo. Las concentraciones son 15 habitualmente las mismas que en preparaciones para uso local.

Para aplicación parenteral son evidentes para el experto en la materia, el uso de soluciones o suspensiones inyectables, para uso intradermal, intramuscular, intravascular y subcutáneo.

Además del compuesto de interés las composiciones pueden incluir otros diluyentes y excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo vehículos de utilización 20 común en composiciones farmacéuticas de uso habitual en humanos o animales. El diluyente se selecciona de manera que no afecte a la actividad biológica de la composición.

Ejemplos de diluyentes usados especialmente en formulaciones inyectables son soluciones salinas orgánicas e inorgánicas, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, las composiciones pueden incluir aditivos como otros excipientes, agentes 25 adyuvantes, estabilizadores no terapéuticos y no inmunogénicos y similares.

Ejemplos de excipientes que pueden incluirse en la formulación incluyen, pero no se limitan a codisolventes, tensioactivos, aceites, humectantes, emolientes, conservantes, estabilizantes y antioxidantes. Se puede utilizar cualquier tampón fisiológicamente aceptable, tal como Tris o tampones de fosfato. Cantidades efectivas de diluyentes o aditivos o excipientes son 30 aquellas que son efectivas para obtener una formulación farmacéuticamente aceptable en términos de solubilidad y actividad biológica.

Otra realización se refiere al régimen de dosificación. El término dosis unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para un individuo, por ejemplo, mamífero, humano, perro, gato, roedor, etc. en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico adecuado en asociación con el diluyente, soporte o vehículo adecuado.

5

EJEMPLOS

Los ejemplos descritos a continuación tienen carácter ilustrativo y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención. Se describen asimismo los métodos y materiales utilizados
10 en los ejemplos descritos a continuación.

10

Extracción de ARN y retrotranscripción.

15

La extracción de ARN de células se llevó a cabo con ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema de extracción incluye el tratamiento con ADNasa I y, por tanto, la retrotranscripción de ARN de células no incluye este paso.

15

La concentración de ARN y la contaminación de sales se midió con el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher). Las muestras se conservaron a -80°C. 1 µg de ARN total fue retrotranscritado usando la retrotranscriptasa SuperScript III (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La contaminación de ADN genómico se monitorizó en las
20 muestras de ARN sin la adición de retrotranscriptasa.

20

Reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

25

Para la cuantificación de los transcritos de *SMN2* FL y $\Delta 7$ se utilizó Probe qPCR Mix (SolisBiodyne). La reacción se llevó cabo de manera multiplex, en la que la señal de la sonda de *SMN2* y de *GAPDH* se leyeron en una reacción única. 10 ng de ADNc se usó como patrón y la concentración de ambas sondas fue 250 nM.

25

30

Los juegos de cebadores para la detección de los isoformos de *SMN2* FL o $\Delta 7$ (SEQ ID NO. 1 a 4) se utilizaron a una concentración final 500 nM mientras que la concentración del juego de cebadores usado para *GAPDH* fue de 150 nM. Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando un termociclador Step-One Real-Time PCR (Applied Biosystems). En todos los casos el experimento incluyó tres muestras biológicas y tres réplicas para cada muestra.

Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia utilizando un método 2- $\Delta\Delta Ct$ method. Los cebadores se obtuvieron de Naryshkin, N. A. y col. Science (2014) 345, 688-693:

SEQ ID NO 1 (SMN2 FL Sentido)	GCTCACATTCCCTTAAATTAAGGAGAAA
SEQ ID NO 2 (SMN2 Δ7 Sentido)	TGGCTATCATACTGGCTATTATATGGAA
SEQ ID NO 3 (SMN2 Antisentido, ambos)	TCCAGATCTGTCTGATCGTTCTT
SEQ ID NO 4 (SMN2 TaqMan sonda)	/56-FAM/-CTGGCATAGAGCAGCACTAAATGACACCCAC-/3BHQ_1/

Para la obtención de los porcentajes de *splice-in* (PSI), es decir los porcentajes de inclusión
5 del exón 7 de *SMN2*, se utilizó PCR semicuantitativa con 2x PCR Super Master Mix (Bimake). La concentración final de los cebadores (SEQ ID NO. 5 y 6) fue 250 nM y el análisis de la imagen se realizó usando Image J.

SEQ ID NO 5 (Sentido)	GATGCTGATGCTTGGGAAGT
SEQ ID NO 6 (Antisentido)	CGCTTCACATTCCAGATCTGTC

Métodos de cultivo celular.

Los fibroblastos derivados de pacientes de AME (GM03813; Coriell Cell Repositories) fueron
10 cultivados a 37°C en botellas de cultivo celular con medio estándar Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) y 4,5 g/ml de glucosa. El medio se suplementó con penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 mg/ml) [1% P/S; Gibco] y 10% de suero bovino fetal inactivado (FBS; Gibco).

Las células HeLa fueron cultivadas en las mismas condiciones excepto en que se utilizó medio
15 DMEM con 1 g/ml de glucosa.

Para la extracción de ARN se sembraron 400.000 fibroblastos GM03813 en placas de cultivo de 60 mm en 4 ml de medio DMEM suplementado. Al día siguiente se cambió el medio y los compuestos candidatos fueron añadidos a su concentración máxima no tóxica. Las células fueron incubadas durante 48 horas y lavadas a continuación con 1xPBS y recolectadas en

tubos estériles de 1,5 ml. Se hizo lo mismo para la evaluación del efecto de los compuestos en el nivel de proteína SMN con la diferencia de que se utilizaron 1.000.000 fibroblastos en una placa de cultivo celular de 100 mm y que las células fueron recolectadas al transcurrir 2 días con un tampón de extracción de proteína RIPA suplementado con un *cocktail* inhibidor de proteasas (cOmplete; Roche). Para la inmunotinción 40.000 células HeLa fueron sembradas en una placa de 24 pocillos de 400 µl con medio DMEM suplementado seguido de cambio de medio con el tratamiento del compuesto candidato correspondiente. Las células fueron incubadas durante 72 h con los compuestos candidatos y fijadas en paraformaldehido al 4% durante 10 minutos. Todos los cultivos celulares se incubaron a 37°C con 5% CO₂.

10

Ejemplo 1: Evaluación de moxifloxacino en fibroblastos de AME.

Moxifloxacino fue evaluado en fibroblastos derivados de pacientes con atrofia muscular espinal de tipo II. La dosis usada en el estudio fue determinada experimentalmente en fibroblastos normales.

15 El ensayo de toxicidad fue llevado a cabo usando CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega). Fibroblastos de la línea GM03814 fueron sembrados en placas de 96 pocillos con 1,0 x 10⁴ células por pocillo y se incubaron 24 horas. Moxifloxacino fue añadido a varias concentraciones en medio DMEM completo y las células fueron incubadas 48 h. La viabilidad celular fue medida con la sal de tetrazolio MTS que fue añadida 20 en cada pocillo e incubada durante 4 h a 37°C en una cámara humedecida con 5% CO₂. La conversión de MTS en forma soluble, por células metabólicamente activas, fue medida por absorbancia a 490 nm.

El umbral de inhibición de la viabilidad celular se estableció al 10% (Figura 1) y la concentración de moxifloxacino en los estudios posteriores no excedió dicho valor.

25 Los fibroblastos derivados de pacientes de AME tipo II fueron incubados con moxifloxacino a la concentración máxima no tóxica establecida anteriormente durante 72 h.

50 µg de proteína extraída de las células tratadas con moxifloxacino fueron separadas mediante electroforesis con geles de acrilamida/bis-acrilamida SDS-PAGE con el Mini-protean Electrophoresis System (Bio-Rad). Despues de llevar a cabo la electroforesis, las proteínas 30 fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) usando un sistema semiseco de electro-transferencia (Bio-Rad) durante una hora con un voltaje constante de 15V. Las membranas fueron incubadas con una solución bloqueadora (leche desnatada al 5% en PBST, 1x PBS, 0,1% Tween 20) durante al menos 1h a temperatura ambiente.

A continuación, fueron incubadas a 4°C toda la noche con la solución bloqueadora de anticuerpos primarios de SMN, MANSMA1 (11F3; Developmental Studies Hybridoma Bank) y, subsecuentemente, se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado anti-ratón peroxidasa-IgG (Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. β-actina fue usada como control de carga (ACTB en la figura 2B), utilizando un anticuerpo contra β-actina y un secundario conjugado antilgG de conejo conjugado con peroxidasa.

Se detectó la quimioluminiscencia usando SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce) y se grabó con ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

Los niveles de SMN medidos por Western blot y los resultados obtenidos se compararon a los 10 de una muestra tratada con disolvente (DMSO 0,5%) que corresponde a la línea punteada de la figura 2A. Además, imágenes representativas de los resultados obtenidos en el blot tal como muestra la figura 2B. Los valores estadísticos fueron calculados usando el Student's t-test (*p<0,05, **p<0,01, ****p < 0.001). En dichas figuras 2A y 2B se puede observar que moxifloxacino produjo un aumento significativo en los niveles de proteína SMN frente al control 15 con DMSO.

Se evaluó, a continuación, su efecto en el transcripto de SMN2. La línea de fibroblastos de AME seleccionada tiene 3 copias del gen SMN2 y una delección homocigótica del Ex7-Ex8 en SMN1 y, por tanto, solamente se midieron transcritos del gen SMN2.

Moxifloxacino incrementa los niveles de proteína SMN y cambia la relación de los 20 isoformos SMN2FL y Δ7, promoviendo la inclusión del exón 7 en el transcripto final, tal como se puede observar en la figura 3B. En este sentido, el isomorfo FL, que incluye el exón 7, incrementa en función de la concentración, mientras el isomorfo Δ7, isomorfo que excluye dicho exón, disminuye.

El análisis semicuantitativo del porcentaje de *splice-in* (PSI), es decir de inclusión, del exón 25 7 de SMN2 mostró un incremento del 63% en células tratadas con disolvente a 90% en células tratadas con moxifloxacino 500 μM (Figura 3A).

Ejemplo 2: Evaluación de moxifloxacino en células HeLa

Moxifloxacino presentó capacidad de modular el resultado del *splicing* de SMN2, favoreciendo 30 la inclusión de Ex7. Se comprobó a continuación si el incremento del transcripto de SMN2 FL se trasladaba a proteína SMN estable y funcional.

Para ello, se trataron células HeLa con moxifloxacino 500 µM durante 72 h y se tiñeron doblemente las células para SMN y Coilin. Coilin es un componente molecular de los Cuerpos de Cajal (CB) y es responsable de la formación de un puente entre SMN y los CB que solamente se forma con proteína SMN completa y funcional.

- 5 Para ello, células HeLa se sembraron en placas con 24 pocillos, 400 µL de DMEM completo, con 40.000 células por pocillo y se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente las células fueron tratadas con DMSO (0,5%) y moxifloxacino a cuatro concentraciones diferentes (500, 375, 250 y 50 µM; diluido con DMSO al 0,5%). Las células fueron incubadas durante 72h y fijadas con paraformaldehido al 4% durante 10 minutos. La membrana fue permeabilizada con
10 1x PBST (1x PBS, 0,3% Triton X-100) durante 15 min con subsecuente incubación en tampón bloqueador (1x PBST, suero de cabra normal al 4%) durante 1 h a temperatura ambiente. Anticuerpos monoclonales primarios anti-SMN2 (de ratón, Millipore) y policlonales anti-Coilin (de conejo, Invitrogen) fueron diluidos con tampón bloqueador (1:400) e incubados toda la noche a 4°C. Anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados con Rodamina y anti-conejo
15 conjugados con isoftiocianato de fluoresceína (FITC), fueron diluidos con tampón bloqueador (1:400) e incubados a 4°C toda la noche. Los núcleos se tintaron con Hoechst 33258 diluido en un medio de montaje (1:10.000). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal LSM 800 (Zeiss). Los análisis de co-localización de agregados de SMN y Cuerpos de Cajal y los cálculos del Coeficiente de Solapamiento de Manders fueron llevados a cabo
20 con el software ZEN.

Se observó que las células HeLa tratadas con moxifloxacino incrementaron de manera significativa el número de agregados de SMN, así como los CBs (Cuerpos de Cajal, por sus siglas en inglés Cajal Bodies), tal como se puede observar en las imágenes de la Figura 4. Se calculó el número de agregados de SMN co-localizados con CBs y se observó que se duplicaban en comparación con el control tratado con disolvente solamente (Figura 5A). Para confirmar esta observación se llevó a cabo un análisis de co-localización usando el software ZEN que permite la visualización y cuantificación del solapamiento entre la fluorescencia detectada de SMN y de Coilin.

30 Se observó un incremento significativo de co-localización entre las dos proteínas tras el tratamiento. El análisis llevado a cabo para diferentes concentraciones de moxifloxacino mostró que a 250 µM incrementa significativamente los niveles funcionales de SMN en células HeLa (figura 5B). Moxifloxacino demostró mejorar la inclusión del Ex7 SMN2 e incrementar los niveles de proteína SMN funcional, mostrando la utilidad de dicho compuesto en el tratamiento de AME.

REIVINDICACIONES

1. Moxifloxacino, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la prevención y/o tratamiento de la atrofia muscular espinal.
- 5 2. Moxifloxacino, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la atrofia muscular espinal es de tipo 0, 1, 2, 3 o 4.
- 10 3. Moxifloxacino, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la sal farmacéuticamente aceptable de moxifloxacino es moxifloxacino hidrocloruro.
- 15 4. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de moxifloxacino, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente o vehículo, para uso en la prevención y/o tratamiento de la atrofia muscular espinal.
5. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la atrofia muscular espinal es de tipo 0, 1, 2, 3 o 4.
- 15 6. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en el que la sal farmacéuticamente aceptable de moxifloxacino es moxifloxacino hidrocloruro.
- 20 7. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que dicha composición se administra por vía oral, oftálmica o parenteral.
8. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que dicha composición es un comprimido.
9. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las 25 reivindicaciones 4 a 6, en la que dicha composición es una solución inyectable.
10. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que dicha composición es una solución oftálmica.

FIGURA 1

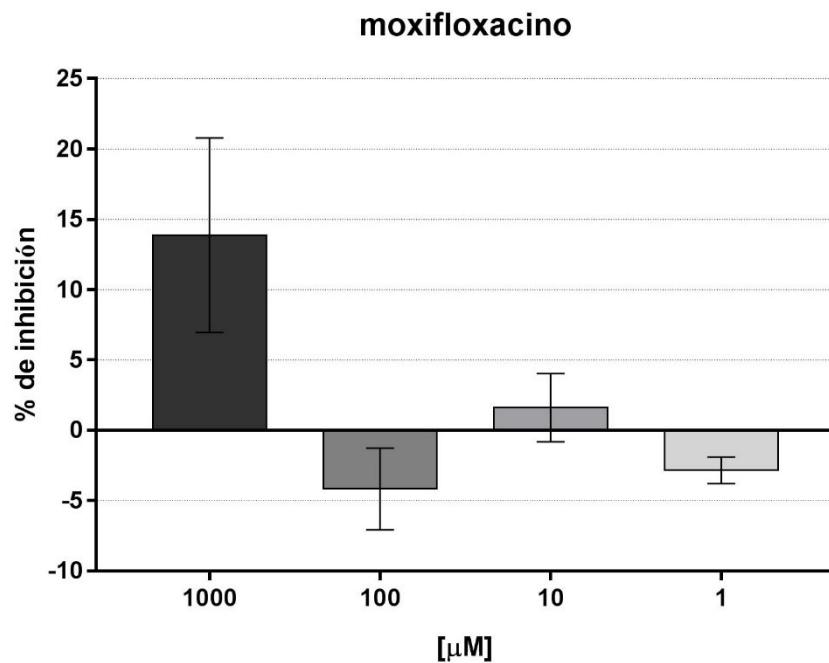


FIGURA 2

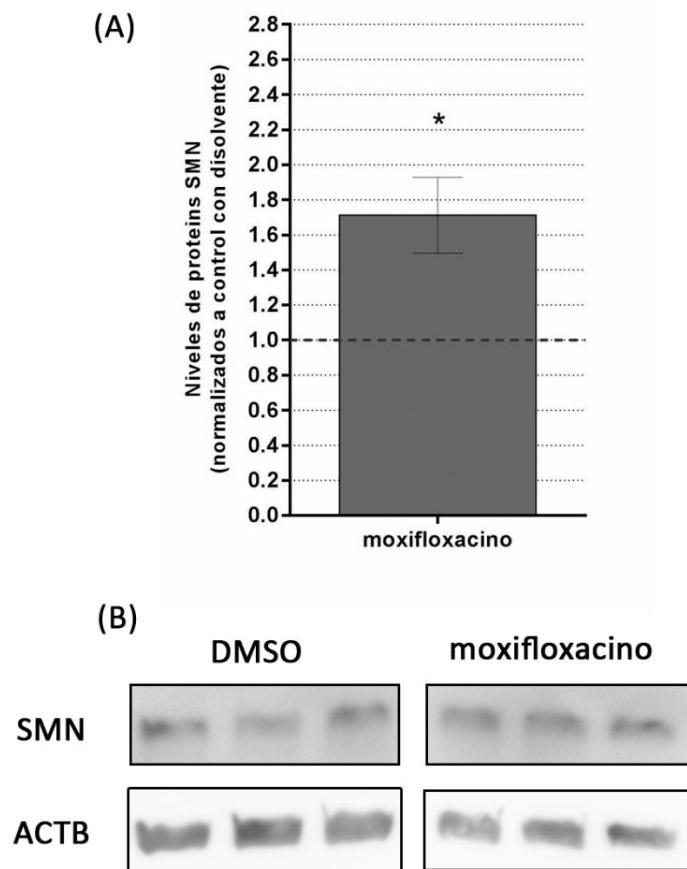
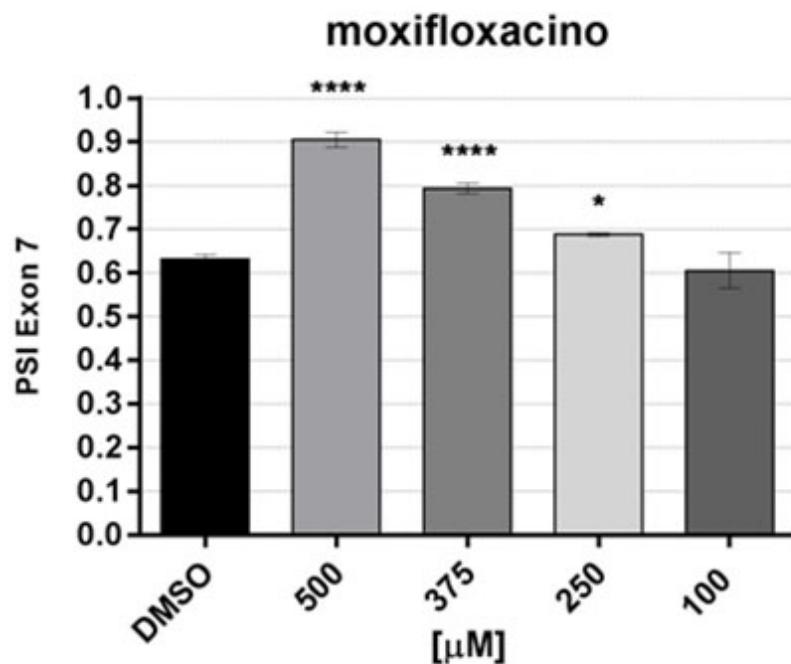


FIGURA 3

(A)



(B)

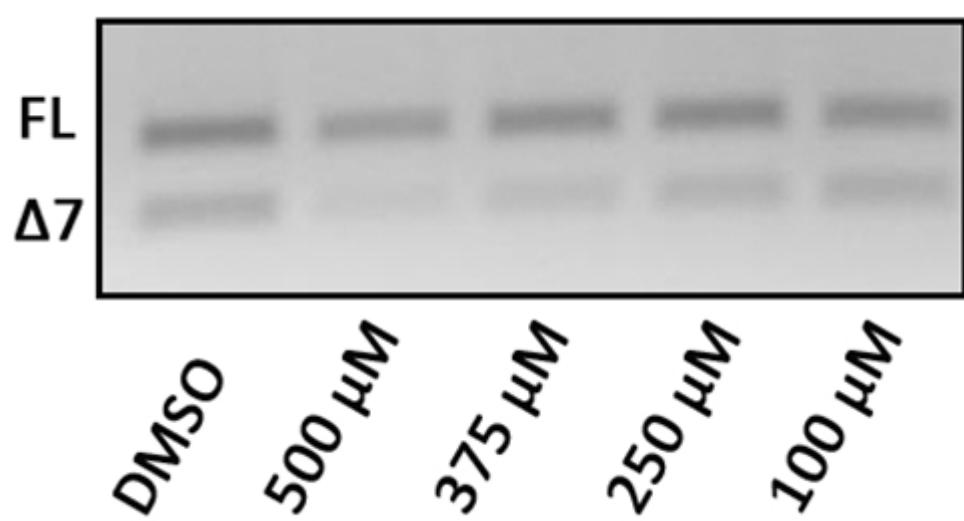


FIGURA 4

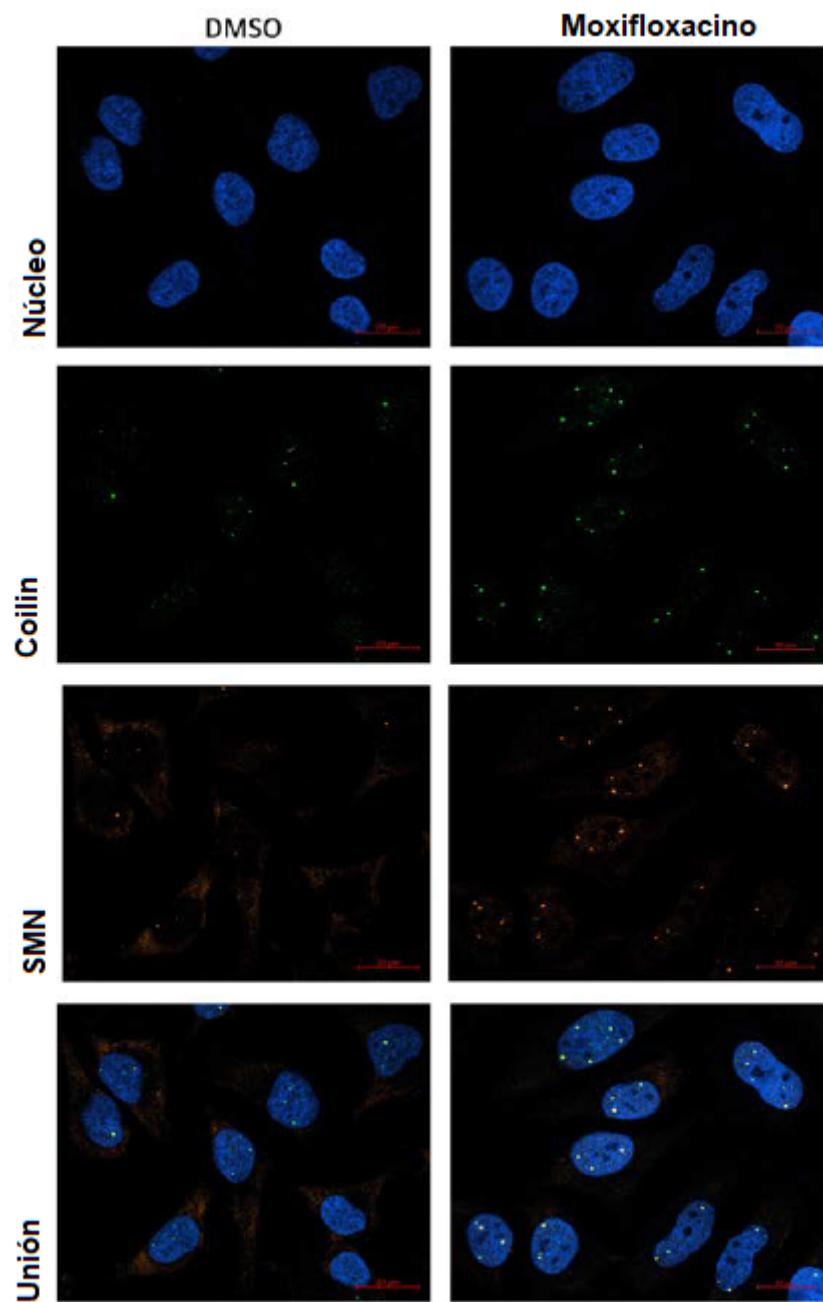
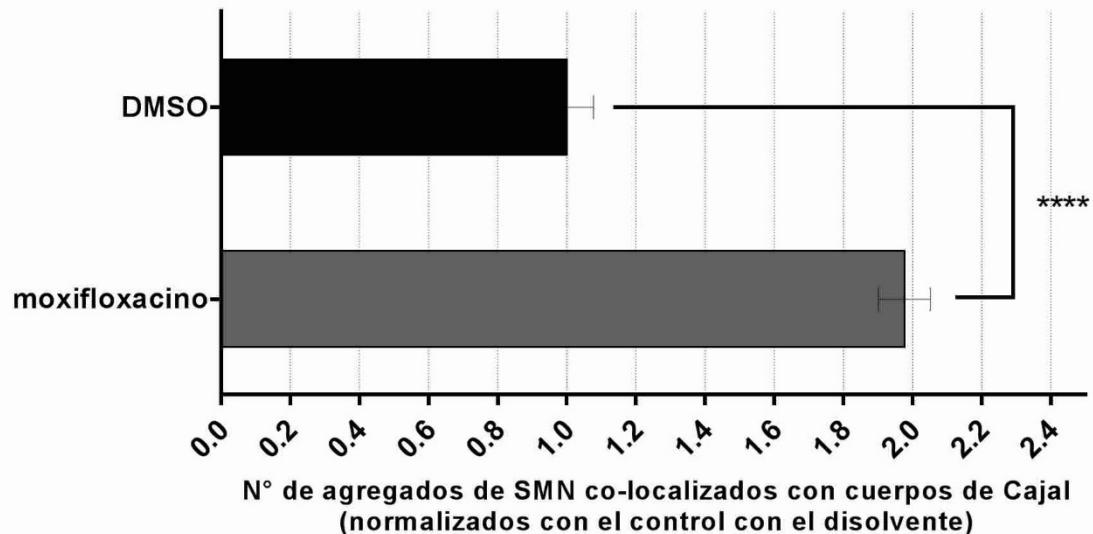


FIGURA 5

(A)



(B)

