(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 034 601**

(51) Int. CI.:

A61K 31/4515 (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2022 PCT/EP2022/087022**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2023 WO23118164**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2022 E 22843657 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.05.2025 EP 4387622**

(54) Título: **Haloperidol para uso en el tratamiento de la atrofia muscular espinal**

(30) Prioridad:

20.12.2021 EP 21383162

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.08.2025

(73) Titular/es:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (55.00%)
Avda. Blasco Ibáñez, 13
46010 Valencia, ES;
FUNDACION PARA LA INVESTIGACION DEL HOSPITAL CLINICO DE LA COMUNIDAD VALENCIANA (5.00%);
CECS (6.66%);
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (6.67%);
UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE (6.66%) y
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO (20.00%)

(72) Inventor/es:

KONIECZNY, PIOTR TADEUSZ;
ARTERO ALLEPUZ, RUBÉN DARÍO;
JANUEL, CAMILLE;
MARTINAT, CÉCILE;
BOIDO, MARINA MARIA y
MENDUTI, GIOVANNA

(74) Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Haloperidol para uso en el tratamiento de la atrofia muscular espinal

Campo de la invención

La presente invención pertenece al sector farmacéutico y se refiere a haloperidol o a una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, así como a composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo, para uso en métodos para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal.

Antecedentes de la invención

La atrofia muscular espinal (SMA) es un trastorno neuromuscular genético poco común provocado por la pérdida de motoneuronas alfa en la médula espinal y los núcleos del cerebro. Se creía que la atrofia muscular en la SMA era únicamente una consecuencia de la denervación de las fibras musculares; sin embargo, hay cada vez más evidencia de que los defectos musculares se producen de manera independiente e incluso antes de la degeneración de la motoneurona. Los experimentos en el modelo murino de SMA y en células humanas revelaron defectos en los procesos de proliferación, maduración y fusión de los mioblastos. La enfermedad afecta a 1 de cada 6.000 a 10.000 niños y 1 de cada 40 personas es portadora de la mutación responsable, que muestra un patrón de herencia autosómico recesivo.

La SMA es provocada principalmente por mutaciones en el gen SMN1. Sin embargo, como resultado de la duplicación en el genoma, el locus SMN (ubicación cromosómica 5q13) contiene dos copias invertidas de SMN, denominadas SMN1 (telomérico) y SMN2 (centromérico). Los genes SMN1 y SMN2 son casi idénticos con sólo 5 cambios de nucleótidos: uno en el intrón 6 (G/A), el exón 7 (C/T), el exón 8 (G/A) y dos en el intrón 7 (AA/GG). La diferencia en las regiones codificantes de ambos genes es una transición de C a T en la posición +6 del exón 7 en SMN2. Este cambio es crítico ya que genera un patrón de corte y empalme diferente. En SMN1, se incluye el exón 7 (Ex7), lo que da como resultado una proteína SMN funcional y de longitud completa. Sin embargo, la transición de C a T en SMN2 provoca la exclusión de Ex7 en la mayoría de los casos, lo que da como resultado una proteína SMN truncada en el extremo C-terminal (Δ7-SMN). Sin embargo, una fracción de los ARNm de SMN2 incluye Ex7 y da como resultado una proteína SMN funcional de longitud completa (FL-SMN), que, sin embargo, es insuficiente para compensar la pérdida de SMN1. Además, la proteína SMN truncada que comprende 282 en lugar de 294 aminoácidos tiene una capacidad de oligomerización deteriorada y es altamente inestable.

Todos los pacientes que padecen SMA son portadores de una o más copias del gen SMN2, que se traduce mayoritariamente en la isoforma de SMN truncada no funcional y produce sólo una pequeña parte de la proteína funcional.

Aunque incluso los casos más graves de SMA normalmente se manifiestan en etapas postnatales, hay estudios que notifican aumento de pérdida de motoneuronas, disminución del tamaño de los miotubos y contactos sinápticos anómalos en las uniones neuromusculares (NMJ) en las etapas prenatales. De hecho, aunque las motoneuronas son el principal tipo de células afectadas en la fisiopatología de la SMA, existe una creciente evidencia del carácter multisistémico de la SMA, que afecta directamente a los músculos, el corazón, el cerebro y el páncreas.

El descubrimiento del gen SMN1 mutado y su copia de SMN2 no afectada permitió relacionar el número de copias de SMN2 con la gravedad de la enfermedad (véase la tabla 1). De hecho, el número de copias de SMN2 está inversamente correlacionado con la gravedad de la enfermedad porque la cantidad de proteína funcional traducida a partir de los transcritos de SMN2 compensa parcialmente las deficiencias de SMN provocadas por las mutaciones en SMN1.

Tabla 1: Tipo de SMA

Tipo de SMA	Edad de aparición	Esperanza de vida	Número de copias de SMN2
IA	< 1 semana/congénito	< 1 mes	1
IB	1 semana - 3 meses	< 2 años	2, 3
IC	3 - 6 meses	< 2 años	2, 3
IIA	6 - 15 meses	> 2 años	2, 3, 4
IIB	6 - 15 meses	> 2 años	2, 3, 4
IIIA	< 3 años	Adulta	3, 4
IIIB	> 3 años	Adulta	3, 4
IV	> 21 años	Adulta	4, 5

Por otra parte, a pesar de que la presencia de la copia de SMN2 no compensa totalmente la pérdida de función de SMN1, constituye una diana terapéutica importante en muchos aspectos. De hecho, la mejora específica de la inclusión de Ex7 en SMN2 es un enfoque terapéutico prometedor, que aumenta los niveles de transcrito de longitud completa y, como consecuencia, los niveles de proteína SMN funcional. La razón de proteína completa con respecto a proteína truncada en los pacientes es de aproximadamente 1:4 y, por consiguiente, una terapia que aumente la inclusión de Ex7 será un enfoque terapéutico eficaz.

Actualmente están explorándose dos enfoques: uno implica el uso de oligonucleótidos antisentido (ASO) promotores de inclusión de Ex7, y el otro se basa en pequeñas moléculas con propiedades de conmutación de corte y empalme similares.

Los ASO son oligonucleótidos monocatenarios diseñados para ser complementarios a una secuencia de ARN seleccionada como diana. Los ASO pueden diseñarse para la modulación del corte y empalme o el procesamiento del ARN. Se propuso esta estrategia para diseñar oligonucleótidos terapéuticos que modifiquen el corte y empalme alternativo del pre-ARNm de SMN2, favoreciendo la inclusión de Ex7 en el transcrito final. Por ejemplo, recientemente, una terapia basada en 2'-O-metoxietil-ASO denominada nusinersen (Spinraza™) se ha convertido en la primera terapia aprobada por la FDA para la SMA grave, aunque todavía están realizándose ensayos clínicos adicionales. Los ASO no atraviesan la barrera hematoencefálica cuando se administran por vía sistémica y, por consiguiente, nusinersen requiere administración intratecal. El protocolo de administración de nusinersen incluye dos fases: una dosis de carga inicial, con una frecuencia de cuatro inyecciones durante dos meses y, posteriormente, una fase de mantenimiento en la que se administran inyecciones cada cuatro meses.

Otra terapia para la SMA aprobada recientemente (2020) para adultos y niños mayores de 2 meses es risdiplam (Evrysdi®). Risdiplam interactúa directamente con el empalmosoma para promover la inclusión del exón 7 en el pre-ARNm de SMN2 produciendo un aumento en el nivel de la proteína SMN funcional de longitud completa. Es un fármaco líquido que se administra por vía oral, ya que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Esto permite un tratamiento sin hospitalización y una distribución sistémica del fármaco, no sólo a través del sistema nervioso central sino también en otros órganos y tejidos periféricos.

Usando la misma diana terapéutica, es decir, promover la expresión de la proteína SMN, Zolgensma™ (onasemnogén abeparvovec) se aprobó en 2019 para pacientes pediátricos con SMA menores de 2 años. Onasemnogén abeparvovec es una terapia génica para la sustitución del gen SMN1, independientemente del gen SMN2; es decir, se dirige directamente al gen disfuncional causante de la SMA. Esta sustitución se logra usando una cápside de virus adenoasociado no replicante (scAAV9). La administración de esta terapia consiste en una única aplicación sistémica intravenosa, ya que atraviesa la barrera hematoencefálica y también entra en motoneuronas, músculo y otros tejidos donde existe una alta expresión de SMN, lo que da como resultado un aumento sistémico y duradero de la expresión de SMN1, así como una mayor supervivencia del paciente, ya que la proteína se expresa de manera ubicua.

A pesar de la existencia de varias terapias aprobadas, aún existe la necesidad de alternativas terapéuticas para superar las desventajas y limitaciones de los fármacos aprobados actualmente. De hecho, las terapias comercializadas actualmente incluyen varias limitaciones o desventajas: vías de administración invasivas (nusinersen), eficacia dependiente de la edad y tipo de paciente (más eficaces cuando los pacientes se tratan en etapas más tempranas), efectos adversos y alto coste.

Por ejemplo, la vía de administración de nusinersen es altamente invasiva, ya que se administra por vía intratecal, varias veces al año, durante toda la vida del paciente y, por consiguiente, requiere periodos de hospitalización. Además, esta vía de administración puede incluir varias dificultades para pacientes con escoliosis grave o que hayan padecido una fusión espinal. De manera análoga, la presencia de niveles bajos de la proteína SMN en tejidos periféricos, debido a la falta de disponibilidad sistémica del fármaco debido a la vía de administración y las consecuencias de la misma, también es una preocupación cuando se usa nusinersen.

El desarrollo de fármacos que se administran por vía sistémica, tales como onasemnogén abeparvovec, o de administración oral, tales como risdiplam, ha superado algunos de los problemas planteados por la vía de administración de nusinersen. Sin embargo, onasemnogén abeparvovec sólo se ha aprobado para pacientes de 2 años de edad o menores, y la presencia de anticuerpos anti-AAV9 preexistentes en la población de pacientes con SMA, o la presencia de anticuerpos desarrollados después del tratamiento también puede ser un problema, ya que puede reducir los beneficios terapéuticos de esta terapia y aumentar los riesgos de respuesta inmunitaria.

Además, puede producirse la aparición de efectos adversos importantes en pacientes a los que se les administran esos tratamientos. Entre esos efectos adversos se encuentran dolores de cabeza y de espalda debidos a la administración de nusinersen, daño hepático agudo, sangrado y daño cardíaco debido a onasemnogén abeparvovec. Además, dado que el risdiplam no se ha usado durante largos periodos, todavía se desconocen los posibles efectos adversos que pueda provocar a largo plazo, así como los riesgos que pueda suponer en otras áreas. Además, el risdiplam presenta una baja capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. El risdiplam en el tratamiento de la SMA también se da a conocer en el documento WO2020/249577.

Por último, una de las limitaciones más importantes de todas las terapias aprobadas es su elevado coste, que impide el acceso a ellas a muchos pacientes. Por ejemplo, el primer año de tratamiento con nusinersen representa actualmente un coste de aproximadamente 750.000 dólares, y 375.000 dólares para los años siguientes de tratamiento crónico. Por otra parte, el precio de risdiplam representa aproximadamente 340.000 dólares al año y la dosis única de onasemnogén abeparvovec es el fármaco más caro del mundo, con un coste de aproximadamente 2,1 millones de dólares por dosis única.

Por consiguiente, aún existe la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos para la SMA, con un régimen de administración más conveniente, más asequible y menos invasivo, que sean capaces de proporcionar buenos niveles de la proteína SMN funcional de longitud completa y tengan una buena capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. En particular, todavía se necesita un fármaco capaz de aumentar la cantidad de proteína SMN funcional de longitud completa en diferentes tejidos corporales, en particular en las motoneuronas, con una vía de administración sencilla y costes accesibles.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a haloperidol, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal. Este método puede dar como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN funcional de longitud completa.

Otro aspecto de la presente invención también se refiere a haloperidol, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal, en donde dicho método aumenta la expresión del transcrito de SMN2 y/o aumenta la inclusión de exón 7 en SMN2 y, por consiguiente, da como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN funcional de longitud completa.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende haloperidol, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; para uso en un método para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal. Este método puede dar como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN funcional.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende haloperidol, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; para uso en un método para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal, en donde dicho método aumenta la expresión del transcrito de SMN2 y/o aumenta la inclusión de exón 7 en SMN2 y, por consiguiente, da como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN funcional de longitud completa.

Finalmente, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende haloperidol y moxifloxacino, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición farmacéutica comprende una razón molar de haloperidol:moxifloxacino de desde 1:5 hasta 1:10.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Índice de fusión de mioblastos inmortalizados derivados de pacientes con SMA de tipo II. (A) Las células se diferenciaron inicialmente durante 3 días y posteriormente se trataron con haloperidol durante las siguientes 72 h. Se usaron mioblastos sanos (control; abreviado como CON) y de SMA tratados con disolvente (DMSO al 0,5 %) para establecer una diferencia en el proceso de diferenciación. Se usó risdiplam a 1 µM como control positivo. Los núcleos se marcaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y los mioblastos se detectaron usando un anticuerpo anti-desmina. Los miotubos multinucleares están marcados con flechas blancas. Se calculó el índice de fusión de mioblastos diferenciados sanos y de SMA tratados con DMSO y de mioblastos de SMA tratados con el compuesto. Los datos se recopilaron después del análisis de al menos 100 células y las estadísticas se calcularon usando la prueba de la t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (B) Se adquirieron imágenes representativas del experimento bajo microscopía confocal.

Figura 2: Efecto del tratamiento con haloperidol sobre la tasa de supervivencia de las motoneuronas de SMA. (A) Imagen representativa de motoneuronas humanas (MN) teñidas usando el marcador neuronal (TUJ1) y fotos de fusión para el núcleo celular (DAPI), el marcador de diferenciación de MN (ISL1) y la proteína SMN (SMN) después del tratamiento con haloperidol a 320 nM, en comparación con MN sanas (WT) y control con disolvente DMSO (SMA). (B) Análisis de la tasa de supervivencia de las MN de SMA después de 10 días de tratamiento a un intervalo de concentraciones. (C) Niveles relativos de expresión de SMN (delta F) medidos mediante un método de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF). Se usó kenpaulona (Ken) a 10 µM como control positivo en esos experimentos.

Figura 3: Efecto del tratamiento con haloperidol sobre el cocultivo de motoneuronas (MN) y mioblastos. Las motoneuronas de SMA de tipo I (SMA) o sanas derivadas de células madre pluripotentes inducidas se cocultivaron con mioblastos de SMA de tipo I o sanos diferenciados en miotubos. (A) Análisis de la tasa de supervivencia de las

MN derivadas de SMA después del tratamiento con haloperidol en comparación con controles no tratados (SMA), MN normal (WT) y control positivo con kenpaulona (Ken). (B) Análisis del área de miotubos de SMA en comparación con los mismos controles que los anteriores. (C) Imágenes representativas de cocultivo tratado con haloperidol a 320 nM, en comparación con células de tipo natural (WT) tratadas con disolvente y células de SMA tratadas con DMSO solo o kenpaulona de control positivo (Ken). Los miotubos se marcaron usando el marcador MF20 (verde oscuro), las MN se marcaron con ISL1 (rojo), los receptores de acetilcolina se marcaron con AChR (verde claro) y los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst (azul).

Figura. 4. Efecto del tratamiento con haloperidol sobre el peso y el rendimiento motor de ratones SMN Δ7. A partir de P5 (día 5 postnatal), los ratones tratados muestran un aumento de peso notable (A) y mejoras significativas en el rendimiento motor, tal como lo demuestra la suspensión de la cola (B), el reflejo de enderezamiento (C) y las pruebas de geotaxia negativa (D). VHL (vehículo, solución salina al 0,9 % con DMSO al 2 %) n=8, HALO (haloperidol) n=5. Los resultados se expresan como media ± EEM (ANOVA bifactorial, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

Figura. 5. Análisis de la expresión de SMN mediante inmunotransferencia de tipo Western. En P12, se evaluó la expresión de SMN en muestras de médula espinal (A1 y A2), diafragma (B1 y B2), cuádriceps (C1 y C2) y gastrocnemio (D1 y D2): se observó respectivamente un aumento de la expresión de SMN del 58 %, 23 %, 123 % y 102 % en los ratones tratados con HALO (haloperidol) en comparación con los ratones tratados con VHL (vehículo, solución salina al 0,9 % con DMSO al 2 %) (3 HALO frente a 3 VHL).

Figura. 6. Efecto de haloperidol y moxifloxacino sobre la tasa de supervivencia de las motoneuronas de SMA. Las células se trataron con 7 concentraciones de cada fármaco por separado y se midió la tasa de supervivencia después de 10 días de tratamiento.

Figura 7. Efecto de haloperidol en combinación con moxifloxacino sobre la tasa de supervivencia de las motoneuronas de SMA. Las células se trataron con 49 combinaciones de haloperidol y moxifloxacino a diferentes concentraciones y se midió la tasa de supervivencia después de 10 días de tratamiento.

Figura 8. Representación bidimensional del análisis del efecto sinérgico. Los efectos sinérgicos y antagónicos de las combinaciones de haloperidol y moxifloxacino se representaron gráficamente en un gráfico de contorno bidimensional donde el eje x y el eje y representan las dosis de haloperidol y moxifloxacino, respectivamente.

Figura 9. El efecto de haloperidol sobre la morfología de las fibras musculares en los músculos esqueléticos de ratones delta 7. Comparación de la morfología de fibras del cuádriceps entre ratones delta 7 SMA tratados con tratamiento simulado (solución salina al 0,9 % con DMSO al 2 %) y con haloperidol en P12. Las mediciones del área de fibra muscular (A), el perímetro (B) y el diámetro de Feret máximo y mínimo de las fibras musculares (C). Se analizaron al menos 100 fibras de cada animal; los resultados se muestran como promedios obtenidos de los animales individuales. Los datos se expresan como media ± EEM, $n \geq 4$ por grupo, prueba de la t de Student: **$p < 0,005$; ***$p < 0,0005$.

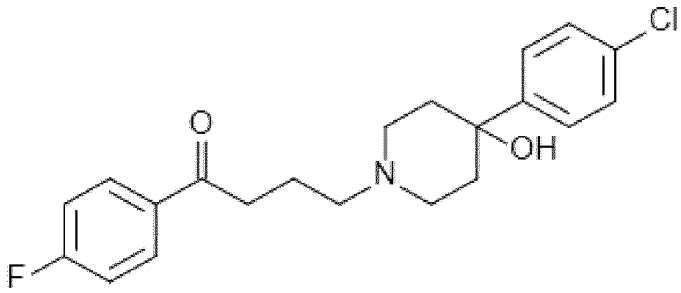
Figura 10. El efecto de haloperidol sobre la inervación de los músculos del cuádriceps de ratones delta 7 SMA. Cuantificación del porcentaje de NMJ monoinervadas, multiinervadas y desnervadas en muestras de cuádriceps de ratones delta 7 SMA tratados con haloperidol y con tratamiento simulado (solución salina al 0,9 % con DMSO al 2 %). Los datos se expresan como media ± EEM, n = 4 por grupo, prueba de la t de Student: ****$p < 0,001$

Descripción detallada

La presente invención está definida por las reivindicaciones. Las referencias a métodos de tratamiento en la descripción detallada de la invención en esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

La presente invención se refiere a haloperidol, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal. Este método puede dar como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN funcional de longitud completa.

El haloperidol es un fármaco antipsicótico que se conoce que atraviesa la barrera hematoencefálica y es un potente antagonista del receptor de dopamina 2, que está indicado para el tratamiento de las manifestaciones de varios trastornos psicóticos incluyendo la esquizofrenia, la psicosis aguda, el síndrome de Tourette, y otros trastornos graves del comportamiento. Además, el haloperidol también se ha usado para el tratamiento de la corea asociada con la enfermedad de Huntington o en cuidados paliativos, probablemente, como agente antiemético.



Haloperidol

A este respecto, la presente invención muestra que, sorprendentemente, además de los efectos metabólicos conocidos en la técnica, la administración de haloperidol puede dar como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN funcional de longitud completa, un efecto que hace que dicho compuesto sea útil en el tratamiento de la atrofia muscular espinal.

De hecho, el ejemplo 1 muestra que el haloperidol produjo un aumento significativo en los niveles de proteína SMN y, en particular, produjo un aumento significativo en la isoforma funcional de longitud completa de SMN2, tal como se muestra en el ejemplo 2.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a haloperidol, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal, en donde dicho método da como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN funcional de longitud completa, en particular, en donde dicho método aumenta la expresión del transcrito de SMN2 y/o aumenta la inclusión de exón 7 en SMN2.

Tal como se usa en el presente documento, una proteína SMN o SMN2 funcional de longitud completa puede ser cualquier proteína SMN o SMN2 funcional de longitud completa. Esto también implica que se prevén todas las isoformas de esta proteína. La presente invención también contempla que la proteína SMN o proteína SMN2 de longitud completa funcional tiene una secuencia que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % o el 100 % con una secuencia tal como se expone en SEQ ID NO. 5. La presente invención contempla que la proteína SMN funcional de longitud completa tiene una secuencia tal como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO. 5 a SEQ ID NO. 8.

Según la presente invención, el término “identidad” o “porcentaje de identidad” en el contexto de la proteína SMN o SMN2 de la secuencia de SEQ ID NO. 5 se refiere a dos o más secuencias polipeptídicas que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de aminoácidos que son iguales (por ejemplo, al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad) cuando se comparan con SEQ ID NO. 5 y se alinean para una correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación, o a lo largo de una región designada tal como se mide usando una comparación de secuencias tal como se conoce en la técnica o mediante alineación manual e inspección visual. Las secuencias que tienen, por ejemplo, el 85 % o más de identidad se consideran sustancialmente idénticas. Los expertos en la técnica saben cómo determinar el porcentaje de identidad entre secuencias usando, por ejemplo, algoritmos tales como los basados en el programa informático CLUSTALW (Thompsom Nucl. (1994)) o FASTDB (Brutlag *et al.* (1990)) tal como se conoce en la técnica. También están disponibles para los expertos en esta técnica los algoritmos BLAST y PSI-BLAST (Altschul *et al.* 1977)). El programa BLASTP para secuencias de aminoácidos usa como valor predeterminado un tamaño de palabra (W) de 6, un umbral de expectativa de 0,05 y una comparación de ambas cadenas. Además, puede usarse la matriz de puntuación BLOSUM 62 (Henikoff y Henikoff (1992)). Por ejemplo, puede usarse BLAST2.6, una herramienta de búsqueda de alineación local básica (Altschul. Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul. (1993), 290-300; Altschul *et al.* (1990), 403-410), para buscar alineaciones de secuencias locales.

Se prevé además que el método de la presente invención aumente el número de contactos sinápticos de las uniones neuromusculares en comparación con el número de contactos sinápticos de las uniones neuromusculares antes de administrar haloperidol. También se contempla que el método de la presente invención reduzca el número de placas motoras desnervadas en comparación con el número de placas motoras desnervadas antes de administrar haloperidol. En el ejemplo 9 y la figura 10 se describe cómo pueden medirse los contactos sinápticos de las uniones neuromusculares o de las placas motoras desnervadas.

Además, se prevé que el método de la presente invención aumente el área de fibra, el perímetro de fibra y el diámetro de Feret en comparación con el área de fibra, el perímetro de fibra y el diámetro de Feret antes de

administrar haloperidol. En el ejemplo 8 y la figura 9 se describe cómo pueden medirse el área de fibra, el perímetro de fibra y el diámetro de Feret.

El término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier sal farmacéuticamente aceptable, que al administrarse al paciente es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto tal como se describe en el presente documento. Tales sales son preferiblemente sales de adición de ácido con ácidos orgánicos o inorgánicos fisiológicamente aceptables, o sales de adición de álcali con bases orgánicas o inorgánicas aceptables. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido mineral tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato, y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, lactato, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. Los ejemplos de sales de adición de álcali incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio y amonio, y sales alcalinas orgánicas tales como, por ejemplo, sales de etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, trietanolamina y aminoácidos básicos. Sin embargo, se apreciará que las sales no farmacéuticamente aceptables también se encuentran dentro del alcance de la invención, ya que pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. Los procedimientos para la formación de sales son convencionales en la técnica. Preferiblemente, dicha sal de haloperidol farmacéuticamente aceptable es lactato de haloperidol.

El término “éster farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier forma del compuesto activo según la invención en la que el grupo hidroxilo del haloperidol forma un éster con un ácido carboxílico. Preferiblemente, dicho éster de haloperidol farmacéuticamente aceptable es decanoato de haloperidol.

El término “solvato farmacéuticamente aceptable” según esta invención debe entenderse como cualquier forma del compuesto activo según la invención en la que dicho compuesto está unido por un enlace no covalente a otra molécula (normalmente un disolvente polar), incluyendo especialmente hidratos y alcoholatos.

Por tanto, la presente invención muestra que el haloperidol, una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, es útil en la prevención y/o el tratamiento de SMA. En este sentido, los ejemplos de la presente solicitud muestran que, además del efecto de haloperidol en los niveles de proteína SMN, el tratamiento con haloperidol tuvo, como consecuencia, efectos sobre los mioblastos y las motoneuronas.

De hecho, se ha descrito que los mioblastos deficientes en SMN, tales como los de los pacientes con SMA, tienen capacidades de fusión alteradas. En este sentido, los mioblastos tratados con haloperidol aumentaron significativamente el índice de fusión, recuperando esta capacidad hasta el 66,7 % (en comparación con una tasa de fusión de aproximadamente el 68 % para los mioblastos sanos) cuando los mioblastos de pacientes la han reducido al 50 % (figura 1). Además, la administración de haloperidol también resultó en una mayor tasa de supervivencia de las motoneuronas (figuras 2 y 3) y aumentó el área de miotubos con respecto a los controles no tratados en cocultivos de MN de SMA y miotubos de SMA (figura 3).

Finalmente, los ensayos *in vivo* realizados en un modelo murino de SMA mostraron que la administración de haloperidol dio como resultado un aumento de peso significativo en los ratones con SMA tratados y, además, la evaluación del comportamiento mostró que la administración de haloperidol mejoró el rendimiento motor (figura 4). De hecho, los resultados conductuales y el rendimiento motor mejorado se correlacionaron positivamente con el aumento de la expresión de SMN en varios tejidos (médula espinal, diafragma, cuádriceps y gastrocnemio) proporcionado por la administración de haloperidol (figura 5) y no se asociaron con ningún efecto secundario notablemente perjudicial o indeseable, tales como cambios de comportamiento o fenotipos de sedación.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende haloperidol, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; para uso en un método para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal. El método puede dar como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN funcional de longitud completa, en particular, en donde dicho método puede aumentar la expresión del transcrito de SMN2 y/o aumentar la inclusión de exón 7 en SMN2 y, por consiguiente, da como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN funcional de longitud completa.

Se prevé además que la composición farmacéutica de la presente invención aumente el número de contactos sinápticos de las uniones neuromusculares en comparación con el número de contactos sinápticos de las uniones neuromusculares antes de la administración o en ausencia de dicha composición farmacéutica o en comparación con un control. También se contempla que la composición farmacéutica de la presente invención reduzca el número de placas motoras desnervadas en comparación con el número de placas motoras desnervadas antes de administrar dicha composición farmacéutica o en comparación con un control. En el ejemplo 9 y la figura 10 se describe cómo pueden medirse los contactos sinápticos de las uniones neuromusculares o de las placas motoras desnervadas.

Además, se prevé que la composición farmacéutica de la presente invención aumente el área de fibra, el perímetro de fibra y el diámetro de Feret en comparación con el área de fibra, el perímetro de fibra y el diámetro de Feret en

ausencia de dicha composición farmacéutica. En el ejemplo 8 y la figura 9 se describe cómo pueden medirse el área de fibra, el perímetro de fibra y el diámetro de Feret. A los efectos de la presente invención, el término “comprende” puede reemplazarse por cualquiera de los términos “consiste en” o “consiste esencialmente en”. Por consiguiente, “comprende” puede referirse a un grupo de características A, B y C, que además puede incluir otras características, tales como E y D, con la condición de que dichas características no hagan inviable la reivindicación, pero dicho término “comprende” también incluye la situación en la que el grupo de características “consiste en” o “consiste esencialmente” en A, B y C.

El excipiente incluido en las composiciones farmacéuticas para uso según la presente invención se refiere, a efectos de la presente invención, a un componente inerte tal como, pero no limitado a, codisolventes, tensioactivos, aceites, humectantes, emolientes, conservantes, estabilizantes y antioxidantes.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de haloperidol, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o al uso de una composición farmacéutica que comprende el mismo, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la atrofia muscular espinal. Dicho medicamento puede dar como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN funcional de longitud completa y, en particular, en donde la administración de dicho medicamento puede aumentar la expresión del transcrito de SMN2 y/o aumentar la inclusión de exón 7 en SMN2.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal, en donde dicho método comprende administrar una cantidad eficaz de haloperidol, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o de una composición farmacéutica que comprende el mismo, a un sujeto que lo necesita. Preferiblemente, dicho método da como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN funcional de longitud completa y, en particular, dicho método aumenta la expresión del transcrito de SMN2 y/o aumenta la inclusión de exón 7 en SMN2.

En una realización preferida de la invención, el sujeto es un sujeto pediátrico. En otra realización preferida de la invención, el sujeto es un adulto.

Un aspecto preferido de la invención se refiere a haloperidol, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o a una composición farmacéutica que comprende el mismo, para uso en un método para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal, en donde dicho haloperidol, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o composición farmacéutica que comprende el mismo se administra a un sujeto pediátrico o a un adulto.

A efectos de la presente invención, una cantidad eficaz de los compuestos dados a conocer en el presente documento, cuando dicha cantidad eficaz se refiere a un uso terapéutico de dichos compuestos, es aquella que proporciona un efecto terapéutico en el sujeto o una mejora objetivamente identificable en el estado de salud de dicho sujeto según lo observado por el médico u otro observador calificado.

En una realización preferida, dicha sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, es lactato de haloperidol o decanoato de haloperidol. Preferiblemente, la atrofia muscular espinal es de tipo I, tipo II, tipo III o tipo IV. En este sentido, el tipo 1 se presenta en bebés de 6 meses de edad o menos; el tipo 2 se presenta en bebés de 7 a 18 meses de edad; el tipo 3 se presenta a los 19 meses de edad o mayor, y el tipo 4 afecta a los adultos.

Más preferiblemente, la atrofia muscular espinal es tipo IA, tipo IB, tipo IC, tipo IIA, tipo IIB, tipo IIIA, tipo IIIB o tipo IV.

En una realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento pueden comprender opcionalmente al menos un segundo agente terapéutico que tenga actividades biológicas aditivas o sinérgicas. A efectos de la presente invención, el término “agente terapéutico” debe tomarse como sinónimo y significar una entidad química que ejerce efectos terapéuticos cuando se administra a seres humanos o animales.

Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, el haloperidol, o dicha sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica que comprende el mismo, se administra antes de, junto con, o después de administrar un agente terapéutico adicional para uso en el tratamiento de la atrofia muscular espinal.

En una realización de la presente invención, dicho agente terapéutico adicional es una terapia de reemplazo del gen SMN, un modificador de corte y empalme de SMN2, un agente de mejora muscular, un inhibidor de p38 MPAK, una antimiostatina, un modificador del canal de calcio o una terapia de activación de troponina.

Preferiblemente, dicho agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en: moxifloxacino, nusinersen, onasemnogén abeparvovec (AVXS-101), risdiplam (RO703406 o RG7916), BIIB110, inhibidor de Columbia/NU-p38aMAPK, branaplam (LMI070), anticuerpo monoclonal SRK-015, albuterol, modificador de corte y empalme RG7800, proteína recombinante RO7239361, reldesemtiv, azitromicina, bortezomib y trocostatina A o una

combinación de los mismos.

El moxifloxacino (nombre IUPAC ácido 1-ciclopropil-7-[(1S,6S)-2,8-diazabiciclo[4.3.0]nonan-8-il]-6-fluoro-8-metoxi-4-oxoquinolina-3-carboxílico) es un antibiótico con un núcleo estructural de quinolona que puede aumentar los niveles de proteína SMN de longitud completa al promover la inclusión de exón 7 en SMN2 de una manera dependiente de la concentración.

Nusinersen es un oligonucleótido antisentido modificado con fosforotioato de 2'-O-metoxietilo que promueve la inclusión de exón 7 en los transcritos de *SMN2* mediante el bloqueo a través del impedimento estérico de un silenciador de corte y empalme.

Onasemnogén abeparvovec, conocido anteriormente como AVXS-101 (Zolgensma®), es una terapia de reemplazo génico que usa una cápside de virus adenoasociado no replicante (scAAV9) para administrar una copia funcional del gen SMN a las células de la motoneurona.

Risdiplam, también conocido como RO703406 o RG7916 (Evrysdi®), es una pequeña molécula que promueve la inclusión de exón 7 en el pre-ARNm de SMN2, proporcionando una mayor expresión de la proteína SMN funcional de longitud completa.

En una realización preferida, dicho agente terapéutico adicional es moxifloxacino, nusinersen o risdiplam, o una combinación de los mismos. Más preferiblemente, dicho agente terapéutico adicional es nusinersen o risdiplam, o una combinación de los mismos. Incluso más preferiblemente, dicho agente terapéutico adicional es moxifloxacino o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

De hecho, la administración combinada de haloperidol y moxifloxacino proporciona una actividad sorprendentemente mejorada, proporcionando un efecto sinérgico, tal como se muestra en el ejemplo 7. De hecho, el ejemplo 7, así como las figuras 7 y 8, muestran el efecto sinérgico de la combinación de moxifloxacino y haloperidol (administración combinada de los mismos) sobre la tasa de supervivencia de las motoneuronas de SMA usando el modelo de independencia de Bliss para analizar la interacción entre fármacos (Thas *et al.*, 2021; Van der Borght *et al.*, 2017).

Las figuras 7 y 8 muestran que la combinación de ambos fármacos, moxifloxacino y haloperidol, mejora la supervivencia de las motoneuronas en mayor medida que los fármacos administrados por separado, incluso cuando moxifloxacino y haloperidol se administran por separado a dosis más altas.

Por tanto, incluso más preferiblemente, el haloperidol, o dicha sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica que comprende el mismo, se administra antes de, junto con, o después de administrar moxifloxacino, proporcionando dicha administración combinada una actividad sinérgica (superior a aditiva), en la prevención y/o el tratamiento de la atrofia muscular espinal, en comparación con la actividad que dichos compuestos proporcionan cuando se administran por separado. En una realización preferida, el haloperidol para uso, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra junto con moxifloxacino, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, preferiblemente en una composición farmacéutica que comprende haloperidol y moxifloxacino, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Más preferiblemente, dicho haloperidol para uso se administra antes de, junto con, o después de administrar moxifloxacino a una razón molar de haloperidol:moxifloxacino de desde 1:5 hasta 1:10; o dicho haloperidol para uso se administra en una composición farmacéutica que comprende haloperidol y moxifloxacino, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, a una razón molar de haloperidol:moxifloxacino de desde 1:5 hasta 1:10.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende haloperidol y moxifloxacino, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición farmacéutica comprende una razón molar de haloperidol:moxifloxacino de desde 1:5 hasta 1:10.

Una realización se refiere a dicha composición farmacéutica que comprende haloperidol y moxifloxacino, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición farmacéutica comprende una razón molar de haloperidol:moxifloxacino de desde 1:5 hasta 1:10; para uso como medicamento, y en particular, para uso en la prevención y/o el tratamiento de la atrofia muscular espinal.

También se da a conocer el uso de dicha composición farmacéutica que comprende haloperidol y moxifloxacino, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la atrofia muscular espinal, y en donde dicho medicamento comprende una razón molar de haloperidol:moxifloxacino de desde 1:5 hasta 1:10.

Además, se da a conocer un método para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal, en donde dicho método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende haloperidol y moxifloxacino, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, a un sujeto que lo necesita, en donde dicha composición farmacéutica comprende una razón molar de haloperidol:moxifloxacino de desde 1:5 hasta 1:10.

Además, la administración combinada de haloperidol con risdiplam y/o nusinersen también proporciona una actividad sorprendentemente mejorada (datos no mostrados). Por consiguiente, más preferiblemente, el haloperidol, o dicha sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica que comprende el mismo, se administra antes de, junto con, o después de administrar risdiplam y/o nusinersen.

Además, la dosificación de los compuestos y composiciones dados a conocer según la invención varía dependiendo del compuesto y la afección que está tratándose, por ejemplo, la edad, el peso, y el estado clínico del paciente receptor, así como de su uso en combinación con otros agentes terapéuticos. Otros factores incluyen: la vía de administración, el paciente, el historial médico del paciente, la gravedad del proceso patológico, y la potencia del compuesto particular. La dosis, o cantidad eficaz, debe ser suficiente para mejorar los síntomas o signos de la enfermedad tratada sin producir una toxicidad inaceptable para el paciente.

Una realización preferida dada a conocer en el presente documento se refiere a la vía de administración, que puede ser cualquier vía que transporte eficazmente los compuestos y composiciones dados a conocer en la presente divulgación, a los sitios de acción apropiados o deseados, tales como oral, nasal, tópica, pulmonar, transdérmica, intratecal o parenteral, por ejemplo, rectal, subcutánea, intravenosa, intrauretral, intramuscular, intranasal, disolución oftálmica o pomada.

Preferiblemente, el haloperidol, o dicha sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o las composiciones farmacéuticas que comprenden haloperidol solo o en combinación con otros agentes terapéuticos, y en particular que comprenden haloperidol y moxifloxacino, se administran por vía oral, intratecal o parenteral, más preferiblemente por vía oral, intratecal o mediante vía de administración transdérmica.

Para la administración oral, pueden prepararse formas de dosificación unitarias o bien sólidas o bien líquidas. Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, los compuestos para uso según la presente invención se mezclan en formulaciones con componentes convencionales tales como talco, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio, silicato de magnesio y aluminio, sulfato de calcio, almidón, lactosa, goma arábiga, metilcelulosa, y materiales funcionalmente similares como diluyentes o portadores farmacéuticos.

Las cápsulas se preparan mezclando los compuestos para uso según la presente invención con un diluyente farmacéutico inerte y llenando la mezcla en una cápsula de gelatina dura de tamaño apropiado. Las cápsulas de gelatina blanda se preparan mediante encapsulación a máquina de una suspensión del compuesto con un aceite vegetal aceptable, vaselina líquida ligera u otro aceite inerte. Pueden prepararse formas de dosificación unitarias fluidas para administración oral, tales como jarabes, elixires y suspensiones. Las formas solubles en agua pueden disolverse en un vehículo acuoso junto con azúcar, agentes aromatizantes y conservantes para formar jarabe. Un elixir se prepara usando un vehículo hidroalcohólico (por ejemplo, etanol) con edulcorantes adecuados tales como azúcar y sacarina, junto con un agente aromatizante aromático. Las suspensiones pueden prepararse con un vehículo acuoso con la ayuda de un agente de suspensión tal como goma arábiga, tragacantina, metilcelulosa y similares.

Las composiciones farmacéuticas incluyen los compuestos descritos en la presente solicitud asociados con excipientes farmacéuticamente aceptables, que pueden ser un portador o un diluyente, a modo de ejemplo. Tales composiciones pueden incluirse en una cápsula, sobre, papel u otro recipiente. En la elaboración de las composiciones pueden usarse técnicas convencionales para la preparación de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, los compuestos para uso según la presente invención pueden mezclarse con un portador, o diluirse con un portador, o encerrarse dentro de un portador que puede tener la forma de una ampolla, cápsula, sobre, papel, u otros recipientes. Cuando el portador actúa como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido, o líquido que actúa como vehículo, excipiente, o medio para el compuesto activo. Los compuestos para uso según la presente invención pueden adsorberse en un recipiente sólido granular, por ejemplo, en un sobre. Algunos ejemplos de portadores adecuados son agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, aceite de ricino polihidroxietoxilado, aceite de cacahuete, aceite de oliva, lactosa, terra alba, sacarosa, ciclodextrina, amilosa, estearato de magnesio, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, ácido esteárico o éteres de alquilo inferior de celulosa, ácido silícico, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de pentaeritritol, polioxietileno, hidroximetilcelulosa, y polivinilpirrolidona. De manera similar, el portador o diluyente puede incluir cualquier material de liberación sostenida conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera. Dichas composiciones pueden incluir también agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes o agentes aromatizantes. Las composiciones para uso según la invención pueden formularse de manera que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada de los compuestos para uso según la presente invención después de la administración al paciente empleando procedimientos bien conocidos en la

técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse y mezclarse, si se desea, con agentes auxiliares, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones y/o sustancias colorantes y similares, que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos para uso según la presente invención.

Además de los compuestos para uso según la presente invención, las composiciones para uso según la invención pueden incluir, dependiendo de la composición y el modo de administración deseados, portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables y no tóxicos, que incluyen vehículos comúnmente usados para formar composiciones farmacéuticas para administración a animales o seres humanos. Los diluyentes se seleccionan de manera que no afecten indebidamente la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes que son especialmente útiles para formulaciones inyectables son agua, diversas soluciones salinas orgánicas o inorgánicas, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica puede incluir aditivos tales como otros portadores, adyuvantes; o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

Además, pueden incluirse excipientes en las composiciones descritas. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, codisolventes, tensioactivos, aceites, humectantes, emolientes, conservantes, estabilizadores y antioxidantes. Puede usarse cualquier tampón farmacológicamente aceptable, tal como, por ejemplo, tampones tris o fosfato. Las cantidades eficaces de diluyentes, aditivos, y excipientes son aquellas cantidades que son eficaces para obtener una formulación farmacéuticamente aceptable en cuanto a solubilidad, actividad biológica, etc.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos para uso según la presente invención pueden incorporarse en una microesfera. Los compuestos para uso según la presente invención pueden cargarse en microesferas de albúmina, de las cuales es posible recuperar tales microesferas en un polvo seco para administración nasal. Otros materiales adecuados para la preparación de microesferas incluyen agar, alginato, quitosano, almidón, hidroxietilalmidón, albúmina, agarosa, dextrano, ácido hialurónico, gelatina, colágeno, y caseína. Las microesferas pueden producirse mediante diversos procedimientos conocidos por el experto en la técnica, tales como un procedimiento de secado por pulverización o un procedimiento de emulsificación.

Otra realización preferida de la invención es el esquema de dosificación de los compuestos para uso según la presente invención. El término “forma de dosificación unitaria” se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos, por ejemplo, sujetos mamíferos, por ejemplo, seres humanos, perros, gatos, y roedores, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto farmacéutico deseado en asociación con el diluyente, portador o vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas de dosificación unitarias de esta invención están dictadas por y dependen de (a) las características únicas de los compuestos y extractos descritos anteriormente en el presente documento y el efecto particular que va a lograrse y (b) las limitaciones inherentes a la técnica en la que dichos compuestos o extractos se usan en seres humanos y animales. Ejemplos de formas de dosificación unitarias son comprimidos, cápsulas, píldoras, paquetes de polvo, obleas, supositorios, gránulos, sellos, cucharaditas, cucharadas, goteros, ampollas, viales, aerosoles con descargas medidas, múltiplos segregados de cualquiera de los anteriores y otras formas tal como se describe en el presente documento. Las composiciones descritas en el presente documento pueden incluirse en kits, que pueden contener una o más formas de dosificación unitarias de la composición e instrucciones de uso.

Pueden utilizarse sistemas de administración de liberación lenta o prolongada, incluyendo cualquiera de varios biopolímeros (sistemas de base biológica), sistemas que emplean liposomas, coloides, resinas y otros sistemas de administración poliméricos o reservorios compartimentados, con las composiciones descritas en el presente documento para proporcionar una fuente continua o de largo plazo del compuesto terapéutico.

En una realización de la presente invención, el haloperidol, o dicha sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y más preferiblemente decanoato de haloperidol, o una composición farmacéutica que comprende el mismo, se administra por vía de administración transdérmica, preferiblemente usando un parche cutáneo, o por vía de administración intratecal, preferiblemente usando una bomba con catéter de puerto intratecal. Por consiguiente, una realización de la invención se refiere a un parche cutáneo que comprende haloperidol, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica que comprende el mismo, y más preferiblemente que comprende una composición farmacéutica que comprende haloperidol y moxifloxacino, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos. En particular, una realización se refiere a dicho parche cutáneo como medicamento y, en particular, para uso según la presente invención, en la prevención y el tratamiento de la atrofia muscular espinal. Dicho parche cutáneo liberará lentamente el haloperidol, o la composición farmacéutica que comprende el mismo, disuelto en un aceite con administración intramuscular (decanoato de haloperidol), o incluso a través de una vía de administración intratecal usando una bomba con catéter de puerto intratecal.

Secuencias a las que se hace referencia en el presente documento:

SEQ ID NO.: 5; SMN Número de Uniprot: Q16637, versión 1 de 01-11-1996	MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDDSDIWDDTALIKAYDK AVASFKHALKNGDICETSGKPKTTPKRKPAKKNKSQKKNTAASLQQ WKVGDKCSAIWSEDGCIYPATIASIDFKRETCVVVYTGYGNREEQNL SDLLSPICEVANNIEQNAQENENESQVSTDESENSRSPGNKSDNIKP KSAPWNSFLPPPPPMPGPRLGPGKPGLKFNGPPPPPPPPPPHLLS CWLPPFPSGPPIIPPPPPICPDSLDDADALGSMLISWYMSGYHTGYY MGFRQNQKEGRCSHSLN
SEQ ID NO.: 6; SMN-delta5 Número de Uniprot: Q16637-2	MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDDSDIWDDTALIKAYDK AVASFKHALKNGDICETSGKPKTTPKRKPAKKNKSQKKNTAASLQQ WKVGDKCSAIWSEDGCIYPATIASIDFKRETCVVVYTGYGNREEQNL SDLLSPICEVANNIEQNAQENENESQVSTDESENSRSPGNKSDNIKP KSAPWNSFLPPPPPMPGPRLGPGKIIPPPPPICPDSLDDADALGSML ISWYMSGYHTGYYMGFRQNQKEGRCSHSLN
SEQ ID NO.: 7; SMN-delta7 Número de Uniprot: Q16637-3	MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDDSDIWDDTALIKAYDK AVASFKHALKNGDICETSGKPKTTPKRKPAKKNKSQKKNTAASLQQ WKVGDKCSAIWSEDGCIYPATIASIDFKRETCVVVYTGYGNREEQNL SDLLSPICEVANNIEQNAQENENESQVSTDESENSRSPGNKSDNIKP KSAPWNSFLPPPPPMPGPRLGPGKPGLKFNGPPPPPPPPPPHLLS CWLPPFPSGPPIIPPPPPICPDSLDDADALGSMLISWYMSGYHTGYY MEMLA
SEQ ID NO.: 8; SMN-delta57 Número de Uniprot: Q16637-3	MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDDSDIWDDTALIKAYDK AVASFKHALKNGDICETSGKPKTTPKRKPAKKNKSQKKNTAASLQQ WKVGDKCSAIWSEDGCIYPATIASIDFKRETCVVVYTGYGNREEQNL SDLLSPICEVANNIEQNAQENENESQVSTDESENSRSPGNKSDNIKP KSAPWNSFLPPPPPMPGPRLGPGKIIPPPPPICPDSLDDADALGSML ISWYMSGYHTGYYMEMLA

Ejemplos

Los ejemplos de la presente invención descritos a continuación tienen como objetivo ilustrar sus realizaciones preferidas sin limitar su ámbito de protección.

EJEMPLO 1: Evaluación de haloperidol en fibroblastos de SMA

Se evaluó el haloperidol en fibroblastos derivados de pacientes con atrofia muscular espinal de tipo II.

1.1. Métodos de cultivo celular

Se hicieron crecer fibroblastos derivados de pacientes con SMA (GM03813; Coriell Cell Repositories) a 37 ºC en frascos de cultivo celular con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco) y 4,5 g/ml de glucosa. El medio se complementó con penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 mg/ml) [P/S al 1 %; Gibco] y suero bovino fetal inactivado al 10 % (FBS; Gibco).

Para la extracción de ARN, se sembraron 400.000 fibroblastos GM03813 en placas de cultivo de 60 mm en 4 ml de medio DMEM complementado. Al día siguiente se cambió el medio y se añadió el compuesto candidato en su máxima concentración no tóxica. Las células se incubaron durante 48 horas y luego se lavaron con PBS 1x y se recogieron en tubos estériles de 1,5 ml. Se hizo lo mismo para la evaluación del efecto de haloperidol sobre el nivel de proteína SMN (ejemplo 2) con la diferencia de que se usaron 1.000.000 de fibroblastos en una placa de cultivo celular de 100 mm y que las células se recogieron después de 2 días con un tampón de extracción de proteína RIPA complementado con un cóctel de inhibidores de proteasa (cOmplete; Roche).

Para la inmunotinción, se sembraron 40.000 células de fibroblastos en una placa de 24 pocillos de 400 µl con medio DMEM complementado seguido de un cambio de medio con el tratamiento del compuesto candidato correspondiente. Las células se incubaron durante 72 h con compuestos candidatos y se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 10 min. Todos los cultivos celulares se incubaron a 37 ºC con el 5 % de CO_2.

1.2. Ensayos

Se incubaron fibroblastos derivados de pacientes con SMA de tipo II con haloperidol a tres concentraciones durante

72 h. Se separaron 10 µg de proteína extraída de células tratadas con haloperidol por electroforesis con geles de acrilamida/bis-acrilamida SDS-PAGE con el sistema de electroforesis Mini-protean (Bio-Rad). Después de realizar la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) usando un sistema de electrotransferencia semiseco (Bio-Rad) durante una hora con una tensión constante de 15 V. Las membranas se incubaron con una disolución de bloqueo (leche desnatada al 5 % en PBST, PBS 1x, Tween 20 al 0,1 %) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubaron a 4 ºC durante la noche con la disolución de bloqueo de anticuerpo primario frente a SMN, MANSMA1 (11F3; Developmental Studies Hybridoma Bank), y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se usó β-actina como control de carga, usando un anticuerpo contra β-actina y un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa.

Se detectó quimioluminiscencia usando el sustrato SuperSignal West Pico Sensitivity (Pierce) y se adquirió con ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Los niveles de SMN se midieron mediante inmunotransferencia de tipo Western y los resultados obtenidos se compararon con los de una muestra tratada con disolvente (DMSO al 0,5 %). La significancia estadística se calculó mediante la prueba de la t de Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Los resultados mostrados en la tabla 2 a continuación indican que el haloperidol produjo un aumento significativo en los niveles de proteína SMN en comparación con el control con DMSO.

Tabla 2: Niveles de proteína SMN

DMSO	25 µM	37,5 µM	50 µM
0,954352	1,131872	2,264963	2,412854
0,880324	1,750877	2,210711	2,452798
1,165324	1,745168	2,469305	2,614414
Prueba de la t	0,0842 (ns)	0,0003 (***)	0,0001 (***)

EJEMPLO 2: Efecto de haloperidol sobre los niveles de transcrito de SMN2

También se evaluó el efecto de haloperidol sobre el transcrito de SMN2.

2.1. Extracción de ARN y transcripción inversa

La extracción de ARN de las células se realizó 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 transcripción inversa del ARN de las células no incluye esta etapa. La concentración de ARN y la contaminación salina se midieron con el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher). Las muestras se almacenaron a -80 ºC. Se retrotranscribió 1 µg de ARN total usando la retrotranscriptasa SuperScript III (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se monitorizó la contaminación del ADN genómico en las muestras de ARN sin la adición de retrotranscriptasa.

2.2. Reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Para la cuantificación de los transcritos de SMN2 de longitud completa (FL) y SMN2 sin exón 7 (Δ7), se usó qPCR Probe Mix (Solis Biodyne). La reacción se llevó a cabo de manera múltiplex, en la que se leyó la señal de la sonda de SMN2 y GAPDH en una sola reacción. Se usaron 10 ng de ADNc como patrón y la concentración de ambas sondas fue de 250 nM.

Los conjuntos de cebadores para la detección de las isoformas de FL o Δ7 de SMN2 se usaron a una concentración final de 500 nM, mientras que la concentración del conjunto de cebadores usado para GAPDH fue de 150 nM. Todas las reacciones se llevaron a cabo con un termociclador de PCR en tiempo real Step-One (Applied Biosystems). En todos los casos, el experimento incluyó 3 muestras biológicas y tres réplicas técnicas para cada muestra. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto al gen de referencia usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los cebadores se obtuvieron de Naryshkin, N. A. *et al.* Science (2014) 345, 688-693.

Tabla 3: conjunto de cebadores para la detección de las isoformas de FL o Δ7 de SMN2

SEQ ID NO.: 1 (FL de SMN2, directo)	GCTCACATTCCTTAAATTAAGGAGAAA
SEQ ID NO.: 2 (Δ7 de SMN2, directo)	TGGCTATCATACTGGCTATTATATGGAA
SEQ ID NO.: 3 (SMN2, inverso, ambas)	TCCAGATCTGTCTGATCGTTTCTT
SEQ ID NO.: 4 (SMN2, sonda TaqMan)	/5’ 6-FAM/-CTGGCATAGAGCAGCACTAAATGACACCAC-/3’ BHQ_1/

2.3. Ensayos

La línea de fibroblastos de SMA seleccionada tiene 3 copias del gen SMN2 y una deleción homocigótica de Ex7-Ex8 en SMN1 y, por tanto, sólo se midieron los transcritos del gen SMN2. Las condiciones para los cultivos celulares y los protocolos de extracción se describen en el ejemplo 1.

El haloperidol aumenta los niveles de proteína SMN y aumenta significativamente la isoforma de FL de SMN2 tal como se muestra en la tabla 4 a continuación:

Tabla 4. Niveles de isoformas de FL y Δ7 de SMN2. Los resultados se muestran de cada una de las 3 muestras usadas.

	DMSO			10 µM			25 µM			37,5 µM			50 µM		
FL de *SMN2*	0,98	0,96	1,05	1,10	1,03	1,06	1,15	1,37	1,07	1,32	1,47	1,51	2,54	2,11	2,33
Δ7 de *SMN2*	0,98	0,98	1,04	0,90	0,89	0,89	1,00	1,06	1,04	0,96	1,01	1,03	1,89	1,23	1,23
Prueba de la t	ns			ns			ns			FL=**			FL=***/ Δ7=*		

Tal como se observa en la tabla 4, la isoforma de FL, que incluye el exón 7, aumenta junto con la concentración de haloperidol, mientras que la isoforma de Δ7 que excluye el exón 7 no cambia de manera dependiente de la dosis. El análisis cuantitativo de las isoformas mostró que, en la concentración más alta, el haloperidol duplicó la cantidad de transcrito de FL de SMN2, lo que es coherente con lo observado con respecto al nivel de proteína SMN.

EJEMPLO 3: Evaluación de haloperidol en mioblastos de pacientes con SMA

Se ha descrito que los mioblastos deficientes en SMN tienen capacidades de fusión deterioradas. Se sometió a prueba haloperidol para determinar su capacidad para restablecer la capacidad de los mioblastos de formar miotubos multinucleares.

3.1. Métodos de cultivo celular

Los mioblastos derivados de pacientes con SMA de tipo II (KM1150SMAII7PV; Institut de Myologie, París) y los mioblastos de control (AB1190; Institut de Myologie, París) se hicieron crecer a 37 ºC con el 5 % de CO_2 en frascos de cultivo celular con un medio KMEM que consistía en 4 vol de DMEM Glutamax 4,5 g (Gibco) + 1 vol de medio 199 (Gibco) complementado con suero bovino fetal inactivado al 20 % (FBS; Gibco), fetuína (25 µg/ml; Life Technologies), hEGF (5 ng/ml; Life Technologies), bFGF (0,5 ng/ml; Life Technologies), insulina (5 g/ml; Sigma), dexametasona (0,2 µg/ml; Sigma), penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 mg/ml) [P/S al 1 %; Gibco].

Para la inmunotinción de mioblastos, se sembraron 40.000 células en una placa de 24 pocillos (previamente cubierta con colágeno) con 400 µl de medio KMEM y se incubaron durante la noche. Al día siguiente se cambió el medio por medio de diferenciación DMEM Glutamax 4,5 g (Gibco) complementado con suero de caballo al 2 % (Sigma); penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 mg/ml) [P/S al 1 %; Gibco], gentamicina (50 µg/ml; Sigma) e insulina (10 µg/ml; Sigma). Después de 72 h se cambió el medio y se administró el tratamiento con el compuesto correspondiente (haloperidol 2,5 µM; risdiplam 1 µM). Las células se incubaron durante 72 h con los compuestos y se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos. Todos los cultivos celulares se incubaron a 37 ºC con el 5 % de CO_2.

3.2. Ensayos

Se ha descrito que los mioblastos deficientes en SMN tienen capacidades de fusión deterioradas. Se sometió a prueba haloperidol para determinar su capacidad para restablecer la capacidad de los mioblastos de formar miotubos multinucleares. Para ello, se usaron dos líneas celulares inmortalizadas: una derivada de pacientes con SMA de tipo II (SMA; ref. KM1150SMAII7PV) y una de control sano (CON; ref. AB1190). Para ello, los mioblastos se trataron con haloperidol 2,5 µM durante 72 h y las células se tiñeron para detectar desmina, una proteína específica de las células musculares. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Los mioblastos se sembraron en placas de 24 pocillos (previamente tratadas con colágeno) en 400 µl de KMEM, con 40.000 células por pocillo, y se incubaron durante la noche a 37 ºC. Al día siguiente, las células se cambiaron a medio de diferenciación en el que se incubaron durante 3 días. Al día siguiente, las células se cambiaron de medio y se trataron con DMSO (0,5 %), haloperidol a 2,5 µM y risdiplam a 1 µM (control positivo), diluido con DMSO al 0,5 %. Las células se incubaron durante 72 h y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos. La membrana celular se permeabilizó con PBST 1x (PBS 1x, Triton X-100 al 0,3 %) durante 15 minutos con incubación posterior en tampón de bloqueo (PBST 1x, suero de cabra normal al 1 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo monoclonal primario anti-desmina (ratón, Millipore) se diluyó con tampón de bloqueo (1:50) y se incubó durante la noche a 4 ºC. Las células se lavaron 3x con PBS-T (5 min) y el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con biotina se diluyó con tampón de bloqueo (1:200) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS-T, las células se incubaron con

disolución ABC (kit ABC, VECTASTAIN) durante 45 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavados con PBS-T e incubación con estreptavidina-FITC (1:200) durante 2 h. Finalmente, las células se lavaron con PBS 1x y los núcleos se tiñeron con DAPI en medio de montaje (Vectashield).

Se observó que los mioblastos tratados con haloperidol aumentaron significativamente el índice de fusión (número de células con más de 2 núcleos dividido entre el número total de células). El índice de fusión se calculó para células sanas tratadas con DMSO al 0,5 % (CON al 0,5 %), células de pacientes tratadas con DMSO al 0,5 %, células de pacientes tratadas con el control positivo risdiplam (1 µM) y células de pacientes tratadas con haloperidol (2,5 µM). Se observó que los mioblastos sanos tenían un índice de fusión de aproximadamente el 68 % cuando los mioblastos del paciente lo redujeron al 50 %. Tanto el tratamiento con risdiplam como con haloperidol fueron capaces de restablecer casi totalmente la capacidad de fusión de los mioblastos de SMA, recuperándose esta capacidad hasta el 66,7 % (Figura 1A). Las imágenes (figura 1B) se tomaron con un microscopio confocal LSM 800 (Zeiss).

EJEMPLO 4. Evaluación de haloperidol en motoneuronas derivadas de hiPSC de pacientes con SMA

4.1. Métodos de cultivo celular

Las células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) se derivaron en el Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases (ISTEM) a partir de fibroblastos primarios humanos obtenidos de Coriell (para el control: GM03814; para SMA: GM00232) y se reprogramaron usando vectores sendai que expresan OCT4, KLF4, SOX2 y c-Myc tal como se describió anteriormente [Fusaki *et al.*, 2009].

Para la diferenciación de las motoneuronas espinales (MN) a partir de hiPSC, se usó un protocolo descrito previamente [Maury *et al.*, 2015]. Las HiPSC se incubaron en suspensión en un medio de inducción neuronal que contenía DMEM/F12 y medio neurobasal complementado con B27 (Life Technologies), suplemento N_2 (Life Technologies), pen-estrep al 0,1 %, β-mercaptoetanol (β-ME) al 0,1 % (Life Technologies), ácido ascórbico (0,5 µM, Sigma-Aldrich), Chir99021 (3 µM, Stemgent), SB431542 (20 µM, Tocris), LDN 193189 (0,2 µM, Stemgent) e Y-27632 (10 µM, Stemcell) a una densidad de 0,2 x 10^6 células/ml en un matraz T25 o 0,25 x 10^6 células/ml en un matraz de centrifugación. Después de 2 días, se obtuvo la caudalización de los progenitores neurales mediante la adición de ácido retinoico (RA 0,1 µM) y agonista Smoothened (SAG, 0,5 µM). Después de 1 semana en suspensión, se añadieron factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, 10 ng/ml), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, 10 ng/ml) y éster t-butílico de N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina (DAPT, 10 nM) al medio sin SB431542 y LDN193189. Entre el día 10 y el 14, los progenitores de MN se convierten en MN. En esta etapa (día 10), los cuerpos embrionarios (EB) se disociaron en células individuales con tripsina-EDTA y se sembraron a 3.000 células por pocillo en placas de 384 pocillos (Corning) recubiertas con poliornitina (20 µg/ml, Sigma-Aldrich) y 5 g/ml de laminina (Invitrogen) en 35 µl del mismo medio con Y-27632 (10 µM, Stemcell). Cuatro días después, se añadieron 35 µl de medio N2B27 que contenía diferentes concentraciones de haloperidol a cada pocillo. Se usó una disolución de DMSO al 0,1 % (Sigma) como control negativo. Las células se trataron cada 3 días durante los siguientes diez días. Para cada cambio de medio, se reemplazaron 32 µl de medio por 38 µl de medio N2B27 que contenía las diferentes concentraciones de haloperidol.

4.2. Cuantificación del efecto de haloperidol sobre la supervivencia de las MN derivadas de hiPSC

Las células sembradas en placa se fijaron usando PFA al 4 % (Electron Microscopy Sciences) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se incubaron con un tampón de bloqueo compuesto por PBS 1x, BSA al 1 % (Sigma) y Triton-X-100 al 0,1 % (Sigma) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron durante la noche a 4 ºC con anticuerpos primarios (para ISL1: Ref: GT15051 Neuromics, 1:1000; TuJI: Ref: 801201 Biolegend, 1:1000; SMN: Ref: 610647 BDTransduction, 1:200). Cada anticuerpo se diluyó en una disolución de PBS 1X que contenía BSA al 1 %. Las células se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor-488, 568, 647, diluidos a 1:1000 en una disolución de PBS 1X que contenía BSA al 1 % (ISL1: anticuerpo de burro anti-IgG de cabra conjugado con 568 Ref: A11057, ThermoFisher Scientific; TuJI: anticuerpo de burro anti-IgG de conejo conjugado con 647 Ref: A31573, ThermoFisher Scientific; SMN: anticuerpo de burro anti-IgG de ratón conjugado con 488 Ref: A21202, ThermoFisher Scientific). Además, durante el marcaje secundario se realizó tinción nuclear con Hoechst 33228 (1:3000, Sigma). Finalmente, las células se lavaron 3 veces en PBS (figura 2A).

La supervivencia de las MN se determinó cuantificando el número de células positivas para ISL1 en cada condición. Las células positivas para ISL1 se detectaron automáticamente usando el sistema de análisis de alto contenido, es decir, sistema de obtención de imágenes de alto contenido Cellomics Array Scan VTI (Thermofisher-Cellomics). Las imágenes se adquirieron con el objetivo 20X en modo de cámara de alta resolución en dos canales: núcleos (canal 1, HOECHST XF93) e ISL1 (canal 2, Texas-red BGRFR_549_15). La adquisición se realizó para cada condición en 4 pocillos diferentes con 16 campos por pocillo. Basándose en el canal de Hoechst, se identificaron núcleos usando umbralización de intensidad, corrección de fondo y parámetros de segmentación. Luego se informó cada región nuclear en el segundo canal (Texas-red BGRFR_549_15) para limitar la detección de ISL1 al área nuclear. La tinción de ISL1 se identifica usando un umbral de intensidad fijo, corrección de fondo y parámetros de segmentación.

En este experimento, las MN se trataron durante 10 días a partir del día 14 desde la inducción neuronal. Se administró una nueva cantidad de medio con fármacos disueltos cada 3 días hasta el día 24 cuando se fijaron e inmunotiñeron las MN. Se usaron MN sanas como control de supervivencia celular, así como el fármaco neuroprotector kenpaulona que se ha comprobado previamente que disminuyó la tasa de mortalidad de MN de SMA en un sistema experimental diseñado de este tipo.

La supervivencia de MN se presentó como un porcentaje de células positivas para ISL1 contadas el día 24 normalizadas con respecto al día 14 de diferenciación (figura 2B). Por consiguiente, la administración de haloperidol también dio como resultado una mayor tasa de supervivencia de las motoneuronas.

La figura 2A muestra la imagen representativa de las motoneuronas teñidas usando el marcador neuronal TUJ1 (beta-tubulina de clase III) y fotos de fusión para el núcleo celular usando el marcador fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), el marcador de diferenciación de MN ISL1 (proteína potenciadora del gen de la insulina) y la proteína SMN (SMN) después del tratamiento con haloperidol a 320 nM, en comparación con MN sanas y control de disolvente DMSO.

Tal como se muestra en la figura 2B, se administró haloperidol a 8 concentraciones y demostró rescatar casi por completo la tasa de supervivencia de SMA a una concentración de 0,32 µM. La actividad de haloperidol que aumenta la tasa de supervivencia de las motoneuronas de SMA fue más eficiente que el control positivo kenpaulona a 10 µM.

La proteína SMN también se cuantificó usando fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea (HTRF, Cisbio Bioassays) según el protocolo del fabricante. Esta tecnología permite la detección y cuantificación de la proteína SMN en formato de placa de 384 pocillos. Para ello, las células se lisaron en 15 µl de tampón de lisado y 10 µl de lisado celular se transfirieron a una placa blanca de pequeño volumen de 384 pocillos que contenía 5 µl de la disolución de anticuerpos (dilución 1:100 de anticuerpo anti-SMN d2 y anti-criptato de SMN) (Cisbio). La placa se incubó durante la noche a temperatura ambiente. La fluorescencia se midió a 665 nm y 620 nm en un lector de microplacas CLARIOstar (BMG Labtech). Los valores de razón de (emisión a 665 nm/emisión a 620 nm) × 10 000 se usaron para calcular ΔF (%) según la siguiente ecuación:

ΔF (%) = [(Razón de muestra – Razón de control negativo) / Razón de control negativo] × 100

EJEMPLO 5. Evaluación de haloperidol sobre el cocultivo de motoneuronas y mioblastos

También se ensayó el efecto de haloperidol en un estudio de cocultivo de motoneuronas de SMA de tipo I y mioblastos de SMA de tipo I según el método descrito en Young *et al.*, 2018 (ISERM, París).

Las células del músculo esquelético se obtuvieron de una biopsia del músculo cuádriceps de un lactante de 5 días de edad no afectado (CHQ o Ctl) (Edom *et al.* 1994), una biopsia del músculo paravertebral de un paciente pediátrico de 11 años de edad que padecía SMA (KM432-7PV o SMA de tipo I) y una biopsia del músculo paravertebral de un paciente pediátrico de 7 años de edad que padecía SMA (KM1150-11PV o SMA de tipo II). Las células primarias se aislaron del músculo esquelético tal como se describió anteriormente (Chaouch *et al.* 2009). Estas células se expandieron y diferenciaron tal como se describió previamente. Brevemente, los mioblastos primarios e inmortalizados se expandieron en una mezcla de medio 199/medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (razón 1:4) complementado con suero bovino fetal al 20 % (FBS), 25 µg/ml de fetuina, 0,5 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico, 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 5 µg/ml de insulina. Luego, las células se cultivaron en un medio de crecimiento que consistió en DMEM-F12 glutamax (Life Technologies) complementado con FBS al 20 % (Sigma-Aldrich) y penicilina/esteptomicina al 0,1 % (Life Technologies). La diferenciación miogénica se indujo cambiando el medio de crecimiento a DMEM complementado con suero de caballo al 2 % (Life Technologies).

Para el cocultivo, las MN espinales deben diferenciarse de las hiPSC tal como se describió anteriormente, pero los cuerpos embrionarios se disocian el día 14 de la diferenciación y se congelan. CYTOO SA diseñó y proporcionó placas de 384 de pocillos microestampados (Young *et al.* 2018). Los mioblastos se sembraron en placa a una densidad de 5500 células por pocillo en medio de crecimiento de mioblastos (DMEM/F12-glutamax complementado con suero bovino fetal al 20 % (Sigma-Aldrich) y penicilina-estreptomicina al 0,1 % (ThermoFisher) con Y-27632 (10 µM, Stemcell). Después de 2 días, el medio de crecimiento se reemplazó por el medio de diferenciación (DMEM/F12-glutamax complementado con suero de caballo al 2 % (ThermoFisher)). El día 4, las MN derivadas de hiPSC se descongelaron y se sembraron en placa a una densidad de 8000 células por pocillo en medio N2B27 complementado con factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, 10 ng/ml, Peprotech), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, 10 ng/ml, Peprotech), éster t-butílico de N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina (DAPT, 10 µM, Tocris) e Y-27632 (10 µM, Stemcell). Los cultivos se han mantenido hasta 11 días que corresponden a 4 días de diferenciación miogénica y 7 días de cocultivo con MN derivadas de hiPSC.

Después de la fijación con PFA al 4 % (Electron Microscopy Sciences) durante 7 minutos a temperatura ambiente, las células se incubaron durante la noche a 4 ºC con anticuerpos primarios (enumerados en la tabla 5). Las células

se lavaron 3 veces en tampón PBS y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia Alexa apropiados (Invitrogen, 1:1000) y Hoechst (1 µg/ml).

Tabla 5: Lista de anticuerpos primarios, proveedores y diluciones

Anticuerpos	Designación	Referencia	Huésped	Proveedor	Dilución
Anticuerpos primarios	Islote1	AF1837	Cabra	R&D systems	1:500
	Tubulina β III (Tuj1)	801201	Ratón	Biolegend	1:1000
	Tubulina β III (Tuj1)	PRB-435P	Conejo	Biolegend	1:1000
	Cadena pesada de miosina (MF20)	MF20	Ratón	DSHB	1:200
	Receptor de acetilcolina (AchR)	AcM 35	Rata	DSHB	1:350
	SMN	Sc-32313	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	1:200
Anticuerpos secundarios	Anticuerpo de burro anti-IgG(H+L) de ratón conjugado con alexa fluor 488	A21202		Thermo Fisher Scientific	1:1000
	Anticuerpo de burro anti-IgG(H+L) de ratón conjugado con alexa fluor 647	A-31571		Thermo Fisher Scientific	1:1000
	Anticuerpo de burro anti-IgG(H+L) de cabra conjugado con alexa fluor 568	A-11057		Thermo Fisher Scientific	1:1000
	Anticuerpo de burro anti-IgG(H+L) de conejo conjugado con alexa fluor 647	A-31573		Thermo Fisher Scientific	1:1000
	Anticuerpo de burro anti-IgG(H+L) de rata conjugado con alexa fluor 488	A-21208		Thermo Fisher Scientific	1:1000
	Hoechst (1 mg/ml)			Invitrogen	1:1000

Las imágenes de cocultivo se adquirieron usando microscopía de disco giratorio (Zeiss) con objetivo 20X. Cada imagen se tomó con apilamiento z y se realizó una vista ortogonal en el software Fiji. La cuantificación de Islote1 se determinó contando automáticamente el número de células positivas para Islote1 por micropatrón. El área de miotubos se cuantificó usando el software Fiji para cuantificar el área total de células teñidas con el anticuerpo contra a MF20 por micropatrón. Se usó un fármaco neuroprotector, kenpaulona, como control positivo.

Todos los datos cuantitativos se analizaron con Prism 8. Los valores se representan como valor medio ± DE. Se usó la prueba de la t de Student para comparar los datos entre dos grupos (*p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005; ****p < 0,0001). Se realizó un análisis de varianza unifactorial (ANOVA) para comparar datos entre tres o más grupos, seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey post-hoc. Se consideraron estadísticamente significativos valores de p < 0,05 (*p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005; ****p < 0,0001).

Los resultados muestran que el haloperidol no sólo aumenta la tasa de supervivencia de las MN de SMA (figura 3A) sino que también aumenta el área de miotubos con respecto a los controles no tratados (figura 3B).

El tratamiento se administró cada 3 días durante 7 días desde la siembra de ambos tipos de células. Se observó un claro aumento en el área de miotubos (figura 3B) en comparación con las células de SMA no tratadas, lo que fue coherente con la mayor tasa de supervivencia de las MN mostrada en la figura 3A.

La figura 3C muestra imágenes representativas de un cocultivo tratado con haloperidol a 320 nM, en comparación con células de tipo natural y SMA tratadas con disolvente. Los miotubos se marcaron con el marcador MF20 (verde oscuro), las MN se marcaron con ISL1 (rojo), los receptores de acetilcolina se marcaron con AChR (verde claro) y los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst (azul).

EJEMPLO 6. Evaluación de la eficacia del haloperidol en un modelo murino de SMA (ratones SMN Δ7)

Seguidamente, se ensayó la eficacia del haloperidol (Universidad de Turín, Boido *et al.*) en ratones SMA Δ7 (comprados en Jackson Laboratory, Maine, EE. UU.; número de reserva 005025). Este ratón triple mutante alberga dos alelos transgénicos y un único mutante objetivo. El alelo Tg(SMN2*delta7)4299Ahmb consiste en un ADNc de SMN que carece del exón 7, mientras que el alelo Tg(SMN2)89Ahmb consiste en el gen SMN2 humano completo. Los ratones homocigotos para el alelo mutante Smn diana y homocigotos para los dos alelos transgénicos presentan síntomas y neuropatología similares a los de los pacientes con SMA de tipo II. Al nacer, los ratones triples mutantes son notablemente más pequeños que sus compañeros de camada normales; en el día 5, aparecen signos de debilidad muscular que se acentúan progresivamente durante la semana siguiente, mostrando los ratones una

marcha anómala, temblores en las extremidades traseras y tendencia a caerse. La supervivencia media es de aproximadamente 13 días.

Para discriminar su genotipo, al nacer a las crías se les cortó la cola y se genotipó mediante PCR.

Los ratones con SMA tratados recibieron por vía subcutánea haloperidol 0,5 mg/kg, disuelto en DMSO al 2 % en solución salina (grupo HALO), mientras que los ratones de control recibieron una cantidad igual de solución salina con DMSO al 2 % (grupo VHL). Se administró haloperidol o solución salina diariamente, desde P2 (día 2 postnatal) hasta P12 (día del sacrificio).

Durante todo el periodo, los animales se sometieron a una serie de pruebas motoras conductuales: prueba de suspensión de la cola, reflejo de enderezamiento, prueba de suspensión de las extremidades traseras, geotaxis negativa (El-Khodor *et al.* 2008, Boido *et al.* 2018). Los ratones se evaluaron diariamente a partir de P2 para determinar su peso corporal y su comportamiento:

- Prueba de suspensión de la cola (autoabrazamiento): las crías se suspendieron de la cola durante 15 segundos y la postura de sus extremidades traseras se calificó en una escala de 4 (normal) a 0 (abrazamiento);

- Reflejo de enderezamiento: las crías se colocaron boca arriba sobre una superficie plana; se evaluó si las crías pudieron reposicionarse o no con el lado dorsal hacia arriba durante un periodo de 30 segundos;

- Prueba de geotaxis negativa: a partir de P4, las crías se colocaron en una cuadrícula inclinada con la cabeza del ratón hacia abajo (tiempo de corte: máximo 60 s).

En P12, los animales Halo y VHL se sacrificaron, y se diseccionaron rápidamente médulas espinales frescas y algunos músculos esqueléticos (diafragma, cuádriceps y gastrocnemio). Luego se verificó el efecto de haloperidol sobre la expresión de SMN en estas muestras. Los tejidos se homogeneizaron en hielo usando un homogeneizador de mortero en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (tampón de lisis RIPA) (Merck Life Sciences) complementado con PMSF 1 mM, DTT 1 mM, ortovanadato de sodio 2 mM (ThermoFisher Scientific) y cóctel inhibidor de proteasa cOmpleteTM 1x (Merck Life Sciences). Los homogeneizados de muestra se incubaron en hielo durante 20 minutos antes de centrifugarse para la separación del material insoluble a 14.000 × g durante 20 minutos a 4 ºC. La concentración de proteína total se determinó en los sobrenadantes usando el reactivo Bradford (Bio-Rad). La desnaturalización de proteínas se realizó con el tampón de muestra NuPAGE®LDS complementado con el agente reductor de muestra NuPAGE® (ThermoFisher Scientific), calentando a 95 ºC durante 5 min. La SDS-PAGE y la transferencia se realizaron en geles de proteína prefabricados Mini-PROTEAN® TGX™ al 4-20 % y membranas minis de nitrocelulosa Trans-Blot® Turbo™ usando un sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad), respectivamente. Los sitios de unión no específicos se bloquearon usando leche desnatada en polvo al 5 % en PBS-Tween-20 al 0,2 % (Merck Life Sciences) (PBS-T) durante 1 hora a ta con agitación. Todas las membranas se incubaron durante la noche a 4 ºC con agitación con disolución de anticuerpos contra a SMN (anticuerpo anti-SMN de ratón, BD Bioscience 610646) diluida 1:2000 en leche desnatada en polvo al 2 % en PBS-T, y con disolución de anticuerpos contra a vinculina (anticuerpo anti-vinculina monoclonal de ratón, clon Hvin-1, Merck Life Sciences) diluida 1:2000 en leche desnatada en polvo al 2 % en PBS-T como control de carga. El anticuerpo secundario conjugado con HRP (anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP, Bio-Rad) se diluyó 1:10.000 en leche desnatada en polvo al 2 % en PBS-T y se incubó durante 1 hora a ta con agitación. El inmunomarcaje se detectó con sustratos Western ECL Blotting Clarity™ (Bio-Rad) usando el sistema de obtención de imágenes ChemiDocTM (Bio-Rad). La cuantificación densitométrica de bandas se realizó con Fiji (Image J, NIH).

La administración de haloperidol favoreció un aumento de peso significativo en ratones con SMA tratados, a partir de P5 (día 5 postnatal) y aumentando progresivamente durante los días (figura 4A).

Además, la evaluación del comportamiento mostró que la administración de haloperidol en ratones con SMA mejoró el rendimiento motor en la prueba de suspensión de la cola (figura 4B), la prueba del reflejo de enderezamiento (figura 4C) y la prueba de geotaxis negativa (figura 4D): de hecho, el tratamiento mejoró significativamente la postura de las extremidades traseras y aumentó la fuerza y la resistencia muscular en las crías con SMA Halo en comparación con las VHL.

Los resultados conductuales se correlacionaron positivamente con la expresión de SMN (figura 5): en P12, se diseccionaron las médulas espinales, los diafragmas, los cuádriceps y los músculos gastrocnemios y se realizó inmunotransferencia de tipo Western para evaluar la expresión de proteínas en los grupos HALO y VHL. Las figuras 5A, 5B, 5C y 5D muestran un aumento de la expresión de SMN del 58 %, del 23 %, del 123 % y del 102 % en los ratones HALO en comparación con los ratones VHL, respectivamente, en las muestras de médula espinal, diafragma, cuádriceps y gastrocnemio.

EJEMPLO 7. Efecto combinado de haloperidol y moxifloxacino sobre la tasa de supervivencia de las motoneuronas de SMA

Las motoneuronas diferenciadas de las células madre pluripotentes inducidas por SMA de tipo 1, obtenidas tal como se describe en el ejemplo 4, se usaron para evaluar su tasa de supervivencia después del tratamiento con haloperidol o moxifloxacino. Con tal propósito, las MN de SMA de tipo 1 se trataron con 7 concentraciones de cada fármaco por separado y se midió la tasa de supervivencia después de 10 días de tratamiento. Se estableció la dosis más eficaz (dosis óptima) para aumentar la supervivencia de las motoneuronas cuando cada fármaco se administra por separado (figura 6).

A continuación, las MN se trataron con 49 combinaciones de diferentes concentraciones de haloperidol y moxifloxacino y se midió la tasa de supervivencia después de 10 días de tratamiento (figura 7). Para realizar el ensayo se usó el mismo modelo celular.

Los resultados mostrados en la figura 8 indican que la combinación de haloperidol y moxifloxacino proporciona una actividad mejorada cuando se administra a dosis inferiores a las dosis óptimas establecidas para la administración por separado (obtenidas en la figura 6). Por consiguiente, los resultados demostraron que la combinación de haloperidol y moxifloxacino podría usarse a dosis más bajas, al tiempo que se rescata la supervivencia de las motoneuronas en mayor medida que en comparación con los fármacos administrados por separado en dosis más altas (figura 7).

Para evaluar la presencia de un efecto sinérgico entre haloperidol y moxifloxacino se aplicó el modelo de independencia de Bliss que adopta una perspectiva probabilística asumiendo que bajo aditividad, los efectos de los fármacos no interfieren entre sí. Esto permite determinar el resultado esperado en una combinación de dosis (d1, d2) como la suma de las respuestas independientes de los fármacos menos su efecto conjunto bajo aditividad (en analogía con la independencia estocástica) (Thas *et al.*, 2021; Van der Borght *et al.*, 2017). El análisis se realizó usando el software R, específicamente:

- R: R Core Team (2021). R: A language and environment for Statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. URL https://www.R-project.org/.

- BIGL: Heather Turner, Annelies Tourny, Olivier Thas, Maxim Nazarov, Rytis Bagdziunas y Stijn Hawinkel (2021). BIGL: Biochemically Intuitive Generalized Loewe Model. Versión 1.6.4 del paquete R. https://github.com/openanalytics/BIGL

Los efectos sinérgicos y antagónicos de las combinaciones de fármacos también podrían representarse en un gráfico de contorno bidimensional donde el eje x y el eje y representan las dosis de haloperidol y moxifloxacino, respectivamente, tal como se muestra en la figura 8. Cada punto sigue una escala de grises mostrada según el valor de p y el signo de la estadística maxR.

Basándose en los resultados mostrados en la figura 8, se encontró sinergia cuando se administraron haloperidol y moxifloxacino *in vitro* a dosis de entre 0,04-1,25 µM para haloperidol y entre 0,4-12 µM para moxifloxacino.

EJEMPLO 8. El efecto de haloperidol sobre la morfología de las fibras musculares en los músculos esqueléticos de ratones delta 7 SMA

Se verificó la eficacia de haloperidol sobre el trofismo muscular. En primer lugar, se realizaron análisis morfológicos de los músculos cuádriceps teñidos con H/E de ratones en el día postnatal 12 (P12) después de 10 días de tratamiento con haloperidol a 0,5 mg/kg y se compararon con ratones tratados con tratamiento simulado. Específicamente, para el análisis morfológico del músculo esquelético cuádriceps se tiñeron secciones con H/E, tal como se describió previamente (Valsecchi *et al.* 2015); Rindt *et al.* 2015)). Para evaluar morfológicamente el área media de fibra, el perímetro de fibra, el diámetro mínimo y máximo de Feret, se dibujaron más de 100 fibras para cada animal con el software Neurolucida (MicroBrightField Inc.) y un microscopio asistido por ordenador (microscopio Nikon Eclipse E600). Los datos se obtuvieron mediante el software de análisis de datos asociado NeuroExplorer (MicroBrightField): luego se promediaron las medias obtenidas de animales individuales. Las imágenes de las fibras de los músculos esqueléticos se adquirieron con el microscopio digital escáner de portaobjetos Zeiss Axioscan Z.1 (Carl Zeiss AG).

Se evaluó además el área media de fibra, el perímetro de fibra y los diámetros de Feret de 100 fibras musculares por animal (figuras 9 a-c). Los resultados mostraron que los ratones tratados con haloperidol mostraron un aumento significativo en el área de fibra (+ 104 %), el perímetro de fibra (+ 43 %) y los diámetros de Feret (Feret mínimo: +49 %, Feret máximo: +40 %). Estos resultados sugieren que el tratamiento con haloperidol puede retrasar eficazmente la atrofia de las fibras musculares esqueléticas.

EJEMPLO 9. El efecto de haloperidol sobre la inervación de los músculos cuádriceps de ratones delta 7 SMA

Después de una rápida rehidratación en PBS, las secciones de músculo esquelético en cortes recubiertos con gelatina al 4 % se tiñeron para la detección de NMJ. En primer lugar, las secciones se sometieron a recuperación de antígeno mediante incubaciones secuenciales con SDS al 1 % (5 min, ta) y disolución de citrato de sodio calentada hasta 95 ºC (pH 6, durante 7-10 min). Posteriormente, se bloquearon los sitios de unión no específicos usando una disolución de BSA al 4 %, suero fetal bovino al 4 % y PBS-Triton-X al 0,1 % durante 1:30 h, temperatura ambiente. Las secciones se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario (anticuerpo contra a neurofilamento de 145 kDa, CT, clon 3H11, 1:100, Sigma-Aldrich) diluido en la disolución de bloqueo durante 24 h a 4 ºC. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo apropiado (1:30 h, ta) y con α-bungarotoxina (BTX) conjugada con Alexafluor-555 (1:500; 11554187, Invitrogen) diluida en BSA al 4 % y PBS-Triton-X al 0,1 % (1:30 h, ta). Finalmente, los cortes se incubaron con DAPI en PBS 1X durante 3 minutos y luego se cubrieron con un medio de montaje antidecoloración. Las imágenes se adquirieron con un microscopio de barrido láser confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems).

Para el análisis de la inervación de NMJ (al menos 50 NMJ por animal), se evaluaron la presencia y el número de fibras positivas para NF que llegaban a cada NMJ y se contaron con un microscopio asistido por ordenador (microscopio Nikon Eclipse E600) para clasificar las NMJ como monoinervadas, multiinervadas o desnervadas.

Se determinó el porcentaje de uniones neuromusculares (NMJ) multiinervadas, monoinervadas y desnervadas en los cuádriceps de ratones delta 7 SMA tratados con haloperidol y con tratamiento simulado. Se analizó la inervación de NMJ para determinar el número de neurofilamentos (NF) en contacto con la placa motora; los resultados muestran una reducción significativa en las placas motoras desnervadas después del tratamiento con haloperidol (simulado: 33,75 ± 1,31 %; haloperidol: 9,50 ± 1,50 %), figura 10. Los datos se expresan como media ± error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPad Prism 8.0 (software GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Se usó la prueba de la t de Student bilateral para datos independientes para comparar datos entre dos grupos.

La administración de haloperidol a ratones delta 7 SMA mejora el trofismo muscular esquelético y conduce a una mejor inervación muscular. La formación de las NMJ se produce normalmente en los modelos de ratón con SMA, pero su maduración se detiene (Januel *et al.* 2022). Se sugirió que la falta de proteína SMN en esos modelos tiene un papel central en la formación de las NMJ (Boido y Vercelli, 2016); por tanto, mejorar los niveles de SMN puede mejorar la señalización recíproca entre las motoneuronas y los músculos, importante para la formación y el mantenimiento de las NMJ (Fralish *et al.* 2021). El haloperidol contribuyó con éxito a mantener el fenotipo de NMJ y la inervación muscular en ratones tratados y retrasa la atrofia del músculo esquelético.

Bibliografía

Altschul. *et al.* (1993) “A protein alignment scoring system sensitive at all evolutionary distances” J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300.

Altschul *et al.* (1997) “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.” Nucleic Acids Research 25 3389-3402.

Boido M, De Amicis E, Valsecchi V, Trevisan M, Ala U, Ruegg MA, Hettwer S, Vercelli A. Increasing Agrin Function Antagonizes Muscle Atrophy and Motor Impairment in Spinal Muscular Atrophy. Front Cell Neurosci. 30 de enero de 2018;12:17. doi: 10.3389/fncel.2018.00017.

Boido M, Vercelli A (2016) Neuromuscular Junctions as Key Contributors and Therapeutic Targets in Spinal Muscular Atrophy. Front Neuroanat 10:. https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00006.

Brutlag *et al.* (1990) Improved sensitivity of biological sequence database searches. Computer Applications in the Biosciences 6: 237-245.

Chaouch, Soraya, Vincent Mouly, Aurélie Goyenvalle, Adeline Vulin, Kamel Mamchaoui, Elisa Negroni, James Di Santo, *et al.* 2009. “Immortalized Skin Fibroblasts Expressing Conditional MyoD as a Renewable and Reliable Source of Converted Human Muscle Cells to Assess Therapeutic Strategies for Muscular Dystrophies: Validation of an Exon-Skipping Approach to Restore Dystrophin in Duchenne Muscular Dystrophy Cells.” Human Gene Therapy 20 (7): 784-90. https://doi.org/10.1089/hum.2008.163.

Edom, F., V. Mouly, J. P. Barbet, M. Y. Fiszman, y G. S. Butler-Browne. 1994. “Clones of Human Satellite Cells Can Express *in Vitro* Both Fast and Slow Myosin Heavy Chains.” Developmental Biology 164 (1): 219-29. https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1193.

El-Khodor BF, Edgar N, Chen A, Winberg ML, Joyce C, Brunner D, Suárez-Fariñas M, Heyes MP. Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMNDelta7 neonate model of spinal muscular atrophy. Exp

Neurol. Julio de 2008;212(1):29-43. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.02.025.

Fusaki *et al.*, Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. Proceedings of the Japan Academy, serie B (2009), vol. 85, número 8, páginas 348-362.

Fralish Z, Lotz EM, Chavez T, *et al.* (2021) Neuromuscular Development and Disease: Learning From *in vitro* and *in vivo* Models. Front Cell Dev Biol 9:764732. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.764732.

Henikoff y Henikoff (1992) “Amino acid substitution matrices from protein blocks” PNAS 89(22):10915-9Altschul *et al.* (1990) “Basic local alignment search tool.” J. Mol. Biol. 215, 403-410.

Livak *et al.*, (2001) “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method”, Methods, vol. 25, número 4, 402-408.

Januel C, Menduti G, Mamchaoui K, *et al.* (2022) Moxifloxacin rescues SMA phenotypes in patient-derived cells and animal model. Cell Mol Life Sci 79:441. https://doi.org/10.1007/s00018-022-04450-8.

Maury, Y. *et al.* Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. Nat Biotechnol 33, 89-96 (2015).

Naryshkin, N. A., *et al.* (2014). “Motor neuron disease. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy.” Science 345(6197): 688-693.

Rindt H, Feng Z, Mazzasette C, *et al.* (2015) Astrocytes influence the severity of spinal muscular atrophy. Human Molecular Genetics 24:4094-4102. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv148.

Thas, O., Tourny, A., Verbist, B., Hawinkel, S., Nazarov, M., Mutambanengwe, K., & Bijnens, L. (2021). Statistical detection of synergy: New methods and a comparative study. Pharmaceutical Statistics, pst.2173. https://doi.org/10.1002/pst.2173.

Thompson *et al.* (1994) “CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice” Nucleic Acids Research, 1994, Vol. 22, Nº. 22 4673-4680.

Valsecchi V, Boido M, De Amicis E, *et al*. (2015) Expression of Muscle-Specific MiRNA 206 in the Progression of Disease in a Murine SMA Model. PLoS One 10:e0128560. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128560.

Van der Borght, K., Tourny, A., Bagdziunas, R., Thas, O., Nazarov, M., Turner, H., Verbist, B., & Ceulemans, H. (2017). BIGL: Biochemically Intuitive Generalized Loewe null model for prediction of the expected combined effect compatible with partial agonism and antagonism. Scientific Reports, 7(1), 17935. https://doi.org/10.1038/s41598-017-18068-5.

Young, Joanne, Yoran Margaron, Mathieu Fernandes, Eve Duchemin-Pelletier, Joris Michaud, Mélanie Flaender, Oana Lorintiu, Sébastien Degot, y Pauline Poydenot. 2018. “MyoScreen, a High-Throughput Phenotypic Screening Platform Enabling Muscle Drug Discovery.” SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery 23 (8): 790-806. https://doi.org/10.1177/2472555218761102.

REIVINDICACIONES

1. Haloperidol, o sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal.

2. Haloperidol, o sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso según la reivindicación 1, en donde dicho método da como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN funcional de longitud completa.

3. Haloperidol, o sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde la atrofia muscular espinal es de tipo I, tipo II, tipo III o tipo IV.

4. Haloperidol, o sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho haloperidol, o dicha sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra antes de, junto con, o después de administrar un agente terapéutico adicional para uso en el tratamiento de la atrofia muscular espinal.

5. Haloperidol, o sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso según la reivindicación 4, en donde dicho agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en: moxifloxacino, nusinersen, onasemnogén abeparvovec, risdiplam, BIIB110, inhibidor de Columbia/NU-p38aMAPK, branaplam, anticuerpo monoclonal SRK-015, albuterol, modificador de corte y empalme RG7800, proteína recombinante RO7239361, reldesemtiv, azitromicina, bortezomib y trocostatina A, o una combinación de los mismos.

6. Haloperidol, o sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en donde dicho agente terapéutico adicional es nusinersen o risdiplam.

7. Haloperidol, o sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo es lactato de haloperidol o decanoato de haloperidol.

8. Composición farmacéutica que comprende haloperidol, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para uso en un método para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal.

9. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, en donde dicho método da como resultado un aumento de los niveles de proteína SMN funcional de longitud completa.

10. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8 ó 9, en donde dicha composición farmacéutica se administra antes de, junto con, o después de administrar un agente terapéutico adicional para uso en el tratamiento de la atrofia muscular espinal.

11. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 10, en donde dicho agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en: moxifloxacino, nusinersen, onasemnogén abeparvovec, risdiplam, BIIB110, inhibidor de Columbia/NU-p38aMAPK, branaplam, anticuerpo monoclonal SRK-015, albuterol, modificador de corte y empalme RG7800, proteína recombinante RO7239361, reldesemtiv, azitromicina, bortezomib y trocostatina, o una combinación de los mismos.

12. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde dicha composición farmacéutica se administra por vía oral, transdérmica, intratecal, o parenteral.

13. Composición farmacéutica que comprende haloperidol y moxifloxacino, o una sal, éster o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición farmacéutica comprende una razón molar de haloperidol:moxifloxacino de desde 1:5 hasta 1:10.

14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, para uso como medicamento.

15. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, para uso en un método para prevenir y/o tratar la atrofia muscular espinal.

FIGURA 1

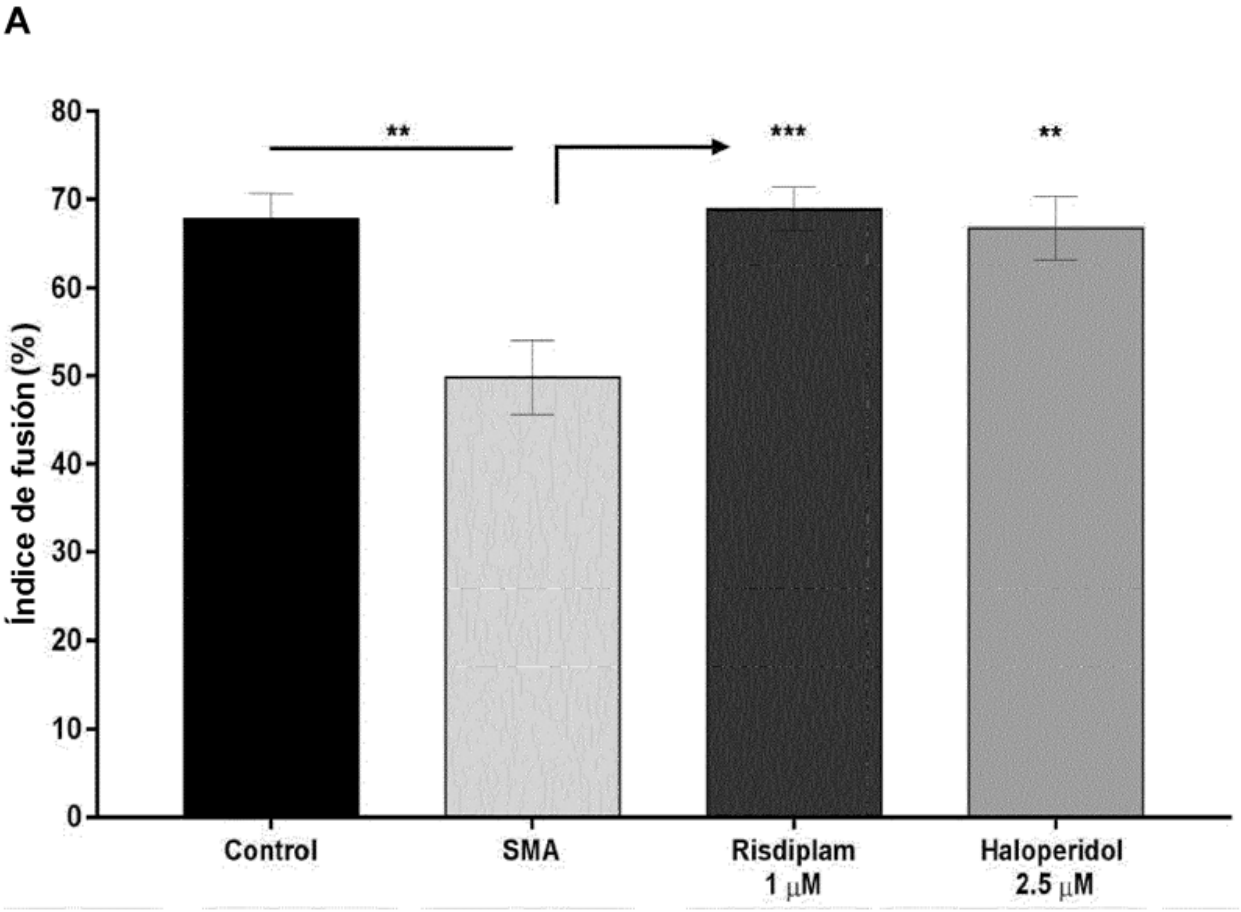

A
Índice de fusión (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
**
***
**
Control
SMA
Risdiplam
1 μM
Haloperidol
2.5 μM

FIGURA 1 (cont.)

B

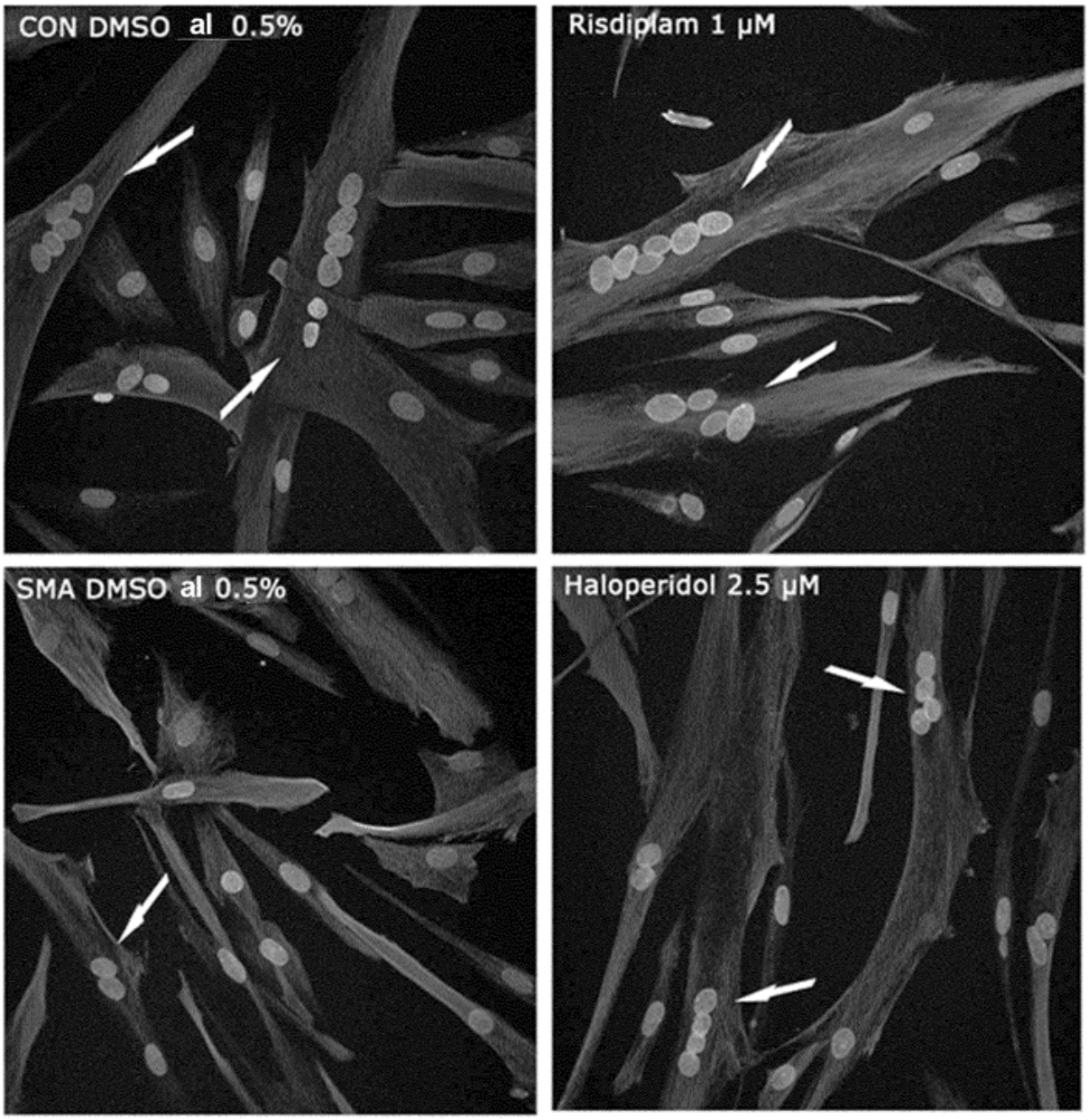


FIGURA 2

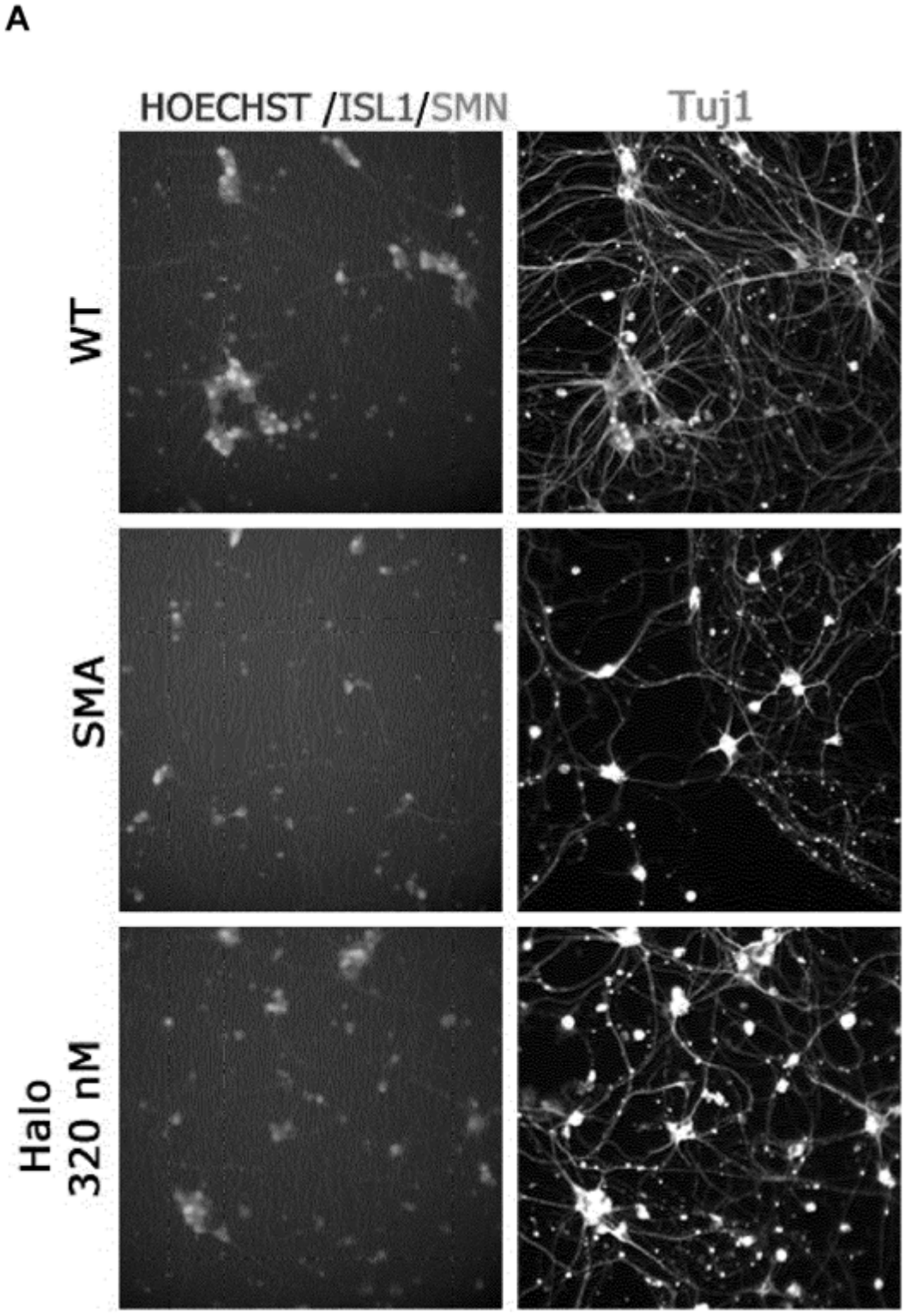
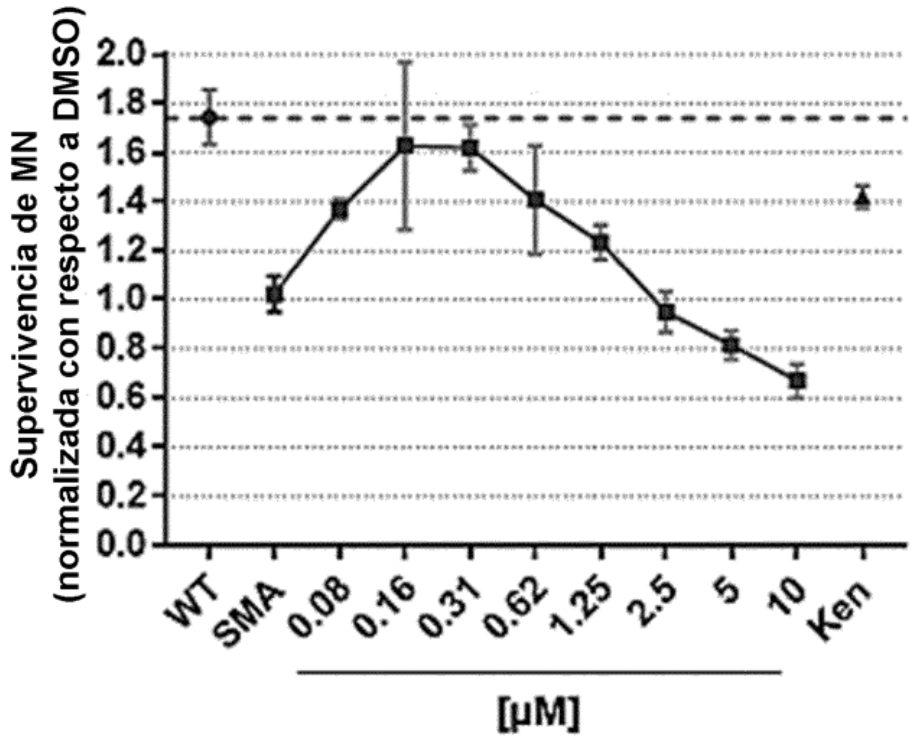


FIGURA 2 (cont.)

B



C

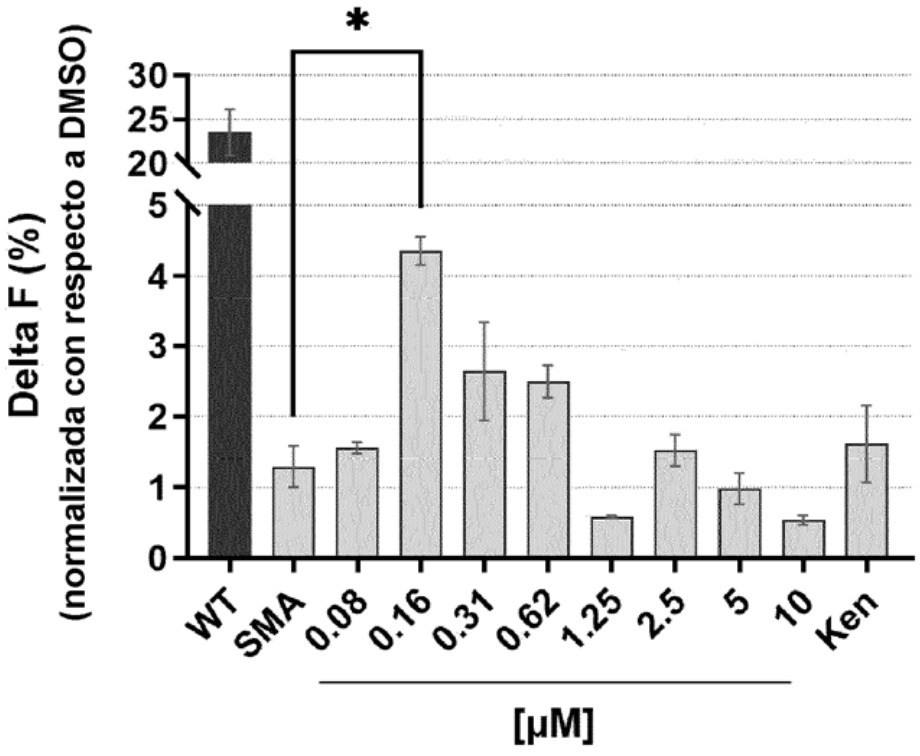
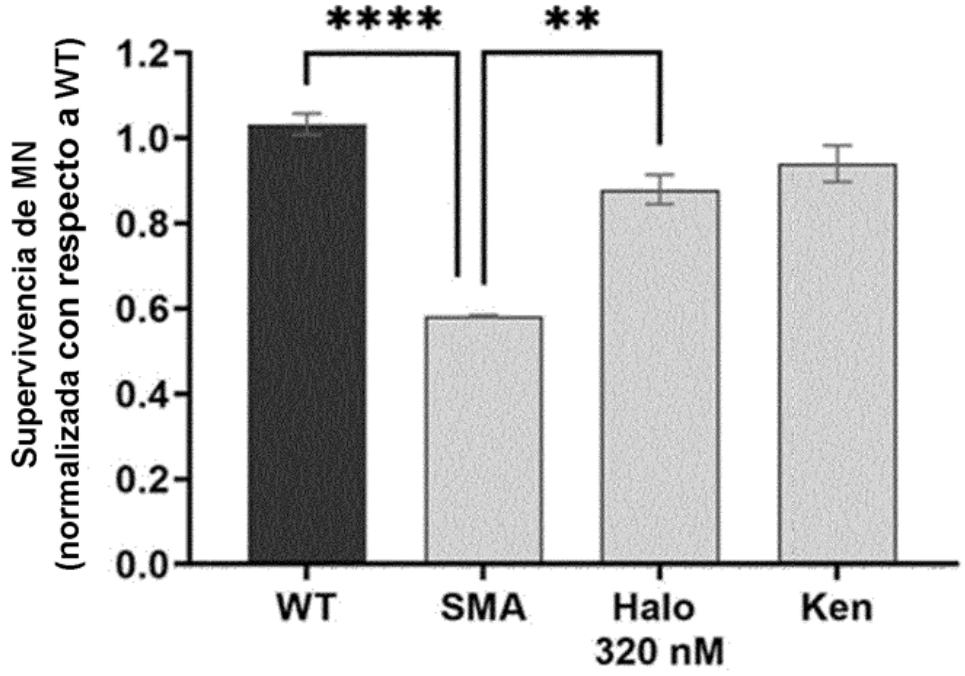


FIGURA 3

A


****
**
Supervivencia de MN
(normalizada con respecto a WT)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
WT
SMA
Halo
320 nM
Ken

B

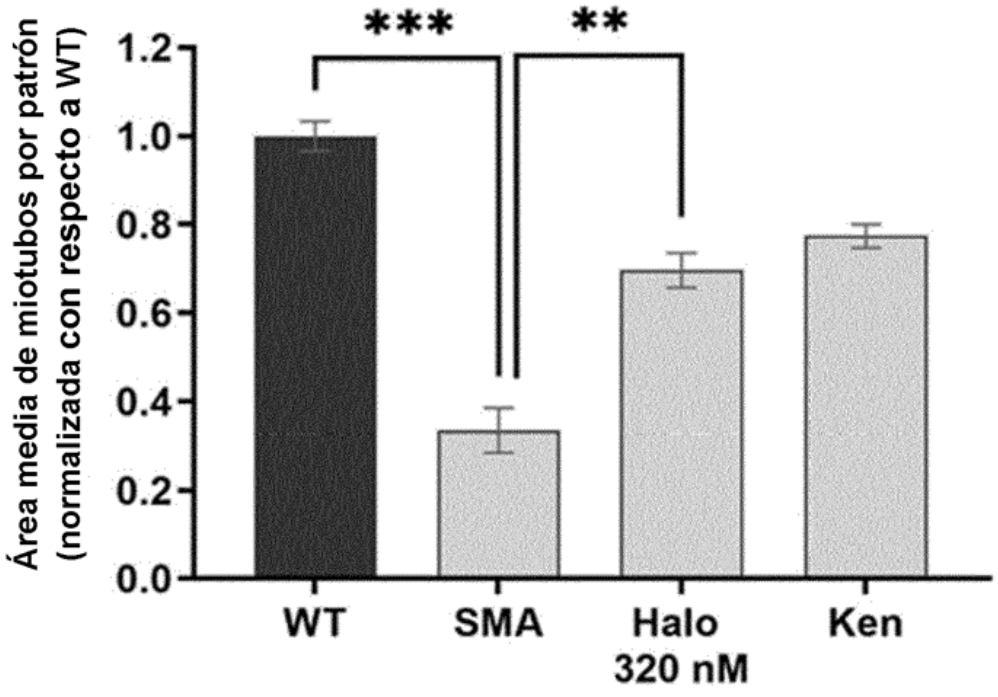

***
**
Área media de miotubos por patrón
(normalizada con respecto a WT)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
WT
SMA
Halo
320 nM
Ken

FIGURA 3 (cont.)

C

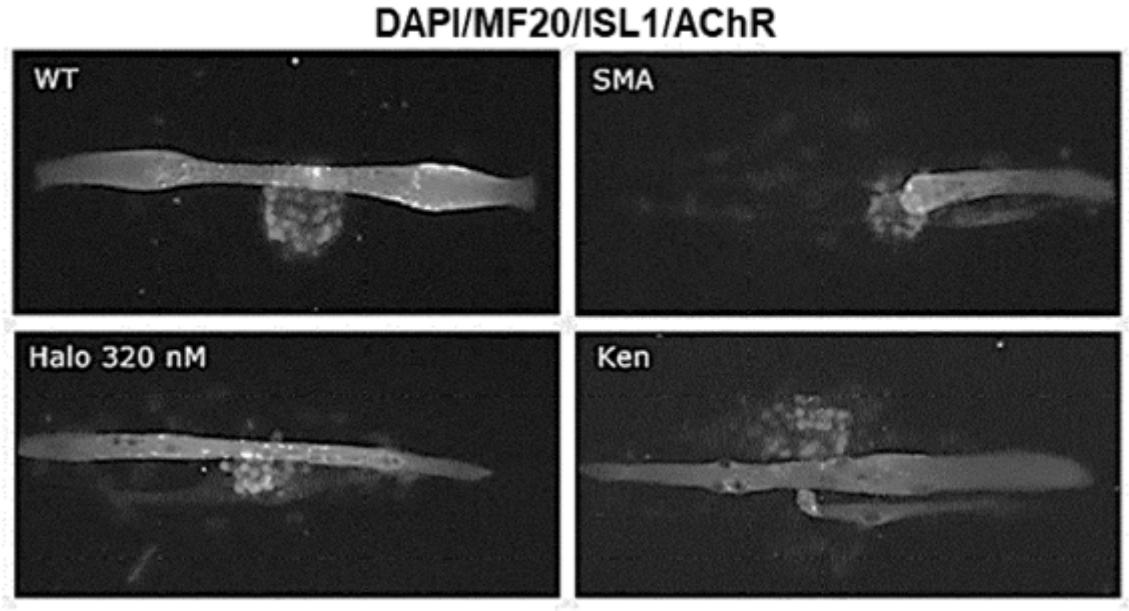


FIGURA 4

A

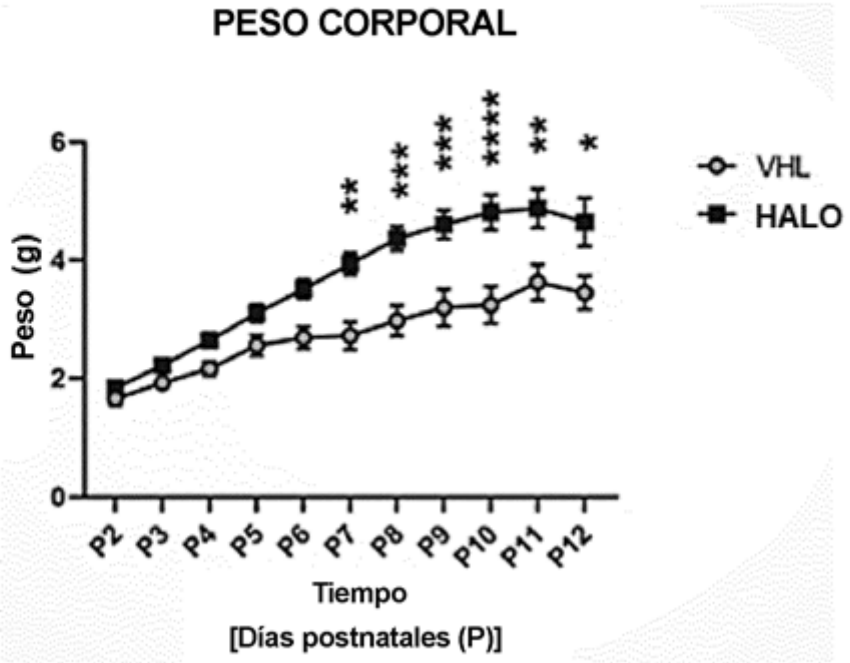
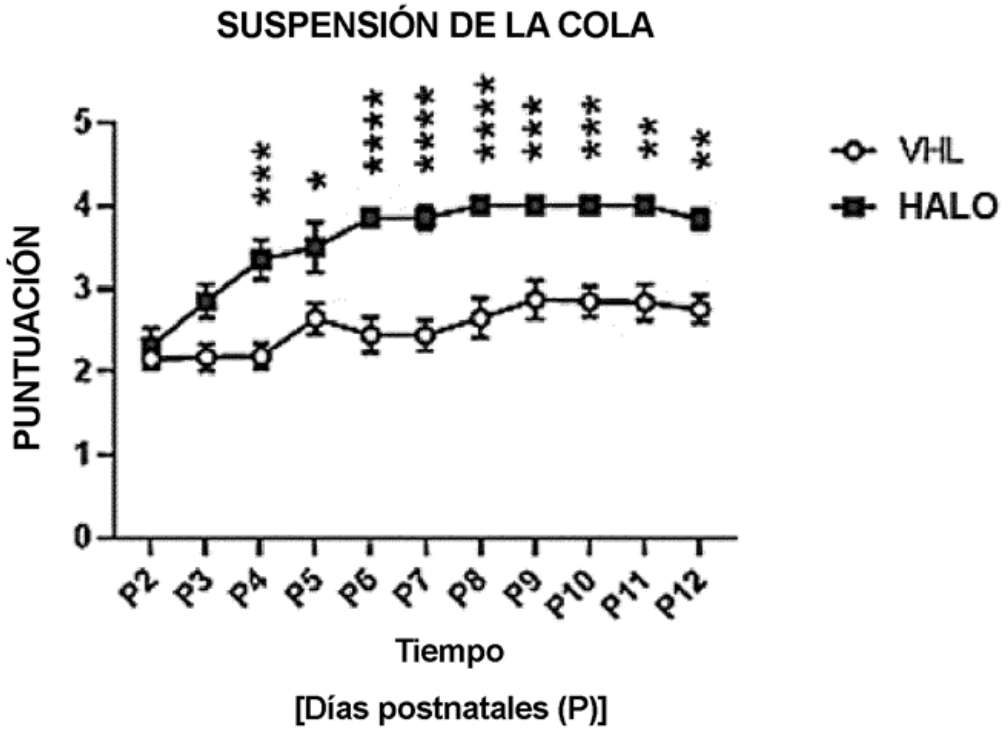


FIGURA 4 (cont.)

B



C

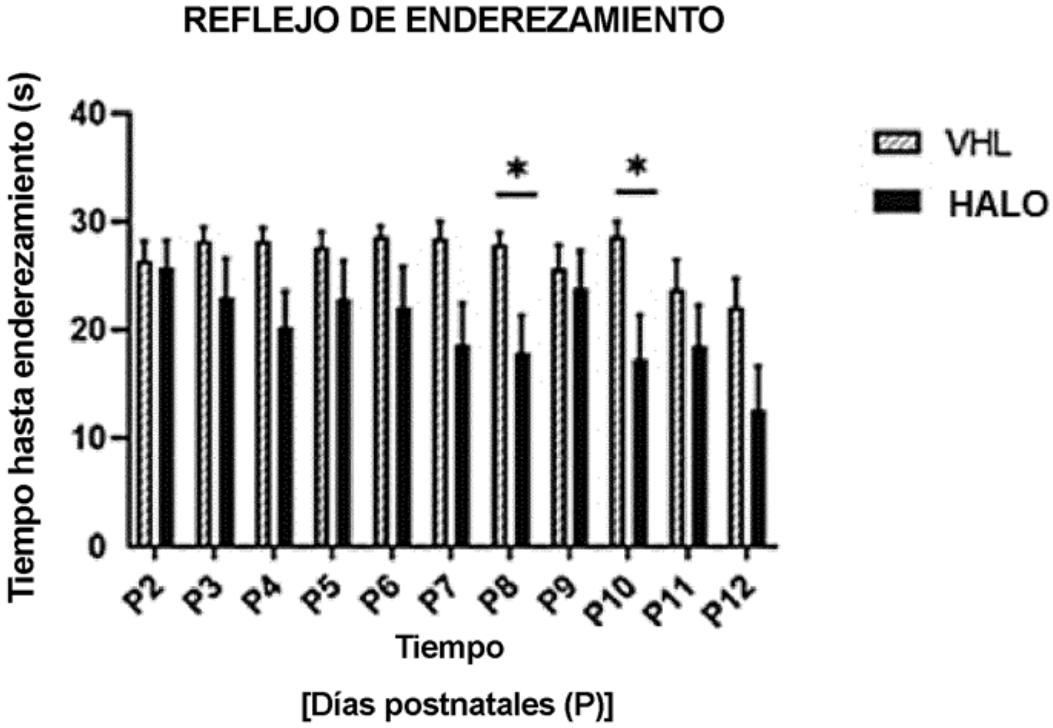


FIGURA 4 (cont.)

D

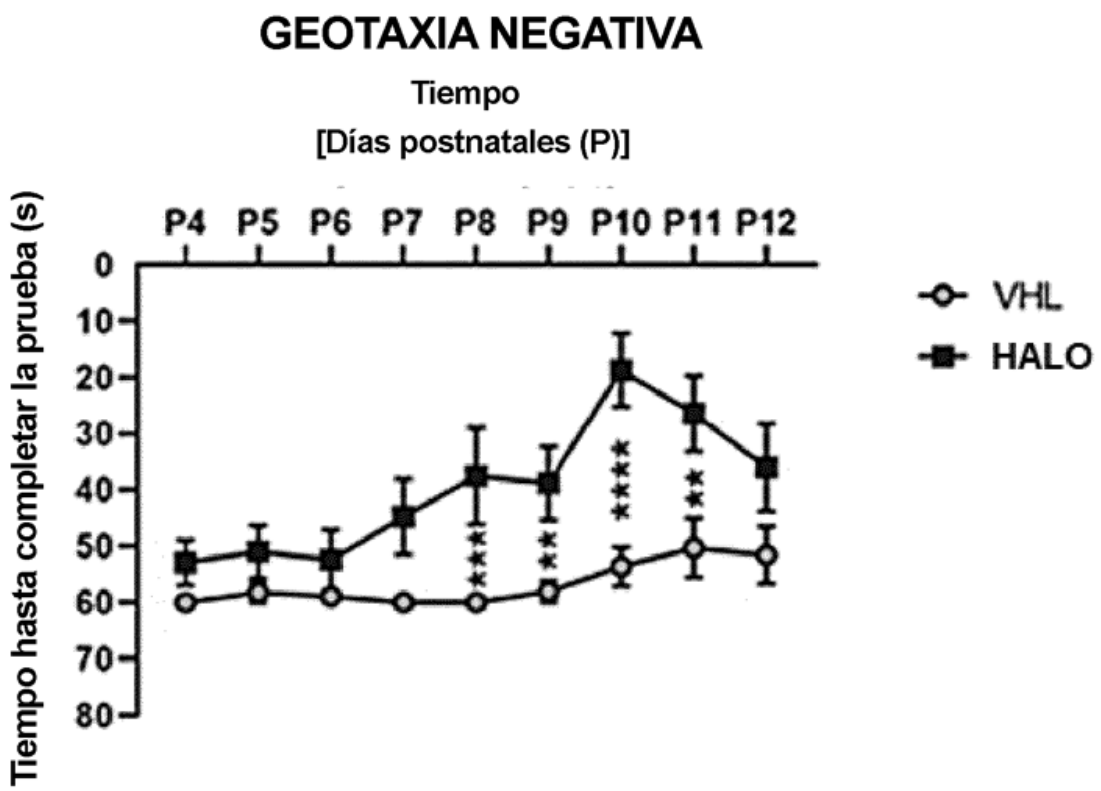
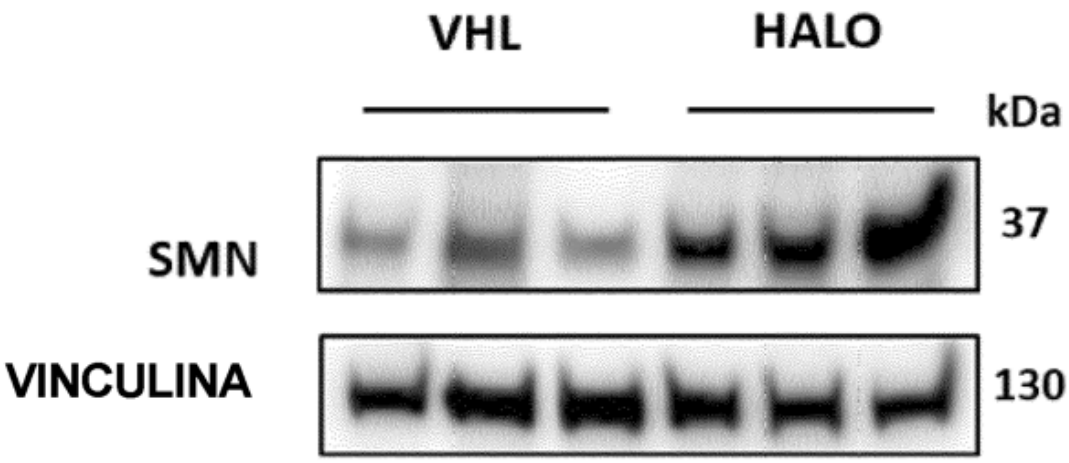


FIGURA 5

A1



A2

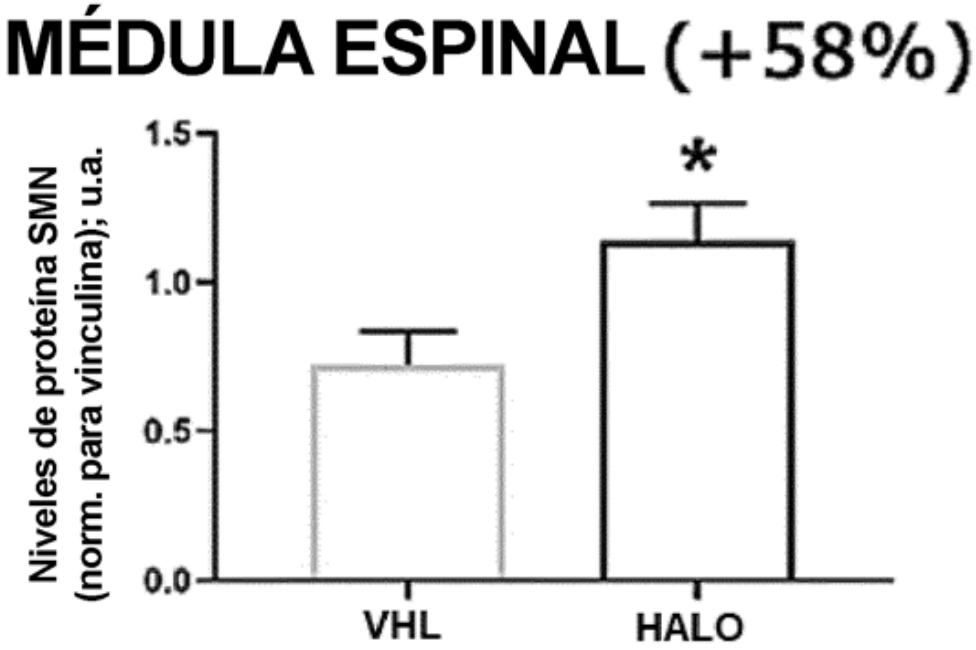
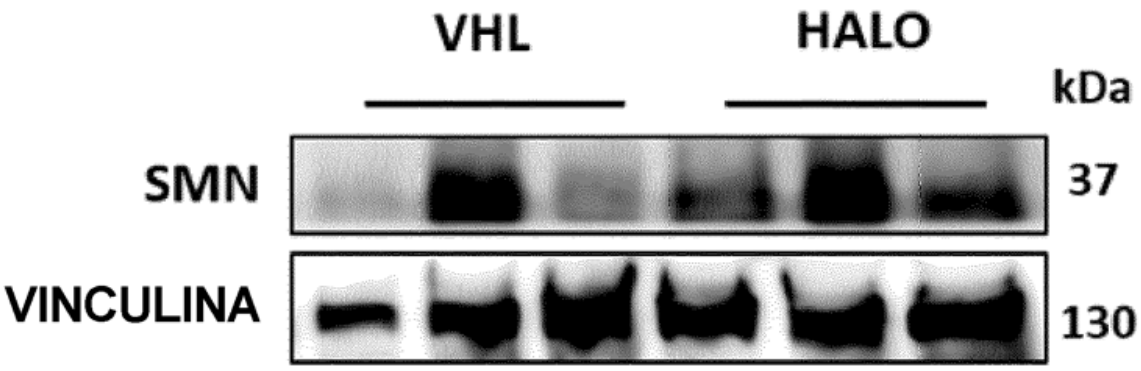


FIGURA 5 (cont.)

B1



B2

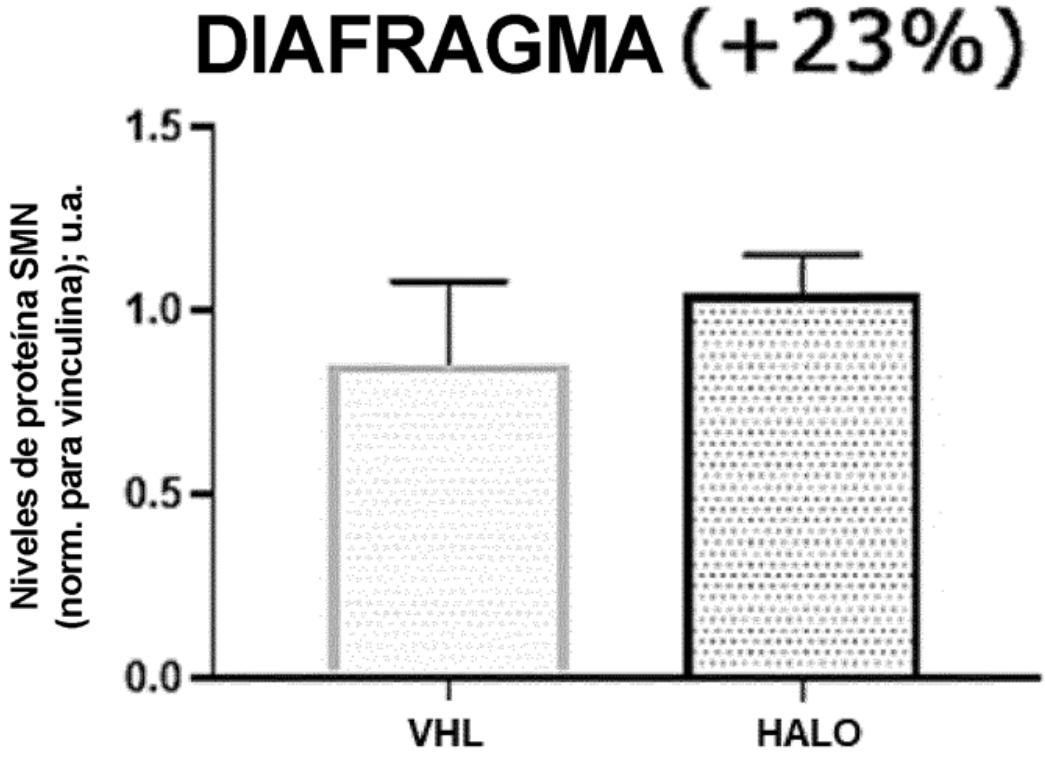
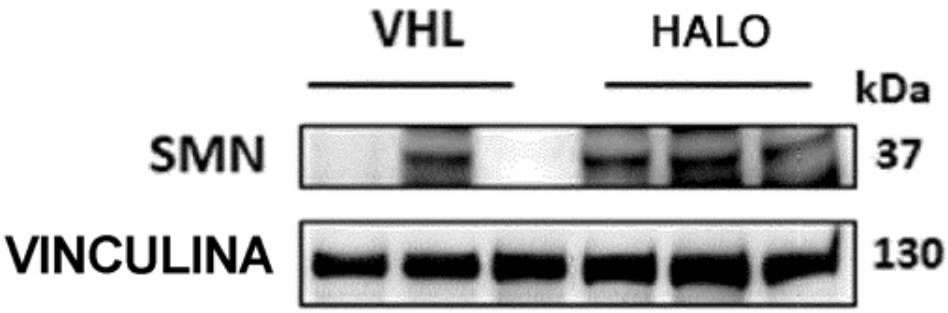


FIGURA 5 (cont.)

C1



C2

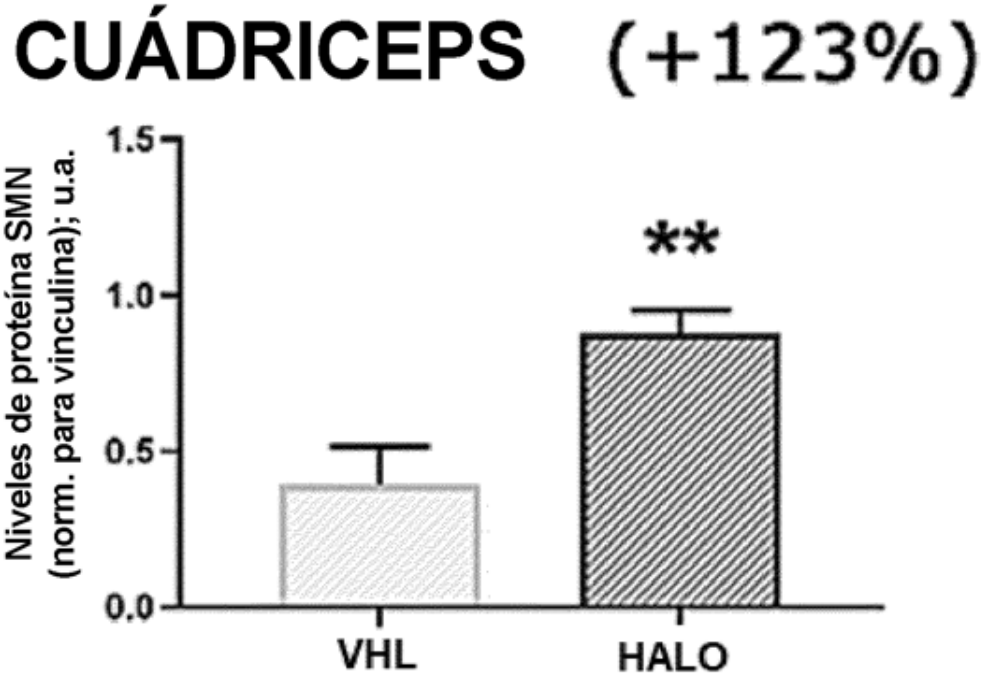
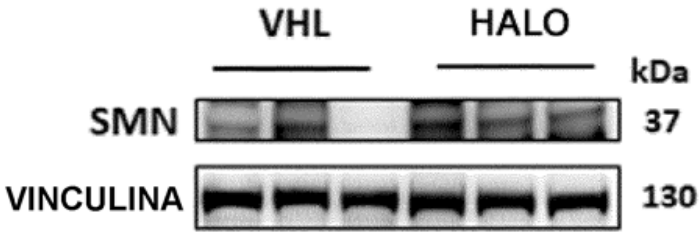


FIGURA 5 (cont.)

D1



D2

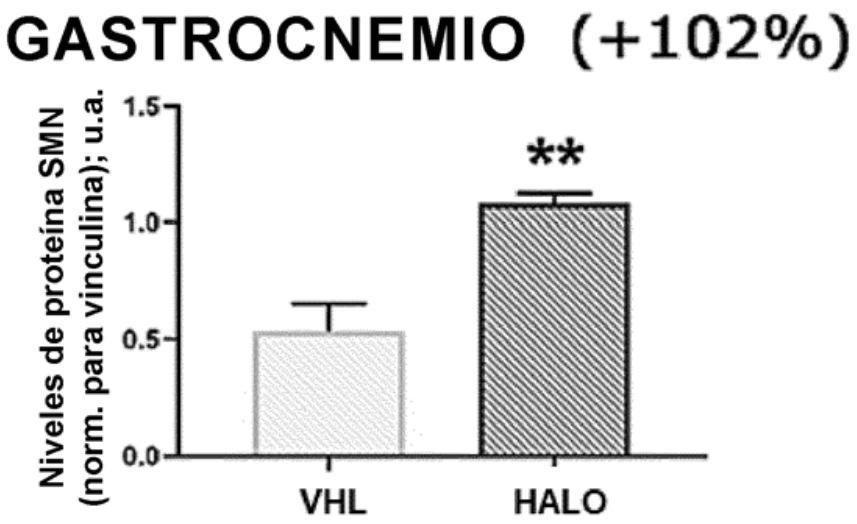


FIGURA 6

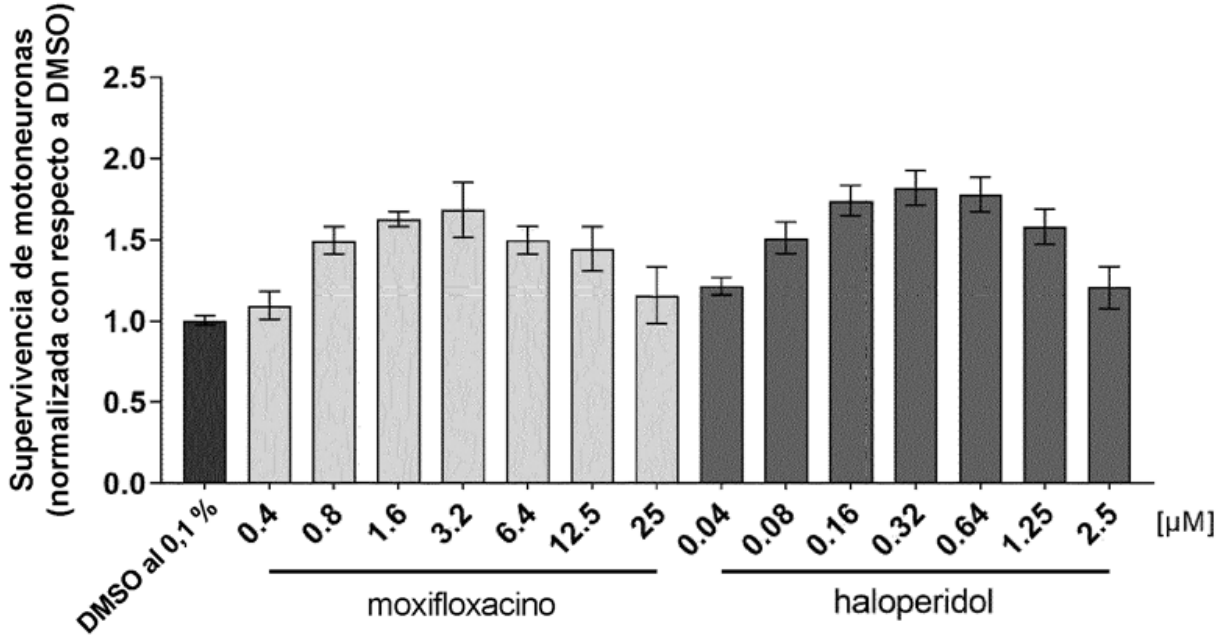


FIGURA 7

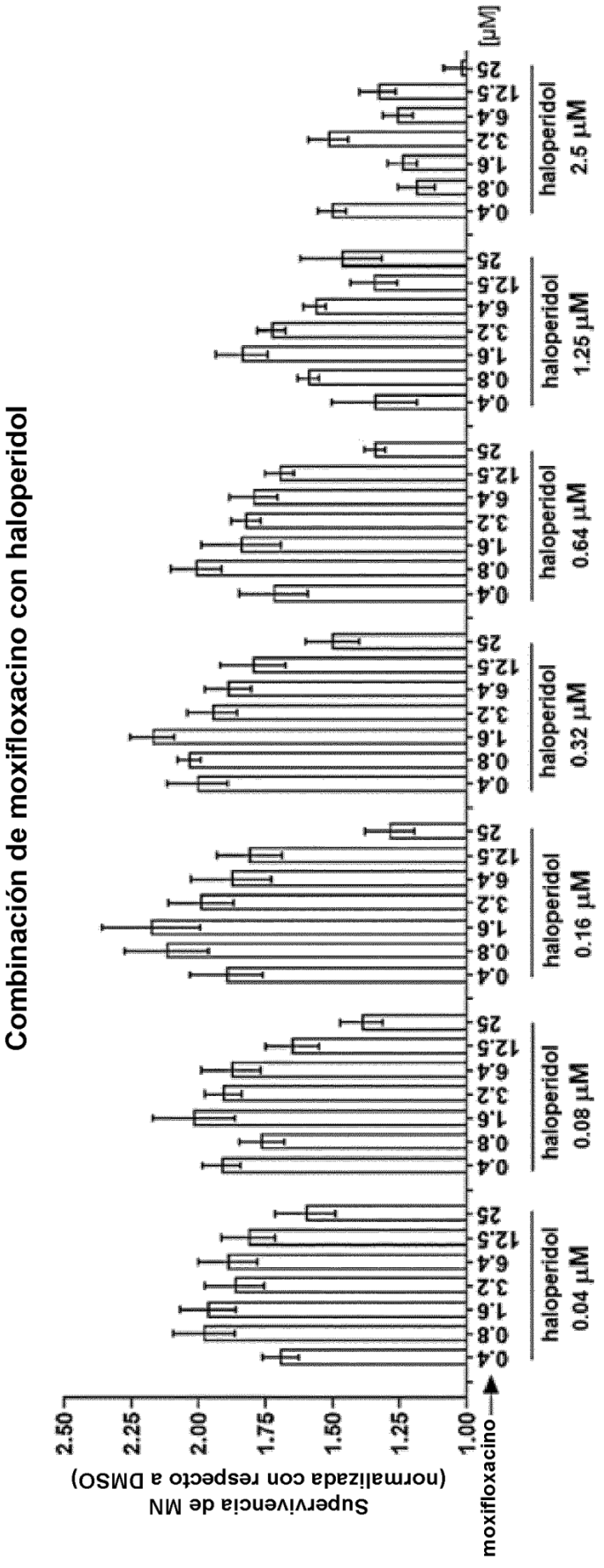

Combinación de moxifloxacino con haloperidol
Supervivencia de MN
(normalizada con respecto a DMSO)
2.50
2.25
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
moxifloxacino
[µM]
0.4
0.8
1.6
3.2
6.4
12.5
25
haloperidol
0.04 µM
haloperidol
0.08 µM
haloperidol
0.16 µM
haloperidol
0.32 µM
haloperidol
0.64 µM
haloperidol
1.25 µM
haloperidol
2.5 µM

FIGURA 8

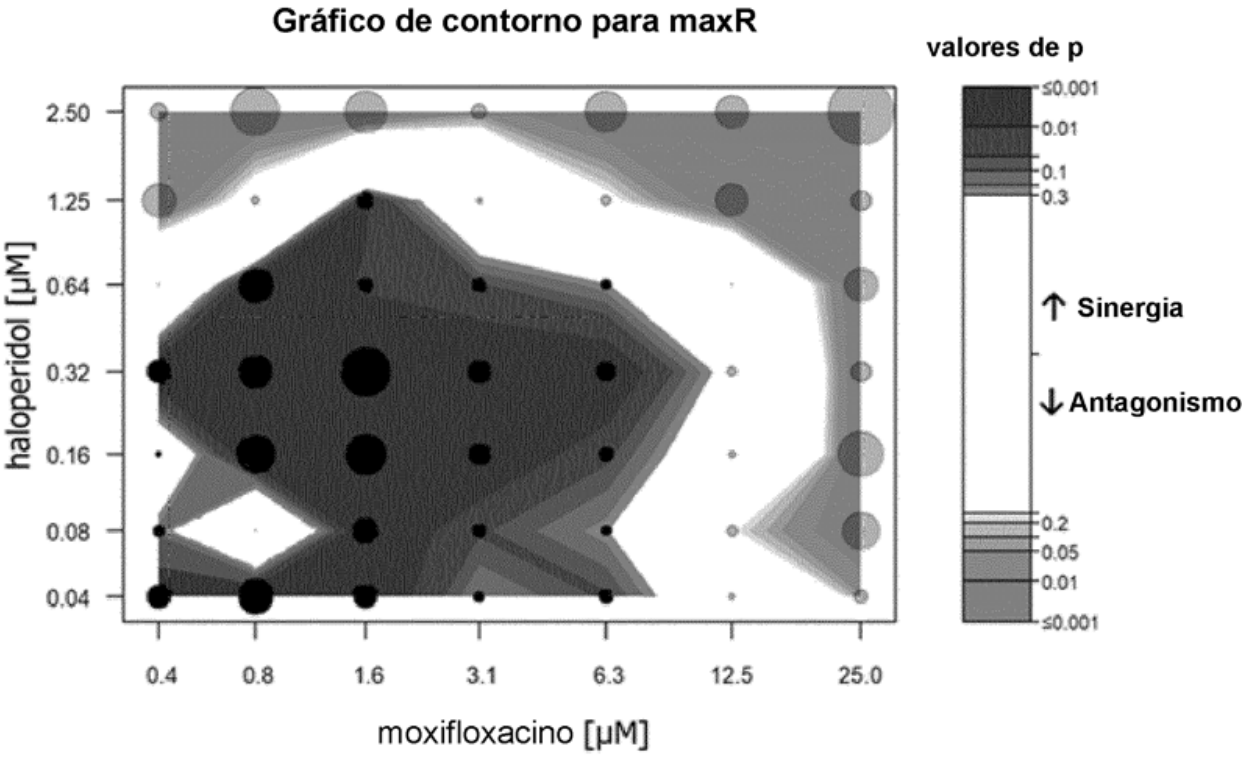
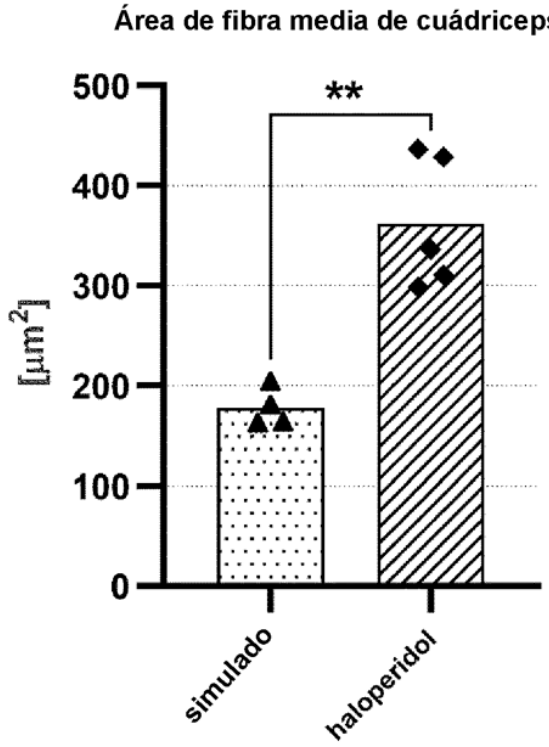


Gráfico de contorno para maxR
valores de p
≤0.001
0.01
0.1
0.3
↑ Sinergia
↓ Antagonismo
0.2
0.05
0.01
≤0.001
haloperidol [µM]
2.50
1.25
0.64
0.32
0.16
0.08
0.04
0.4
0.8
1.6
3.1
6.3
12.5
25.0
moxifloxacino [µM]

FIGURA 9

A)


Área de fibra media de cuádriceps
**
500
400
300
200
100
0
[µm²]
simulado
haloperidol

B)

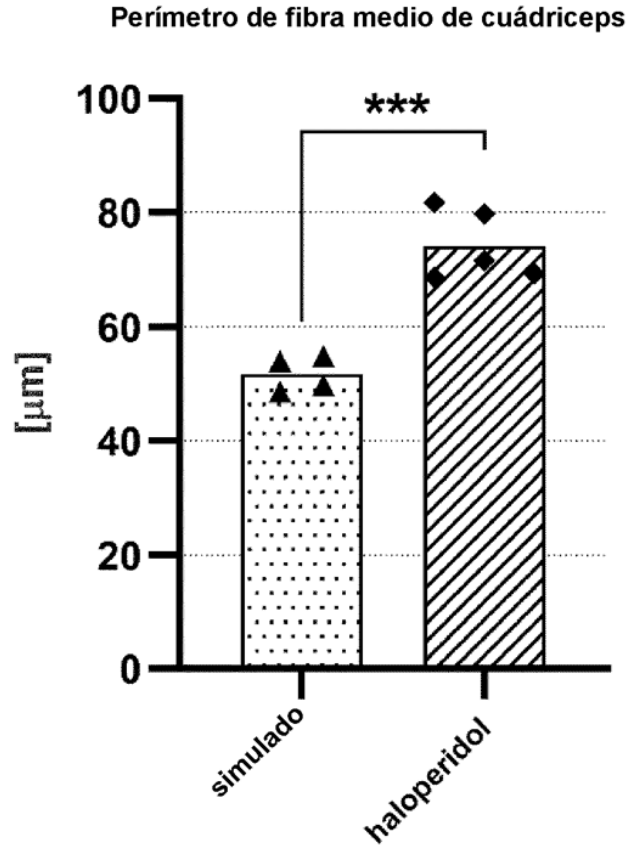

Perímetro de fibra medio de cuádriceps
***
100
80
60
40
20
0
[µm]
simulado
haloperidol

FIGURA 9 (cont.)

C)

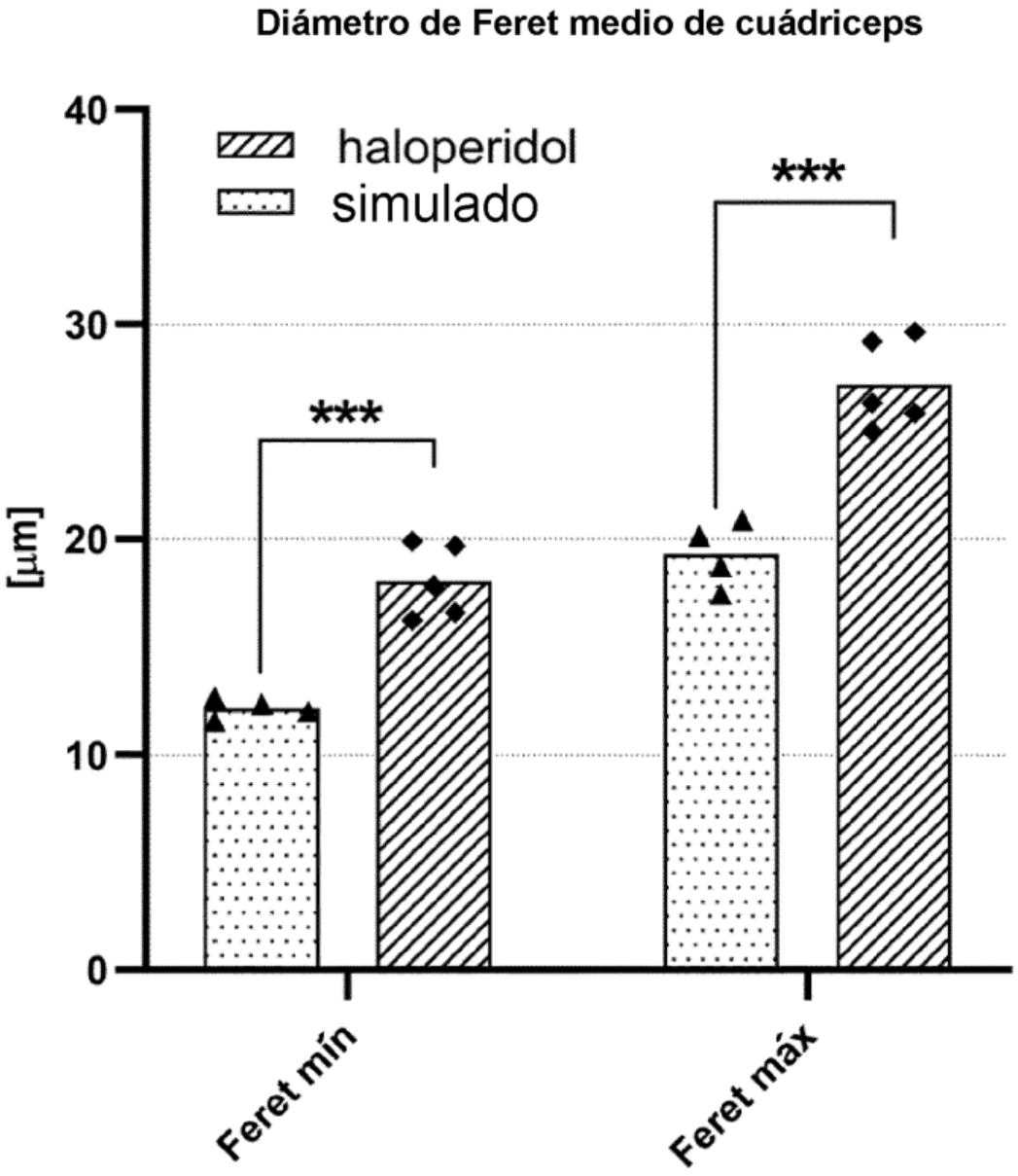
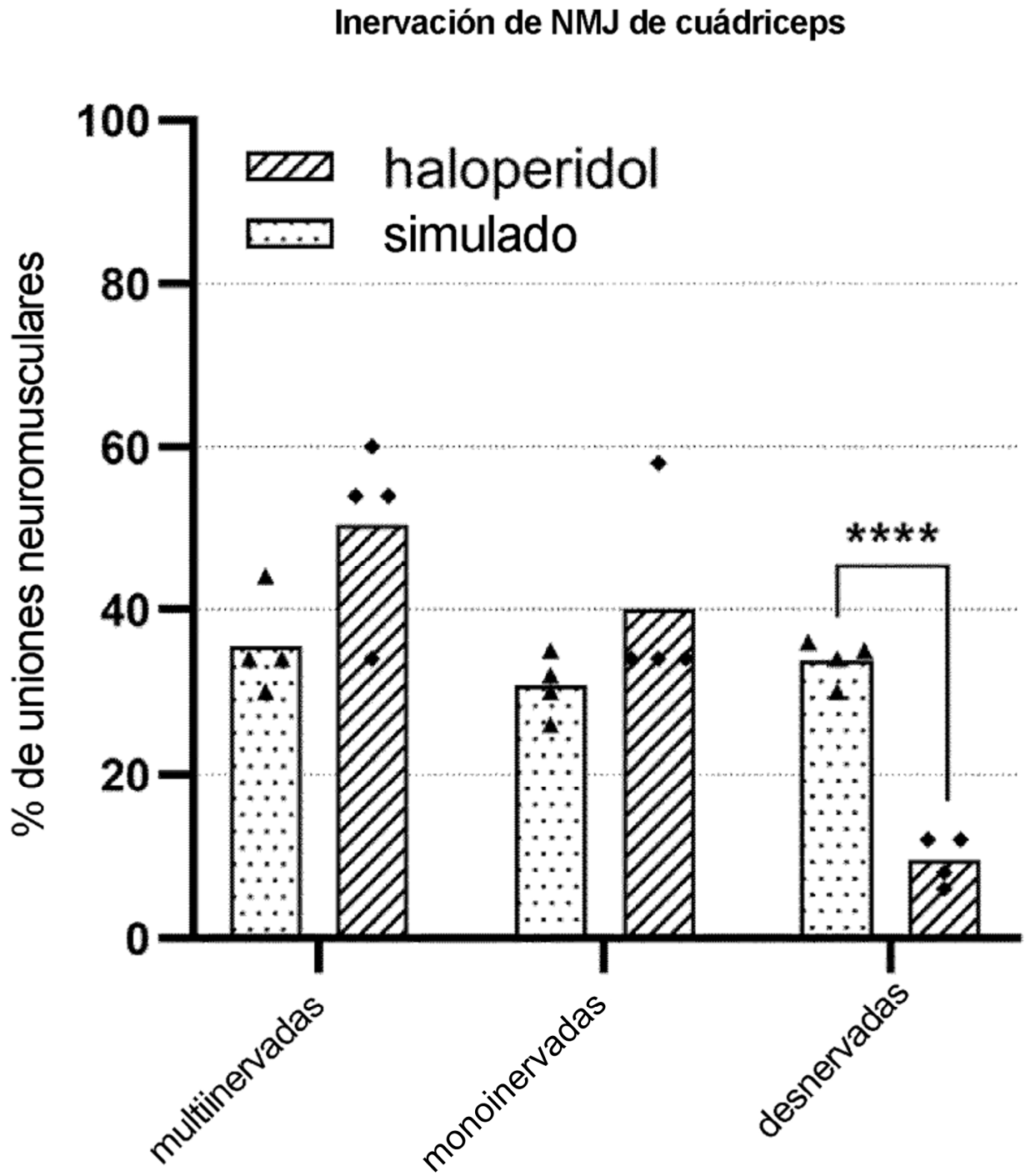


FIGURA 10


Inervación de NMJ de cuádriceps
haloperidol
simulado
% de uniones neuromusculares
100
80
60
40
20
0
****
multiinervadas
monoinervadas
desnervadas

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos citados en la descripción

- WO 2020249577 A **[0015]**

Literatura no patente citada en la descripción

- **ALTSCHUL**. *Nucl. Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 **[0031]**
- **NARYSHKIN, N. A. et al.** *Science*, 2014, vol. 345, 688-693 **[0094]**
- **ALTSCHUL. et al.** A protein alignment scoring system sensitive at all evolutionary distances. *J. Mol. Evol.*, 1993, vol. 36, 290-300 **[0141]**
- **ALTSCHUL et al.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, vol. 25, 3389-3402 **[0142]**
- **BOIDO M ; DE AMICIS E ; VALSECCHI V ; TREVISAN M ; ALA U ; RUEGG MA ; HETTWER S ; VERCELLI A**. Increasing Agrin Function Antagonizes Muscle Atrophy and Motor Impairment in Spinal Muscular Atrophy. *Front Cell Neurosci.*, 30 January 2018, vol. 12, 17 **[0143]**
- **BOIDO M ; VERCELLI A**. Neuromuscular Junctions as Key Contributors and Therapeutic Targets in Spinal Muscular Atrophy. *Front Neuroanat*, 2016, vol. 10, https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00006 **[0144]**
- **BRUTLAG et al.** Improved sensitivity of biological sequence database searches. *Computer Applications in the Biosciences*, 1990, vol. 6, 237-245 **[0145]**
- **CHAOUCH, SORAYA ; VINCENT MOULY ; AURÉLIE GOYENVALLE ; ADELINE VULIN ; KAMEL MAMCHAOUI ; ELISA NEGRONI ; JAMES DI SANTO et al.** Immortalized Skin Fibroblasts Expressing Conditional MyoD as a Renewable and Reliable Source of Converted Human Muscle Cells to Assess Therapeutic Strategies for Muscular Dystrophies: Validation of an Exon-Skipping Approach to Restore Dystrophin in Duchenne Muscular Dystrophy Cells. *Human Gene Therapy*, 2009, vol. 20 (7), 784-90, https://doi.org/10.1089/hum.2008.163 **[0146]**
- **EDOM, F. ; V. MOULY ; J. P. BARBET ; M. Y. FISZMAN ; G. S. BUTLER-BROWNE**. Clones of Human Satellite Cells Can Express in Vitro Both Fast and Slow Myosin Heavy Chains. *Developmental Biology*, 1994, vol. 164 (1), 219-29, https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1193 **[0147]**
- **EL-KHODOR BF ; EDGAR N ; CHEN A ; WINBERG ML ; JOYCE C ; BRUNNER D ; SUÁREZ-FARIÑAS M ; HEYES MP**. Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMNDelta7 neonate model of spinal muscular atrophy. *Exp Neurol.*, July 2008, vol. 212 (1), 29-43 **[0148]**
- **FUSAKI et al.** Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy*, 2009, vol. 85 (8), 348-362 **[0149]**
- **FRALISH Z ; LOTZ EM ; CHAVEZ T et al.** Neuromuscular Development and Disease: Learning From in vitro and in vivo Models. *Front Cell Dev Biol*, 2021, vol. 9, 764732, https://doi.org/10.3389/fcell.2021.764732 **[0150]**
- **HENIKOFF ; HENIKOFF**. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *PNAS*, 1992, vol. 89 (22), 10915-9 **[0151]**
- **ALTSCHUL et al.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 **[0151]**
- **LIVAK et al.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, vol. 25 (4), 402-408 **[0152]**
- **JANUEL C ; MENDUTI G ; MAMCHAOUI K et al.** Moxifloxacin rescues SMA phenotypes in patient-derived cells and animal model. *Cell Mol Life Sci*, 2022, vol. 79, 441 **[0153]**
- **MAURY, Y. et al.** Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat Biotechnol*, 2015, vol. 33, 89-96 **[0154]**
- **NARYSHKIN, N. A. et al.** Motor neuron disease. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science*, 2014, vol. 345 (6197), 688-693 **[0155]**
- **RINDT H ; FENG Z ; MAZZASETTE C et al.** Astrocytes influence the severity of spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 2015, vol. 24, 4094-4102, https://doi.org/10.1093/hmg/ddv148 **[0156]**

- **THAS, O. ; TOURNY, A. ; VERBIST, B. ; HAWINKEL, S. ; NAZAROV, M. ; MUTAMBANENGWE, K. ; BIJNENS, L.** Statistical detection of synergy: New methods and a comparative study. *Pharmaceutical Statistics*, 2021, https://doi.org/10.1002/pst.2173 **[0157]**
- **THOMPSON et al.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, vol. 22 (22), 4673-4680 **[0158]**
- **VALSECCHI V ; BOIDO M ; DE AMICIS E et al.** Expression of Muscle-Specific MiRNA 206 in the Progression of Disease in a Murine SMA Model. *PLoS One*, 2015, vol. 10, e0128560, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128560 **[0159]**
- **VAN DER BORGHT, K. ; TOURNY, A. ; BAGDZIUNAS, R. ; THAS, O. ; NAZAROV, M. ; TURNER, H. ; VERBIST, B. ; CEULEMANS, H.** BIGL: Biochemically Intuitive Generalized Loewe null model for prediction of the expected combined effect compatible with partial agonism and antagonism. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7 (1), 17935, https://doi.org/10.1038/s41598-017-18068-5 **[0160]**
- **YOUNG, JOANNE ; YORAN MARGARON ; MATHIEU FERNANDES ; EVE DUCHEMIN-PELLETIER ; JORIS MICHAUD ; MÉLANIE FLAENDER ; OANA LORINTIU ; SÉBASTIEN DEGOT ; PAULINE POYDENOT**. MyoScreen, a High-Throughput Phenotypic Screening Platform Enabling Muscle Drug Discovery. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery*, 2018, vol. 23 (8), 790-806, https://doi.org/10.1177/2472555218761102 **[0161]**