

SAFINAMIDA PARA EL TRATAMIENTO DE MIOTONÍA

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de miotonía. En particular, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden safinamida o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección, en donde la miotonía es un aspecto no deseado.

Antecedente de la Invención

La miotonía se puede definir como una persistencia involuntaria de contracción de músculos esqueléticos después de la activación, que causa rigidez y dolor.

La miotonía se debe a una anomalía de la membrana de fibra muscular (hiperexcitabilidad patológica del sarcolema) que resulta en un retraso prolongado antes de que los músculos se relajen después de una contracción y puede ser doloroso e interferir gravemente con las actividades motrices diarias y la calidad de vida. Un músculo comienza su contracción en el momento justo, pero la actividad eléctrica continúa después de que la señal nerviosa ha terminado, causando una rigidez o "bloqueo" del músculo.

La relajación muscular lenta debilitante experimentada por pacientes con trastornos miotónicos se causa por disparo involuntario de potenciales de acción (APs). En afecciones fisiológicas, corrientes de cloruro (mediadas por el canal de cloruro CIC-1) que representan el 70 hasta 80% de la conductancia de la membrana muscular en reposo, compensan la influencia despolarizante de la acumulación de K⁺ en los túbulos T musculares (Adrian and Bryant, J Physiol 1974; 240: 505–515) y prevenir la apertura del canal de Na⁺ dependiente de voltaje evitando así los AP involuntarios y descarga repetitiva observada en la miotonía.

Las mutaciones en genes que codifican el cloruro del músculo esquelético (CLCN1) y/o canales de sodio (SCN4A) resulta en múltiples defectos en canalización que conduce a hiperexcitabilidad muscular y descargas miotónicas (Burge and Hanna, Curr Neurol Neurosci Rep 2012;12:62–69).

La miotonía es un síntoma distintivo de diversas enfermedades genéticas y adquiridas que se pueden clasificar como trastornos miotónicos tales como miotonías no distróficas y distrofias miotónicas.

Las miotonías no distróficas (NDMs, por sus siglas en inglés) son enfermedades puras del músculo esquelético sin la implicación del corazón o músculos en el tracto digestivo. Dependiendo del tipo y la gravedad del trastorno, la miotonía puede afectar cualquier cosa desde las piernas, cara, manos, caderas, hombros, pies, párpados, hasta la capacidad de una persona para hablar con claridad. Las sorpresas emocionales, resfriado, potasio o ejercicio son posibles desencadenantes de la miotonía.

En los casos más graves, las NDM se pueden debilitar crónicamente debido al dolor y rigidez muscular. Muy pocos casos de muerte perinatal se han reportado como una complicación lamentable de una afección miotónica grave llamada SNEL (siglas en inglés de Laringoespasmos Episódicos Neonatales Graves) (Gay et al., Am J Med Genet A 2008; 146:380-383; Lion-Francois et al., Neurology

2010; 75(7): 641-645. Portaro et al., Pediatrics 2016; 137(4); Lehmann-Horn et al., Acta Myologica 2017; XXXVI: 125-134). Muy recientemente, las mutaciones miotónicas en el canal de sodio se han identificado como un factor de riesgo de SIDS (siglas en inglés Síndrome de Muerte Infantil Súbita) (Mannikko et al., Lancet 2018;391(10129):1483-1492).

5 Las NDM se pueden clasificar como trastornos del canal iónico causados por mutaciones puntuales convencionales o eliminaciones en los genes de los canales de cloruro o sodio con expresión exclusiva en músculo esquelético. Las NDM se sabe que son causadas por mutaciones de ganancia de función en el gen SCN4A que codifica el canal de sodio Nav1.4 del músculo esquelético (paramiotonía congénita y miotonía de canal de sodio) o mutaciones con pérdida de función en gen CLCN1 que codifica el canal de cloruro CIC-1 del músculo esquelético (miotonía congénita).

10 La actividad reducida de canales de cloruro mutados o actividad incrementada de canales de sodio mutados determina una hiperexcitabilidad patológica del sarcolema, con aparición de descargas potenciales de acción de alta frecuencia; la dificultad constante en relajación muscular es responsable de la rigidez característica de músculo miotónico.

15 Las NDM incluyen canalopatías de cloruro, tal como, por ejemplo, miotonía congénita de Thomsen y miotonía congénita de Becker; y canalopatías de sodio tal como, por ejemplo, paramiotonía congénita con/sin parálisis periódica hipercalémica y miotonías de canal de sodio (SCMs), que incluyen, por ejemplo, miotonía fluctuante, miotonía permanente y miotonía que responde a acetazolamida, miotonía agravada K⁺, y laringoespasmos episódicos neonatales graves (SNEL). Todas las formas de miotonía congénita son causadas por mutaciones que resultan en pérdida de la función del canal de cloruro CIC-1, que se expresa exclusivamente en la membrana del músculo esquelético.

20 La siguiente descripción clínica y opciones terapéuticas potenciales para las NDM enumeradas anteriormente se han tomado de Review Article Myotonic disorders of Ami Mankodi, publicado en Neurology India, Julio-Septiembre 2008, Vol.56, Emisión 3.

25 Miotonía congénita de Thomsen

La llamada miotonía congénita de Thomsen se deriva de la descripción original de la enfermedad en la década de 1870 por el médico Danés en sí mismo y los miembros de su familia con patrón de herencia dominante autosómico. Los síntomas comienzan durante la infancia o la niñez. Los pacientes reportan rigidez muscular indolora sobre la activación muscular después del descanso. La miotonía puede disminuir con esfuerzos musculares repetitivos, el llamado fenómeno de calentamiento. Las sorpresas emocionales, resfriado, o embarazo pueden empeorar la miotonía. El examen físico puede revelar un aspecto atlético con hipertrofia muscular en extremidades y músculos faciales en algunos pacientes. Los pacientes demuestran miotonía de agarre manual y miotonía de párpados. Los pacientes pueden tener problemas para sentarse rápidamente después de estar en decúbito supino durante varios minutos reflejando miotonía en músculos paraespinales y proximales en las extremidades. La fuerza muscular es normal.

El pronóstico es bueno en la mayoría de los pacientes. Los pacientes con miotonía incapacitante puede obtener beneficio con mexiletina 150 mg por vía oral dos veces al día con una titulación gradual

hasta la dosis máxima de 300 mg por vía oral tres veces al día.

Miotonía congénita de Becker

La miotonía de Becker es una miotonía del canal de cloruro recesiva autosómica. El nombre se deriva del investigador que describió esta afección en la década de 1970. La presentación clínica incluye miotonía generalizada e hipertrofia muscular similar a la miotonía de Thomsen. Sin embargo, existen diferencias importantes: el inicio es insidioso y tardío durante la infancia; los síntomas suelen estar en las extremidades inferiores al inicio (el llamado miotonía congénita ascendente); debilidad lentamente progresiva en algunos pacientes; episodios transitorios de debilidad muscular proximal que duran segundos o minutos y se pueden desencadenar pidiendo al paciente que se levante rápidamente después de varios minutos de reposo supino; e hipertrofia más pronunciada de músculos en las extremidades inferiores. Exposición al frío, tensión muscular prolongada, embarazo, menstruación, y tensión emocional puede exacerbar miotonía. El examen físico revela el aspecto atlético con hipertrofia muscular, particularmente implicando músculos en las extremidades inferiores y alrededor de los hombros. Algunos pacientes pueden mostrar atrofia muscular en los antebrazos, manos y cuello anterior. La miotonía se reconoce fácilmente en muchos grupos de músculos incluyendo músculos masticatorios, músculos de la lengua y el cuello además de miotonía de agarre y retraso palpebral. El hallazgo más característico es una marcada dificultad para levantarse de la posición supina y subir escaleras que mejora gradualmente después de diversas etapas, secundario al fenómeno de calentamiento. Se cree que esto se debe a una combinación de miotonía y debilidad muscular. La mayoría de los pacientes avisan de debilidad muscular tras actividad después de un periodo de descanso. Algunos pacientes pueden tener debilidad persistente de las extremidades inferiores, que puede ser incapacitante en las actividades de la vida diaria. Los reflejos de estiramiento muscular se pueden deprimir en las extremidades inferiores. Los niveles de Creatina Cinasa (CK) pueden aumentar. La estimulación nerviosa repetitiva y la prueba corta de esfuerzo pueden mostrar disminución de la amplitud del potencial de acción muscular compuesto (CMAP). La prueba larga de esfuerzo puede revelar una pequeña disminución, que no es una característica de la miotonía de Thomsen. La mayoría de los pacientes disfrutan de buena calidad de vida. Los síntomas únicamente son lentamente progresivos y pueden estabilizarse después de que un paciente alcanza la tercera década. El tratamiento se dirige hacia las modificaciones de la actividad, evitar los desencadenantes de la miotonía y la debilidad. En algunos pacientes con terapia farmacológica de miotonía incapacitante incluyendo mexiletina, tocainida o acetazolamida es benéfico.

Paramiotonía congénita (PMC)

La paramiotonía congénita se refiere a miotonía, que empeora con ejercicio, particularmente en temperaturas frías. Los síntomas comienzan durante la infancia o la niñez. La presentación típica incluye cierre prolongado de los ojos después de llorar en bebés o lavarse la cara con agua fría y "lengua congelada" después de comer helado. Algunos pacientes pueden informar debilidad flácida después de ejercitarse en temperaturas frías. La ingestión de potasio, descanso seguido de ejercicio y el ayuno prolongado también puede agravar la paramiotonía. El examen físico revela paramiotonía palpebral

prominente que se manifiesta como incapacidad para abrir los ojos después de un cierre ocular sostenido repetido o una retracción palpebral sostenida después de una mirada hacia arriba prolongada. La colocación de la bolsa de hielo sobre los párpados puede agravar la paramiotonía. La inmersión de la mano en agua helada durante 10-15 minutos antes del ejercicio de agarre manual puede provocar la paramiotonía y posterior debilidad. Los estudios de conducción nerviosa motora y sensitiva son normales. La estimulación nerviosa repetitiva en 5 Hz puede resultar en disminución en amplitudes CMAP. Similarmente, la prueba corta de esfuerzo después de la exposición al frío también puede resultar en disminución de la respuesta. La electromiografía (EMG) revela miotonía en muchos músculos. Los potenciales de fibrilación y las ondas agudas positivas pueden volverse evidentes después de la exposición al frío. La contractura muscular silenciosa puede ocurrir con la exposición al frío extremo. EMG de fibra simple puede mostrar incrementa la fluctuación y ocasionalmente bloquea. La biopsia muscular no se indica para el diagnóstico. En la mayoría de los pacientes, evitando desencadenantes tales como ejercicio y exposición al frío son suficientes para mantener una buena calidad de vida. La mexiletina se puede usar para deshabilitar la paramiotonía.

Las miotonías sensibles al potasio

Existen tres distintos trastornos miotónicos del canal de sodio, en los cuales la miotonía se agrava con la ingestión de potasio. La exposición al frío generalmente no empeora la miotonía como lo hace en la paramiotonía congénita. La debilidad no es un síntoma prominente.

La miotonía fluctuante se caracteriza por miotonía generalizada desencadenada por ingestión de potasio o por ejercicio. En contraste con la paramiotonía, los pacientes pueden tener un efecto de calentamiento después de ejercicio inicial, sin embargo, la miotonía se vuelve más pronunciada después de un segundo episodio de ejercicio siguiendo un periodo de descanso de alrededor de 20-40 min. Los pacientes informan fluctuación en la severidad de miotonía con periodos sin miotonía evidente que duran de horas a días. La masa y fuerza muscular son normales. Los niveles de CK se pueden elevar de dos hasta tres veces. La EMG puede revelar miotonía y potenciales de fibrilación. Los estudios de conducción nerviosa son normales. La biopsia muscular puede revelar anomalías leves tales como aumento de los núcleos internos, variabilidad del tamaño de la fibra y vacuolas sub-sarcolema. La mayoría de los pacientes no requieren medicación. Puede ser suficiente evitar el consumo de alimentos ricos en potasio. La mexiletina puede ser útil para aliviar la rigidez miotónica incapacitante.

La miotonía permanente es una forma rara y severa de miotonía no distrófica. La presentación clínica incluye aparición antes de los 10 años, miotonía generalizada grave, e hipertrofia muscular. La debilidad muscular no es prominente. La miotonía grave que implica músculos intercostales puede resultar en compromiso respiratorio con hipoxemia y acidosis. La ingestión de potasio y ejercicio son los desencadenantes habituales de la miotonía. La EMG revela la miotonía generalizada con potenciales de unidad de motor normales. La mexiletina puede proporcionar un alivio parcial de la rigidez miotónica. La acetazolamida puede ayudar a aliviar la rigidez muscular inducida por el ejercicio o calambres.

La miotonía que responde a acetazolamida se caracteriza por miotonía generalizada empeorada por ingestión de potasio, resfriado y ayuno, y excelente recuperación con acetazolamida. Los pacientes

se presentan durante la infancia con miotonía generalizada progresiva, que es fácilmente evidente en el examen clínico y por EMG. Paramiotonía palpebral puede observarse en algunos pacientes. La rigidez miotónica puede ser dolorosa. El ejercicio generalmente no tiene un efecto significativo en la miotonía. El tratamiento incluye acetazolamida con dosis inicial de 125 mg diaria con titulación gradual hasta 250 mg tres veces al día si se requiere. Los efectos secundarios incluyen formación de cálculos renales, parestesia, náuseas, confusión, irritabilidad del estado de ánimo, depresión, erupción cutánea y anomalías de la función hepática. Monitoreo regular de hemograma completo y las funciones hepáticas se recomiendan. La mexiletina también puede aliviar miotonía.

Las NDM son distintas de distrofias miotónicas debido a la ausencia de debilidad progresiva y características sistémicas.

Las distrofias miotónicas (DMs) son enfermedades caracterizadas por miopatía progresiva, miotonía, y participación multiorgánica.

La presencia de miotonía no es el aspecto más desalentador de las DM, pero es el sello distintivo reconocido de la afección, y el aspecto de la enfermedad que la distingue de otras formas de distrofia muscular.

Hasta la fecha, dos formas distintas causadas por mutaciones similares se han identificado: distrofia miotónica tipo 1 (DM1) y distrofia miotónica tipo 2 (DM2).

En particular, DM1 y DM2 son enfermedades humanas heredadas debido a la expansión de repeticiones de nucleótidos en cromosoma 19 y 3, respectivamente (Meola, Acta Myol. 2013; 32(3):154–165). Tal alteración lleva a la acumulación de ARN tóxico en el núcleo, lo que afecta el procesamiento normal de proteína en muchos tipos de células. Por lo tanto, DM1 y DM2 son enfermedades multisistémicas que afectan, por ejemplo el SNC, el corazón, y músculo esquelético. En el último, el canal CIC-1 es un objetivo de este proceso tóxico. La reducción de proteína CIC-1 y alteración de su empalme es el principal responsable de miotonía en pacientes con DM1 y DM2 (Charlet-B et al., Mol Cell. 2002; 10(1):45–53; Mankodi et al., Mol Cell. 2002; 10(1):35–44; and Chen et al., J Mol Biol. 2007; 368(1):8–17).

Actualmente, los medicamentos para la miotonía tienen como objetivo reducir la hiperexcitabilidad patológica del sarcolema. Esos medicamentos incluyen mexiletina (Logigian et al., Neurology 2010;74(18):1441-1448).

Breve Descripción de la Invención

Buscando fármacos antimiotónicos que operen para la reducción de hiperexcitabilidad patológica del sarcolema, los presentes inventores han encontrado que la safinamida es capaz de restaurar la excitabilidad del sarcolema en fibras de músculo miotónico aisladas y para aliviar los síntomas miotónicos *in vivo* en un modelo de rata inducido farmacológicamente de miotonía. Por lo tanto, la presente invención se basa en este hallazgo y se refiere a safinamida como un fármaco anti-miotónico para tratar pacientes con trastornos miotónicos en necesidad de eso.

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en combinación con excipientes adecuados, vehículos o portadores, para su uso en trastornos miotónicos.

Breve Descripción de los Dibujos

La FIG. 1 muestra el efecto antimiotónico *in vitro* de safinamida en excitabilidad de la fibra de músculo esquelético de rata en una afección como miotonía inducida por ácido 9-antraceno carboxílico (9-AC). La excitabilidad de la fibra de músculo esquelético (número máximo de picos, N picos) se midió antes (control, ctrl), después de solo 9-AC 50 μ M y, después de aplicación concomitante de safinamida en seis diferentes concentraciones (0.1 hasta 30 μ M). El efecto antimiotónico fue reversible tras el lavado con safinamida (50 μ M 9-AC, columna de la derecha). Los resultados se expresaron como Media $\pm$ S.E.M; $P < 0.05$ vs solo 9-AC, prueba t de Bonferroni.

La FIG. 2 muestra el efecto de dosis-respuesta antimiotónico *in vivo* de safinamida en un modelo de rata inducido farmacológicamente de miotonía congénita. La safinamida en 0.3, 1, 3, 10 y 30 mg/kg (respectivamente: triángulo negro, círculo gris, círculo vacío, círculo negro, triángulo gris; solo vehículo: cuadrado vacío) dada oralmente fue capaz de contrarrestar la prolongación del tiempo reflejo (TRR, por sus siglas en inglés) inducido por ácido 9-antraceno carboxílico (9-AC, 30 mg/kg) como signo de miotonía en la rata. Los resultados se expresaron como Media $\pm$ S.E.M, $n=5-7$ ratas; $P < 0.05$ vs vehículo, prueba t de Bonferroni.

Descripción Detallada de la Invención

En consecuencia, la presente invención se refiere a safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de una afección causada por hiperexcitabilidad patológica del sarcolema, y/o de cualquier otra afección en la cual la restauración de excitabilidad del sarcolema normal puede producir un beneficio o mejora terapéutica, en donde tal afección es un trastorno miotónico.

De hecho, hasta el 30% de pacientes con trastornos miotónicos encuentran ineficaz mexiletina (el fármaco de referencia en trastornos miotónicos) (Desaphy et al., 2013; Suetterlin et al., JAMA Neurol. 2015 Dec; 72(12): 1531-3; Portaro et al., 2016).

Para el propósito de la presente invención, los trastornos miotónicos donde la mexiletina es ineficaz se han definidos resistentes a la mexiletina y una modalidad adicional de la presente invención se refiere al uso de safinamida en el tratamiento de trastornos miotónicos resistentes a la mexiletina.

Además, la presente invención se refiere a safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de un trastorno miotónico, en donde el trastorno miotónico es, preferiblemente, una miotonía no distrófica (NDM).

Aún más preferiblemente, los pacientes con NDM para quienes la safinamida puede ser benéfica portan una mutación sin sentido en el gen SCN4A. De hecho, sin estar ligado a ninguna teoría en particular y como se detalla mejor en la parte experimental, se ha encontrado que la potencia de safinamida, medida como valores de IC_{50} al potencial de membrana en reposo y después de pulsos despolarizantes repetitivos, no disminuye, en comparación con el tipo natural, en células transfectadas con las mutaciones sin sentido en el canal $hNa_v1.4$ (Desaphy et al., 2001, 2003 and 2016). Un compuesto capaz de bloquear canales de sodio de una manera dependiente del uso y de la frecuencia se espera que disminuya la descarga anormal pero que no afecte la actividad normal de las fibras musculares.

Por el contrario, de manera notable, la potencia de mexiletina significativamente disminuye en las células transfectadas con mutaciones puntuales de hNav1.4.

En una modalidad adicional, la presente invención se refiere a safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de una NDM, en donde tal NDM es, preferiblemente, una miotonía congénita tal como, por ejemplo, miotonía congénita de Thomsen o miotonía congénita de Becker, paramiotonía congénita o una miotonía del canal de sodio o cloruro; más preferiblemente, tal miotonía de canal de sodio es una canalopatía hNav1.4 y el paciente en necesidad de eso es un portador de mutación en el gen SCN4A, que codifica el canal hNav1.4.

En una modalidad adicional, la presente invención se refiere a safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de una miotonía congénita, en donde tal miotonía congénita es miotonía congénita de Thomsen o miotonía congénita de Becker.

En una modalidad preferida, la presente invención se refiere a safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de paramiotonía congénita.

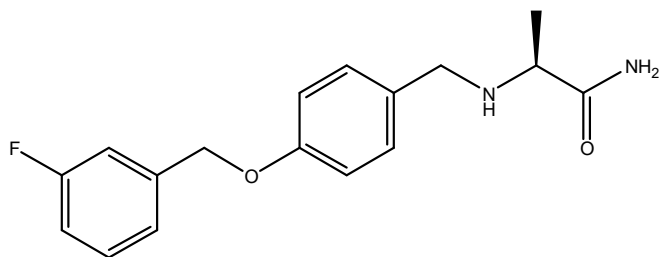
Además, la presente invención se refiere a safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de una miotonía de canal de sodio, en donde tal miotonía de canal de sodio es miotonía fluctuante, miotonía permanente o miotonía que responde a acetazolamida.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de un trastorno miotónico, en donde tal trastorno miotónico es preferiblemente una DM.

Aún más, la presente invención se refiere a safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de una DM, en donde tal DM preferiblemente se selecciona de DM1 y DM2.

En un aspecto preferido, la presente invención se refiere a safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de una miotonía congénita.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en aliviar uno o más de síntomas miotónicos asociados con una afección como se definió anteriormente, en donde los síntomas miotónicos incluyen rigidez muscular esquelética, espasmos, y dolor. De acuerdo a la presente invención, safinamida es (2S)-2-[[4-[(3-fluorofenil)metoxi]fenil]metilamino]propanamida, de la fórmula:



La safinamida está preferiblemente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables de safinamida incluyen sales de adición con ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido nítrico, clorhídrico, sulfúrico, perclórico y fosfórico o con ácidos orgánicos, por ejemplo

ácido acético, propiónico, glicólico, láctico, oxálico, malónico, málico, tartárico, cítrico, benzoico, cinámico, mandélico, metanosulfónico y salicílico; metanosulfonato de safinamida (mesilato) siendo la sal preferida.

Como se usa en la presente, los artículos "un" y "uno/una" se refieren a uno o hasta más de uno (por ejemplo, hasta al menos uno) del objeto gramatical del artículo.

5 Como se usa en la presente, el término "enfermedad", "trastorno", o "afección" se usa intercambiablemente.

Como se usa en la presente, el término "tratar" o "tratamiento", se refiere a obtener el efecto farmacológico deseado incluyendo revertir, aliviar, inhibir el progreso, o prevenir el trastorno o afección a la cual tal término se aplica, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección.

10 La safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se incluyen típicamente en una composición farmacéutica.

Una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos miotónicos como se definió anteriormente y de acuerdo a la presente invención, comprende safinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en una cantidad efectiva, suficiente para proporcionar ya sea el efecto terapéutico deseado o el alivio de síntomas de trastornos miotónicos. La composición farmacéutica comprende portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Una composición farmacéutica de acuerdo a la presente invención se puede administrar a un sujeto/paciente por cualquier ruta conveniente de administración, ya sea sistémicamente/periféricamente o tópicamente (esto es, en el sitio de la acción deseada).

20 Una composición farmacéutica de acuerdo a la presente invención se puede formular para administración oral, administración tópica, administración transdérmica, administración parenteral y combinaciones de las mismas. Las composiciones preferidas son para administración oral o parenteral. Formas adecuadas para administración oral incluyen comprimidos, píldoras comprimidas o recubiertas, sobres, trociscos, granulados, cápsulas de gelatina duras o suaves, comprimidos sublinguales, jarabes, 25 soluciones, y suspensiones; para administración parenteral la invención proporciona ampollas o viales que incluyen una emulsión o solución acuosa o no acuosa; para administración rectal se proporcionan supositorios con vehículos hidrofílicos o hidrofóbicos; y para aplicación tópica como ungüentos y suministro transdérmico se proporcionan sistemas de suministro adecuados como se conoce en la técnica.

30 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo a la presente invención se pueden preparar por procesos, que son conocidos *per se* y familiares para la persona experta en la técnica.

El régimen de dosificación para safinamida o sales farmacéuticamente aceptables del mismo y/o composiciones farmacéuticas que contienen el mismo, se basa en una variedad de factores, que incluyen el tipo, edad, peso, sexo y condición médica del sujeto, la severidad de la afección y/o síntomas 35 miotónicos asociados con tal afección, y la ruta de administración.

De esta manera el régimen de dosificación puede variar ampliamente. Los niveles de dosificación del orden de alrededor de 5 hasta alrededor de 500 mg por día (administrado en dosis simples o divididas) de safinamida o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos son útiles en el tratamiento

de las afecciones indicadas anteriormente. En una modalidad, la dosis diaria total es típicamente desde alrededor de 10 hasta alrededor de 250 mg. En otra modalidad, la dosis diaria total es típicamente desde alrededor de 50 hasta alrededor de 100 mg.

Los comprimidos orales recubiertos con película de metanosulfonato de safinamida, en una dosis
5 de 50 y 100 mg, actualmente se encuentran en el mercado bajo el nombre comercial Xadago®.

De acuerdo a la presente invención, la actividad antimiotónica de safinamida se ha evaluado al usar protocolos experimentales que imitan las condiciones miotónicas tanto *in vitro* (hiperexcitabilidad del sarcolemma en fibras del músculo esquelético miotónicas) como *in vivo* (modelo de rata inducido farmacológicamente de miotonía congénita imitando la afección patológica humana en la cual una pérdida
10 genética de la conductancia del cloruro causa alteración de la relajación muscular y rigidez muscular; Desaphy et al., Neuropharmacology 2013, 65: 21-7; y Desaphy et al., Exp Neurol 2014; 255: 96–102).

Los siguientes Ejemplos y sus FIGS. 1 y 2 que acompañan ilustran la invención sin limitar su alcance.

PARTE EXPERIMENTAL

15 **EJEMPLO 1. Actividad antimiotónica *In vitro* de safinamida en fibras del músculo esquelético de rata**

La actividad antimiotónica de safinamida se evaluó al registrar la excitabilidad del sarcolemma en microfibras simples de los músculos *Extensor Digitorum Longus* (EDL) aislados usando técnica de pinza de corriente de dos microelectrodos. El modelo *in vitro* de miotonía congénita se obtuvo al incubar
20 músculos EDL de rata con ácido 9-antraceno carboxílico (9-AC) (Conte Camerino et al., Muscle Nerve. 1989; 12(11): 898-904. Altamura et al., Br J Pharmacol. 2018; 175(10): 1770-1780). El aumento de excitabilidad del sarcolemma causado por 9-AC a través del bloqueo de canales de cloruro de CIC-1 de músculo esquelético imitaba la activación del potencial de acción anormal observada en pacientes afectados por miotonía congénita.

Los músculos EDL se disecaron de ratas Wistar macho bajo anestesia profunda (80 mg/kg de ketamina ip y 10 mg/kg de xilacina ip). Los músculos se colocaron en un baño muscular de 25 mL mantenido a 30°C y perfundido con solución salina (gaseado con 95% de O₂ y 5% de CO₂; pH=7.2–7.3). Por medio de técnica estándar de dos microelectrodos intracelulares, el potencial de membrana en reposo y las características de excitabilidad (número de picos) de las fibras musculares se midieron en el
30 modo de pinza de corriente. Las características de excitabilidad de las fibras muestreadas se determinaron al grabar la respuesta del potencial de la membrana intracelular a un pulso de corriente constante de onda cuadrada (100 ms). En cada fibra, el potencial de membrana se fijó por una corriente de mantenimiento constante a -80 mV antes de pasar los pulsos de despolarización. Al incrementar la amplitud del pulso fuimos capaces de obtener el primer potencial de acción simple y al incrementar
35 además la intensidad de corriente en la misma fibra, el número máximo de picos obtenibles (N picos) se midió (Pierno et al., Br J Pharmacol. 2006;149(7):909-19).

Las contracciones musculares injustificadas se obstaculizaron con sodio de dantroleno (2 mg/l). Los parámetros de excitabilidad celular (N picos) se midieron antes (control) y después de solo 9-AC 50

μM y la aplicación concomitante de safinamida en seis diferentes concentraciones (0.1 hasta 30 μM). En estas condiciones experimentales, metanosulfonato de safinamida se usó y disolvió como solución de reserva (10 mM) en agua destilada, luego se diluyó a las concentraciones finales en la solución de baño muscular. Un animal se usó para probar dos concentraciones de safinamida: una concentración en cada

Como se muestra en la FIG. 1, 9-AC indujo una afección como miotonía al incrementar N picos por 60%. La safinamida a 1, 5, 10, y 30 μM redujo significativamente N picos por $22 \pm 6\%$, $35 \pm 5\%$, $42 \pm 5\%$, y $60 \pm 6\%$, respectivamente ($P < 0.05$ vs solo 9-AC, prueba t de Bonferroni) restaurando así la excitabilidad del sarcolema. La IC_{50} (la concentración capaz de reducir al 50% el efecto de 9-AC) y calculada del ajuste de la curva de concentración-respuesta) fue $13.4 \pm 2.4 \mu\text{M}$ ($\pm\text{SE}$ del ajuste). El efecto antimiotónico fue reversible tras el lavado con safinamida (9-AC, 50 μM).

Es de destacar que la misma prueba, IC_{50} de mexiletina fue más de tres veces mayor, indicando una potencia menor.

EJEMPLO 2. Estudio de la actividad antimiotónica *in vivo* de safinamida en un modelo de rata de miotonía congénita

La miotonía se indujo en ratas por inyección intraperitoneal de 9-AC, que es un bloqueador conocido de canales de cloruro de ClC-1 de músculo esquelético (Conte Camerino et al., Muscle Nerve. 1989;12(11):898-904. Altamura et al., Br J Pharmacol. 2018; 175(10):1770-1780).

Las ratas Wistar macho (250-300 g) se usaron. Los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio y con la aprobación del Departamento de Salud Italiano n. 194/2018-PR. Los experimentadores se cegaron a los tratamientos.

En este modelo animal, 9-AC imita la miotonía congénita *in vivo*, una enfermedad humana debido a mutaciones con pérdida de función en canales ClC-1 que codifican el gen *CLCN1*. Después de la inyección de 9-AC, las ratas mostraron rigidez muscular evidente, especialmente en extremidades traseras, y dificultades para moverse. No obstante, los animales permanecieron completamente conscientes y alertas. Respirar fue normal. Al escuchar un ruido inesperado, los animales reaccionaron por un salto en el sitio pero tuvieron grandes dificultades para trasladarse debido a rigidez muscular. La miotonía se evaluó al medir el tiempo del reflejo de enderezamiento (TRR, el tiempo necesario para que la rata colocada en posición supina gire hacia atrás sobre sus cuatro patas). En ratas, antes de la inyecciones de 9-AC la TRR fue menor que 0.5 s. La TRR se prolongó dramáticamente hasta alrededor de 2 s, 10 min después de 9-AC, e incrementó además hasta alrededor de 4 s, 30 min después de 9-AC. Luego la TRR disminuyó gradualmente con el tiempo, estando cerca de 1 s, 3 h después de 9-AC. Un fármaco anti-miotónico se espera que contrarreste la prolongación de TRR inducida por 9-AC.

La TRR se evaluó alrededor de 10 minutos antes de 9-AC (Tiempo 0) y 10, 37, 67, 127, y 187 min después de 9-AC (30 mg/kg i.p.). La TRR medida en cada momento fue la media de 7 mediciones espaciadas por 1 min (para limitar el efecto de calentamiento). El metanosulfonato de safinamida (10 y 30 mg/kg como base libre) o vehículo se administraron por sonda oral a las ratas 17 min después de la inyección de 9-AC. 9-AC y metanosulfonato de safinamida se disolvieron en bicarbonato y solución NaCl

al 0.9%, respectivamente. Para permitir la comparación entre las ratas, la TRR medida en cada momento se normalizó como una función de TRR medida 10 min después de la inyección de 9AC en la misma rata. Luego los datos promedio se calcularon para cada dosificación como la media $\pm$ S.E.M. El análisis estadístico se realizó usando análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido por la prueba t de Bonferroni ad hoc. El valor $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Como se muestra en la FIG. 2, en aumentos significativos en ratas tratadas con vehículo de la TRR se observaron en 37, 67 y 127 min después de la inyección de 9-AC. En el efecto pico (37 y 67 min), el tratamiento concomitante con safinamida dependiente de la dosis y significativamente contrarrestado con la prolongación de TRR inducida por 9-AC y el efecto que duro hasta 120 min demuestran que safinamida in vivo fue provisto con actividad antimiotónica en un modelo de rata de miotonía congénita.

En este modelo *in vivo* la curva de dosis-respuesta de metanosulfonato de safinamida en dosis crecientes (0.3, 1, 3, 10 y 30 mg/kg como base libre) también se estudió. Para permitir la comparación entre las ratas, la TRR medida en cada momento se normalizó como una función de TRR medida 10 min después de la inyección con 9AC en la misma rata. Luego los datos promedio se calcularon para cada fármaco/dosificación como la media $\pm$ S.E.M. El análisis estadístico se realizará usando análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido por prueba t de Bonferroni ad hoc. El valor $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Los resultados se muestran en la FIG. 2, lo que muestra que en aumentos significativos en ratas tratadas con vehículo de la TRR se observaron en 37, 67 y 127 min después de la inyección de 9-AC. El tratamiento con safinamida dependiente de la dosis y significativamente contrarrestado con la prolongación de TRR inducida por 9-AC. De hecho, la safinamida oral fue capaz de contrarrestar la prolongación de corrección del reflejo de tiempo (TRR) inducida por ácido 9-antraceno carboxílico (9-AC) como signo de miotonía en la rata.

En particular, a los 37 min, la reducción de TRR fue significativa con 3, 10 y 30 mg/kg de safinamida. A los 67 min (efecto pico 9-AC), la inhibición de TRR fue significativa también con la dosis más baja de 1 mg/kg de safinamida. A los 127 min, únicamente 10 y 30 mg/kg produjo inhibición significativa. El análisis de la curva de dosis-respuesta a los 67 min reveló un ED₅₀ (dosis efectiva en inhibir al 50% prolongación TRR) de 1.2 mg/kg y efecto máximo de 66% obtenido con la dosis de 10-30 mg/kg demostrando que safinamida *in vivo* fue provista con actividad antimiotónica significativa en un modelo de rata de miotonía congénita.

Es de destacar que la misma prueba, el fármaco de referencia para miotonías, mexiletina, fue alrededor de 6 veces menos potente.

EJEMPLO 3. Efecto *in vitro* de safinamida en mutaciones de miotonía Nav1.4 humana seleccionadas en líneas celulares transfectadas.

Más de cuarenta mutaciones diferentes de hNav1.4 se han ligado a diversos trastornos del músculo esquelético hereditarios autosómicos dominantes humanos fenotípicamente diferentes (Cummins & Bendahhou, 2009; Jurkat-Rott *et al.* 2010).

El canal Nav1.4 se expresa principalmente en músculo esquelético y está compuesto de una

subunidad α de 260 kDa que está asociada con una subunidad β más pequeña en el músculo. La subunidad α consiste de cuatro dominios homólogos (I–IV), y cada dominio tiene seis segmentos transmembrana (S1–S6) (Noda et al., 1984). Las mutaciones del canal Nav1.4 que conducen a parálisis periódica o miotonía no distrófica se han encontrado a lo largo de cada dominio y segmento de este canal y puede ser la base de la hiperexcitabilidad muscular o inexcitabilidad al cambiar la cinética o función del canal, produciendo así cambios en las propiedades biofísicas micro o macroscópicas del canal. Diversas mutaciones del canal Nav1.4 asociadas con miotonía se han descrito para alterar la función del canal al reducir la inactivación rápida, incrementando la velocidad de recuperación de inactivación rápida, desacelerando la desactivación o cambiando la dependencia del voltaje de activación a potenciales más negativos (Cummins & Bendahhou, 2009).

El efecto de safinamida se evaluó en algunas mutaciones puntuales hNav1.4 ubicadas en el sitio de inactivación.

p.P1158L: esta mutación se encontró en una joven Argelina, y se asocia a miotonía permanente grave (Desaphy et al., 2016).

p.V1293I: la mutación V1293I se asocia a diversos fenotipos, de miotonía de canal de sodio a paramiotonía congénita + parálisis periódica hipercalémica (Koch et al., 1995).

p.F1298C: esta mutación se encontró en una mujer de 35 años de edad, que se presenta a la edad de 32 con rigidez en músculos faciales, superiores e inferiores, principalmente después de la contracción (Farinato et al., 2019). Los síntomas empeoran con el resfriado y la miotonía se reportó como dolorosa. El paciente notó una leve mejoría de miotonía con ejercicio.

p.I1310N: esta mutación se ha encontrado en 5 consanguíneos de un pariente Francés, y se asocia a miotonía de canal de sodio (Farinato et al., 2019).

El subtipo de músculo esquelético humano de canales de sodio activados por voltaje (hNav1.4), ya sea mutantes de tipo natural o miotónicos, se transfectaron transitoriamente en células HEK293T con el método de coprecipitación de fosfato de calcio. Las corrientes de sodio de células enteras (INa) se registraron a temperatura ambiente (20–22°C) usando hardware de fijación de voltaje (patch-clamp) convencional Axon (Molecular Devices, EUA). Los protocolos de fijación de voltaje y adquisición de datos se realizaron con software pCLAMP (Axon Instruments). La solución del baño contenía (mM) NaCl 150, KCl 4, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, Na-HEPES 5, y glucosa 5 (pH 7.4). La solución de la pipeta contenía (en mM) CsF 120, CsCl 10, NaCl 10, EGTA 5, y Cs-HEPES 5 (pH 7.2). Las pipetas de parche fabricadas con vidrio Corning 7052 (King glass, EUA) tenían una resistencia que varía desde 1 hasta 3 M Ω . Las corrientes de capacitancia se compensaron parcialmente usando el circuito amplificador. Únicamente aquellos datos obtenidos de células que exhiben errores de resistencia en serie <5 mV se consideraron para análisis. Después de romper la membrana del parche, un pulso de prueba de 25 ms de duración hasta -20 mV de un potencial de retención (hp) de -120 mV se aplicó a la célula en una frecuencia baja hasta que la estabilización de la amplitud y la cinética de INa se alcanzó (típicamente 5 minutos). La safinamida se solubilizó en la concentración final en la solución de baño complementada con DMSO al 0.2%. La célula parcheada se expuso a una corriente continua de control o solución de baño complementada con fármaco.

Un máximo de dos concentraciones de fármaco se probaron en cada célula, para maximizar el posible sesgo debido a desaceleración de corriente de sodio. Debido al conocido cambio espontáneo de la dependencia del voltaje durante los experimentos de células completas, se tuvo mucho cuidado en realizar los diversos protocolos respetando una secuencia constante para permitir la comparación entre las células.

La inhibición de los canales hNav1.4 por safinamida se evaluó al medir la reducción de I_{Na} obtenido de un potencial de retención (HP) de -120 hasta -30 mV en estimulaciones de frecuencia de 0.1 y 10 Hz. Las curvas de concentración-respuesta de safinamida se produjeron al obtener la amplitud de corriente máxima medida en la presencia de fármaco (I_{DRUG}), normalizada a la amplitud de corriente máxima medida en la misma célula antes de la aplicación de fármaco (I_{CTRL}), como una función de concentración de fármaco $[(DRUG)]$. Las curvas de concentración-respuesta se equiparon con una función de enlace de primer orden:

$$I_{DRUG}/I_{CTRL} = 1 / \{1 + ([DRUG]/IC_{50})^{nH}\}$$

donde IC_{50} es la concentración inhibidora mitad del máximo y nH es el factor de pendiente. Los valores IC_{50} se determinaron al potencial de membrana en reposo (bloqueo tónico: -120 mV a 0.1 Hz) y después de pulsos despolarizantes repetitivos hasta -20 mV en 10 Hz (uso y bloque dependiente de la frecuencia). Un compuesto capaz de bloquear canales de sodio de una manera dependiente del uso y de la frecuencia se espera que disminuya la descarga anormal pero sin afectar la actividad normal de las fibras musculares.

La Tabla 1 muestra los efectos *in vitro* de safinamida en mutantes de miotonía de canal de sodio $Na_v1.4$ humanos en líneas celulares transfectadas. Los resultados se expresaron como valores $IC_{50} \pm$ Error Estándar del ajuste (SE).

Tabla 1. Efecto de safinamida en mutantes de miotonía de canal de sodio $Na_v1.4$ humanos en una línea celular transfectada.

mutación del canal hNa_v1.4	$IC_{50} \pm SE$ (μM) Bloqueo tónico a 0.1 Hz	$IC_{50} \pm SE$ (μM) Uso y frecuencia -bloqueo dependiente en a 10Hz
hNa_v1.4 Tipo Natural	160 $\pm$ 18	33 $\pm$ 4
P1158L	148 $\pm$ 13	34 $\pm$ 3
V1293I	171 $\pm$ 19	47 $\pm$ 5
F1298C	173 $\pm$ 12	83 $\pm$ 2
I1310N	170 $\pm$ 26	46 $\pm$ 7

Los resultados mostrados en la Tabla 1 demuestran que las mutaciones seleccionadas no tenían efecto significativo en la potencia de safinamida (IC_{50}) en ambas frecuencias (0.1 y 10 Hz), como los valores IC_{50} fueron del mismo orden de magnitud que el tipo natural. Los portadores de las mutaciones en el canal hNav1.4 pueden obtener más beneficios con la safinamida que con los fármacos actualmente usados.

Estos resultados allanan el camino para la terapia impulsada por mutaciones de trastornos miotónicos.