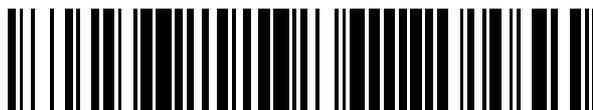


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 617**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/197** (2006.01)

**A61K 31/4178** (2006.01)

**A61K 31/4164** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 25/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2009 E 09765871 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2307000**

54 Título: **Combinación de pilocarpina y tiamazol para tratar la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y los trastornos relacionados**

30 Prioridad:

**18.06.2008 EP 08305280**

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

**14.05.2014**

73 Titular/es:

**PHARNEXT (100.0%)  
11 Rue des Peupliers  
92130 Issy les Moulineaux, FR**

72 Inventor/es:

**COHEN, DANIEL;  
CHUMAKOV, ILYA;  
NABIROCHKIN, SERGUEI;  
GUERASSIMENKO, OXANA y  
CHOLET, NATHALIE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 460 617 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Combinación de pilocarpina y tiamazol para tratar la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y los trastornos relacionados

### Antecedentes de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para el tratamiento de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y los trastornos relacionados.

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth («CMT») es una polineuropatía periférica desatendida de origen genético. Afecta a aproximadamente 1 de cada 2500 individuos, y esta enfermedad es el trastorno hereditario más frecuente del sistema nervioso periférico. Su comienzo típicamente se produce durante los primeros diez o veinte años de vida, aunque se puede detectar durante la lactancia. El transcurso de la enfermedad es crónico con una degeneración neuromuscular gradual. La enfermedad es invalidante y se dan casos de dolor neurológico acompañante y de discapacidad muscular extrema. La CMT es una de las enfermedades genéticas mejor estudiadas de la que se dan aproximadamente 30.000 casos en Francia. Aunque la mayoría de pacientes con CMT albergan una duplicación de un fragmento del cromosoma 17 que contiene un gen de mielina, PMP22 (forma CMT1A), se han visto implicados dos docenas de genes en las diferentes formas de la CMT. Por consiguiente, aunque tiene un origen monogénico, esta enfermedad manifiesta una heterogeneidad clínica debido a la posible existencia de genes moduladores. Los genes mutados en los pacientes con CMT se agrupan en torno a rutas moleculares estrechamente conectadas que afectan a la diferenciación de las células de Schwann o de las neuronas, o cambian la interacción de estas células en los nervios periféricos.

20 La PMP22 es un componente principal de mielina que se expresa en la porción compacta de prácticamente todas las fibras mielinizadas del sistema nervioso periférico y la producen principalmente las células de Schwann. Además, el gen PMP22 se supone que está implicado en el desarrollo de la neoplasia en los pacientes con neurofibromatosis, un trastorno autosómico dominante que se caracteriza por presentar manchas de color café con leche y tumores fibromatosos en la piel. También se observa que una proteína PMP22 normal se sobreexpresa modestamente 1,5 veces en las células de Schwann heterocigotas para la duplicación en los pacientes con CMT (en algunos casos raros, el fenotipo de tipo CMT1A también puede estar relacionado con mutaciones estructurales de la proteína PMP22) (Lupski et al., 1992; Suter et al., 1992; Roa et al., 1993; Thomas et al., 1997; Suter y Scherer, 2003; Nave y Sereda, 2007). Las pruebas directas de que la dosificación anormal del gen PMP22 provoca un fenotipo de tipo CMT1A proceden de los experimentos con transgénicos en los modelos de roedores con sobreexpresión de la proteína PMP22 (Niemann et al., 1999; Perea et al., 2001; Robaglia-Schlupp et al., 2002; Meyer et al., 2006; Sereda y Nave, 2006). Además, las intervenciones terapéuticas con el inhibidor del receptor de la progesterona y el ácido ascórbico disminuyeron esta expresión en los animales transgénicos, lo que mejora o enlentece la progresión del fenotipo de la enfermedad (Sereda et al., 2003; Passage et al., 2004; Meyer zu Horste et al., 2007). Bassi et al., 1978, se refieren al uso del tiamazol en el tratamiento de la tirotoxicosis asociada a neuropatía y encefalomiелitis. La patente internacional WO 00/20024 de Celtrix se refiere al uso del tiamazol para aliviar los síntomas de un trastorno dependiente del IGF que es un trastorno tiroideo; y el uso de agonistas del IGF o del eje tiroideo para tratar trastornos no tiroideos que responden al IGF (tal como la CMT). La patente internacional WO 2004/019938 se refiere al uso de la pilocarpina en el tratamiento de síndromes de dolor neuropático, tal como el glaucoma y otros trastornos relacionados con la elevación de la tensión intraocular. La patente europea EP2065038 se refiere a composiciones y procedimientos para el tratamiento de la enfermedad de CMT mediante la disminución de la expresión de la PMP22 en un sujeto.

El uso de la pilocarpina en monoterapia para el tratamiento de las anomalías papilares espasmódicas fue sugerido por Keltner et al. en 1975. Sin embargo, no se ha descrito el uso de la pilocarpina para el tratamiento de la enfermedad de CMT. Además, tampoco se ha sugerido el uso de la pilocarpina en politerapia con ningún otro compuesto.

En conclusión, existe la necesidad de un tratamiento eficaz y autorizado para tratar la enfermedad de CMT.

### Compendio de la invención

El propósito de la presente invención es dar a conocer nuevas estrategias terapéuticas para tratar la CMT y los trastornos relacionados. Más específicamente, los inventores han identificado nuevas politerapias que afectan con eficacia las rutas que conducen a la CTM y a los trastornos relacionados, y representan nuevas estrategias para el tratamiento de estos trastornos. Por lo tanto, la invención da a conocer nuevos productos y composiciones politerápicas, así como los usos de los mismos para tratar la enfermedad de CMT y los trastornos relacionados.

El objeto de esta invención se refiere a una composición tal y como se define en las reivindicaciones. Más específicamente, la invención se refiere a una composición que comprende un agonista del receptor muscarínico seleccionado del grupo que consiste en pilocarpina, cevimelina, carbacol, metacolina y betanecol, o una sal de los

mismos y un inhibidor de la síntesis de las hormonas tiroideas seleccionado del grupo que consiste en tiamazol, carbimazol, propiltiouracilo y amiodarona, o una sal de los mismos, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 Esta invención también describe el uso de una combinación de compuestos para (la fabricación de un medicamento para) el tratamiento de la CMT o de un trastorno relacionado, en donde dicha combinación de compuestos se selecciona de un agonista del receptor muscarínico o de un profármaco del mismo, y un inhibidor de la síntesis de las hormonas tiroideas o un profármaco del mismo. Esta invención también describe un producto de combinación que comprende un agonista del receptor muscarínico y un inhibidor de la síntesis de las hormonas tiroideas, o un profármaco del mismo, para la administración agrupada o por separado a un sujeto, de forma simultánea o  
10 secuencial.

En una realización más preferida, el agonista del receptor muscarínico es la (3*S*,4*R*)-3-etil-4-[(3-metilimidazol-4-il)metil]oxolan-2-ona (CAS 92-13-7, que es un agente activo del fármaco pilocarpina) o un profármaco del mismo.

Además, en una realización más preferida, el inhibidor de la síntesis de las hormonas tiroideas es 1-metil-3*H*-imidazol-2-tiona (CAS 60-56-0, que es un agente activo del fármaco tiamazol) o un profármaco del mismo, tal como  
15 el carbimazol.

La invención también describe una composición que comprende un agonista del receptor muscarínico y un inhibidor de la síntesis de las hormonas tiroideas para el tratamiento de la CMT de un sujeto, en donde el tratamiento comprende adicionalmente una etapa de determinación de si el paciente tiene la CMT1A.

En este sentido, un objeto particular de esta invención se refiere a una composición que comprende la pilocarpina, o un profármaco de la misma, y tiamazol, o un profármaco del mismo y, opcionalmente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se muestra en los ejemplos, tal combinación permite tratar con eficacia la CMT en los modelos de animales reconocidos.  
20

Las composiciones de esta invención pueden comprender además al menos un compuesto activo adicional, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en rapamicina, baclofeno, sorbitol, mifepristona, naltrexona, flurbiprofeno y ketoprofeno.  
25

En una realización preferida, la composición de acuerdo con esta invención comprende al menos:

- pilocarpina, tiamazol y mifepristona;
- pilocarpina, tiamazol y baclofeno; o
- pilocarpina, tiamazol y sorbitol.

30 En otra realización preferida, la composición de acuerdo con la invención comprende al menos:

- pilocarpina, tiamazol, mifepristona, baclofeno y sorbitol; o
- pilocarpina, tiamazol, mifepristona, baclofeno, sorbitol y naltrexona.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a una composición que comprende tiamazol, pilocarpina y otros dos compuestos activos, preferiblemente mifepristona y sorbitol.

35 En otras realizaciones, la presente invención se refiere a una composición que comprende tiamazol, pilocarpina y otros tres compuestos activos, preferiblemente:

- mifepristona, baclofeno y sorbitol; o
- mifepristona, sorbitol y rapamicina; o
- mifepristona, sorbitol y ketoprofeno; o

40 - mifepristona, sorbitol y flurbiprofeno.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a una composición que comprende tiamazol, pilocarpina y otros cuatro compuestos activos, preferiblemente:

- mifepristona, sorbitol, baclofeno y naltrexona;
- mifepristona, sorbitol, baclofeno y rapamicina;

- mifepristona, sorbitol, naltrexona y rapamicina.

En otras realizaciones, la invención se refiere a una composición, que comprende cualquier combinación de fármacos según se describe en la tabla 1.

En otras realizaciones específicas, la presente invención se refiere a una composición que comprende:

- 5       – tiamazol y cevimelina.

En otra realización, la invención también se refiere a una composición que comprende pilocarpina y propiltiouracilo.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de una combinación de pilocarpina con tiamazol o estos dos compuestos solos, o en combinación o combinaciones con otros compuestos que refuerzan su efecto para (la fabricación de un medicamento para) el tratamiento de la CMT o de un trastorno relacionado.

- 10      Otro objeto de la invención se refiere al uso de una combinación de pilocarpina con tiamazol o estos dos compuestos solos, o en combinación o combinaciones con otros compuestos que refuerzan su efecto para (la fabricación de un medicamento para) el tratamiento de la neuropatía tóxica.

- 15      Otro objeto de la invención se refiere al uso de una combinación de pilocarpina con tiamazol o estos dos compuestos solos, o en combinación o combinaciones con otros compuestos que refuerzan su efecto para (la fabricación de un medicamento para) el tratamiento de la ELA (esclerosis lateral amiotrófica).

Preferiblemente, los compuestos que refuerzan el efecto de la combinación de pilocarpina y tiamazol, para el tratamiento de la CMT, se seleccionan del grupo que consiste en mifepristona, baclofeno, sorbitol, naltrexona, rapamicina, flurbiprofeno y ketoprofeno.

- 20      En una variante se utiliza una mezcla de pilocarpina y tiamazol para el tratamiento de la CMT o de un trastorno relacionado, en combinación con otro compuesto activo más, preferiblemente mifepristona o baclofeno.

En otra variante se utiliza una mezcla de pilocarpina y tiamazol en combinación con dos compuestos activos más, preferiblemente mifepristona y sorbitol.

- 25      En otra variante se utiliza una mezcla de pilocarpina y tiamazol en combinación con tres compuestos activos más, que consisten preferiblemente en mifepristona y sorbitol en combinación con un tercer compuesto seleccionado entre baclofeno, rapamicina, ketoprofeno o flurbiprofeno.

En otra variante se utiliza una mezcla de pilocarpina y tiamazol en combinación con cuatro compuestos activos más, preferiblemente mifepristona, sorbitol, baclofeno y naltrexona o rapamicina; o mifepristona, sorbitol, naltrexona y rapamicina.

- 30      La invención también describe un procedimiento para tratar la CMT o un trastorno relacionado, en particular CMT, que comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de una combinación de un agonista del receptor muscarínico, o un profármaco del mismo, y un inhibidor de la síntesis de las hormonas tiroideas, o un profármaco del mismo.

- 35      La invención también describe adicionalmente un procedimiento para tratar la CMT en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una combinación de pilocarpina, o un profármaco del mismo, y tiamazol, o un profármaco del mismo.

La invención también describe un procedimiento para tratar la CMT en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una combinación de pilocarpina y tiamazol con al menos un compuesto activo más, preferiblemente seleccionado del grupo de rapamicina, baclofeno, sorbitol, mifepristona, naltrexona, flurbiprofeno y ketoprofeno.

- 40      En variantes, la presente invención también describe un procedimiento para tratar la CMT de un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una combinación de:

- pilocarpina, tiamazol y al menos otro compuesto activo más que se selecciona entre baclofeno, mifepristona, sorbitol y naltrexona;
- pilocarpina, tiamazol y baclofeno;
- 45      – pilocarpina, tiamazol y mifepristona;
- pilocarpina, tiamazol, mifepristona, sorbitol y baclofeno;

- pilocarpina, tiamazol, mifepristona, sorbitol y rapamicina;
  - pilocarpina, tiamazol, mifepristona, sorbitol y ketoprofeno;
  - pilocarpina, tiamazol, mifepristona, sorbitol y flurbiprofeno;
  - pilocarpina, tiamazol, mifepristona, sorbitol, baclofeno y naltrexona;
- 5
- pilocarpina, tiamazol, mifepristona, sorbitol, baclofeno y rapamicina;
  - pilocarpina, tiamazol, mifepristona, sorbitol, naltrexona y rapamicina;
  - tiamazol y baclofeno;
  - tiamazol y cevimelina; o
  - pilocarpina y propiltiouracilo.
- 10 La invención se puede utilizar para tratar la CMT o un trastorno relacionado de cualquier sujeto mamífero, en particular de los sujetos humanos. Es particularmente idónea para el tratamiento de la CMT1a.
- La invención también describe un procedimiento para tratar la CMT1a de un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una combinación de pilocarpina, o de un profármaco del mismo, y tiamazol, o un profármaco.
- 15 La invención también describe un procedimiento para tratar la CMT1a, en donde el procedimiento comprende (1) valorar si un sujeto tiene CMT1a y (2) tratar al sujeto que tiene la CMT1a con una cantidad eficaz de una combinación de pilocarpina, o un profármaco del mismo, y tiamazol, o un profármaco del mismo. La determinación de si un sujeto tiene la CMT1a se puede realizar mediante varias pruebas conocidas en la técnica, tales como análisis de ADN.
- 20 **Leyenda de las figuras**
- Figura 1: los niveles relativos se representan como el % de la expresión del ARNm de PMP22 en las células de Schwann primarias de rata tratadas durante 24 h con los compuestos A y B. A la izquierda se representa el % del nivel del ARNm de PMP22 24 h después de añadir el compuesto A (tiamazol) a 1 mM o 1  $\mu$ M. Se observa que el ARNm de PMP22 disminuye significativamente en las células de Schwann primarias, y que la dosis más baja del compuesto A induce la disminución de PMP22 más importante. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; significativamente diferente del control (prueba de la  $t$  de Student para datos emparejados).
- 25
- A la derecha, expuesto 24 h al compuesto B (pilocarpina), el nivel de expresión del ARNm de PMP22 disminuye significativamente en las células de Schwann primarias incluso con dosis muy bajas (10 nM y 50 nM). De igual forma, observamos que el compuesto B (1  $\mu$ M) hace disminuir significativamente el nivel de expresión de la proteína PMP22 después de 24 h de incubación, un
- 30 38% en las células de Schwann primarias. Este efecto es aún significativo después de 48 horas de incubación ( $-18\%$ ,  $p < 0,001$ ).
- Figura 2: efecto de los fármacos seleccionados sobre el nivel de expresión del ARNm de PMP22 cuantificado por RT-Q-PCR en la células de schwannoma RT4-D6P27. \*\*\*:  $p < 0,0001$ : significativamente diferente del control (= sin fármaco). Prueba de la  $t$  de Student bilateral con los valores de  $\Delta\Delta Ct$ .
- 35
- Figura 3: resultados de la valoración motora de las ratas hembra en la prueba de la barra durante todo el estudio del tratamiento presentado en forma de tendencias. WT placebo: ratas normales tratadas con placebo; TG placebo: ratas transgénicas de control tratadas con placebo, TG ptx25: ratas transgénicas tratadas con una sustancia de control negativa, TG A: ratas transgénicas obligadas a alimentarse con una dosis diaria de 0,2 mg/kg de tiamazol; TG B: ratas transgénicas tratadas con una dosis diaria de 0,35 mg/kg de pilocarpina.
- 40
- Figura 4: valoración electrofisiológica de la amplitud del potencial de los nervios sensores en las ratas con CMT tratadas con fármacos durante 20 semanas. TG placebo: ratas transgénicas de control tratadas con placebo; TG ptx25: ratas transgénicas tratadas con una sustancia de control negativo; TG A: ratas transgénicas tratadas con una dosis diaria de 0,2 mg/kg de tiamazol; TG B: ratas transgénicas tratadas con una dosis diaria de 0,35 mg/kg de pilocarpina.
- 45
- Figura 5: el análisis de las muestras *post-mortem* obtenidas de animales tratados con los fármacos según se describe en la leyenda de la figura 3. Se anestesiaron profundamente las ratas tratadas con fármacos y placebo durante 20 semanas, se tomaron cuidadosamente muestras de los nervios ciáticos enteros y de los músculos sóleos y se pesaron. Los gráficos representan la media de 30 valores de estas mediciones.

Figura 6: efecto positivo de la mezcla 1 en la prueba de evaluación de la marcha (ratas hembra); la línea negra representa las ratas de control tratadas con placebo; la línea negra gruesa representa las ratas transgénicas tratadas con placebo; la línea discontinua presenta las ratas transgénicas tratadas con la mezcla 1. \*  $p < 0,05$ ; negra \*: WT placebo frente a TG placebo; gris \*: TG placebo frente a TG mezcla 1. Las estadísticas se realizan con la prueba bilateral de Student; la media se representa  $\pm$  E.E.M.

Figura 7: efecto positivo de la mezcla 2 sobre el umbral de excitabilidad del nervio caudal (las barras blancas representan las ratas macho de control tratadas con placebo; las barras negras representan las ratas macho transgénicas tratadas con placebo; las barras grises representan las ratas macho transgénicas tratadas con la mezcla 2. La estadística se realiza con la prueba bilateral de Student; la media se representa  $\pm$  E.E.M.

Figura 8: efecto positivo de la mezcla 2 tras 4 semanas de tratamiento en la prueba de la barra (las barras blancas representan las ratas macho de control tratadas con placebo; las barras negras representan las ratas macho transgénicas tratadas con placebo; las barras grises representan las ratas macho transgénicas tratadas con la mezcla 2). La estadística se realiza con la prueba bilateral de Student; la media se representa  $\pm$  E.E.M.

Figura 9: efecto positivo de la mezcla 2 sobre la marcha al cabo de 3 semanas de tratamiento (las barras blancas representan el porcentaje de ratas macho en cada grupo que camina con una marcha fluida; las barras grises representan la marcha sin fluidez; las barras negras representan la incapacidad para la marcha). La estadística se realiza con la prueba bilateral de Student.

Figura 10: efecto antialodínico en el modelo de OXALPN crónico. En azul se muestra el tiempo de reacción en la prueba de la acetona para los animales de control, en rojo los animales tratados con oxaliplatino, en verde los animales tratados con oxaliplatino y la mezcla 2.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención da a conocer nuevas estrategias terapéuticas para tratar la CMT o los trastornos relacionados. La invención describe nuevas composiciones hechas de combinaciones de fármacos conocidos y su nuevo uso para la corrección eficaz de tales enfermedades y se pueden utilizar en cualquier sujeto mamífero.

Dentro del contexto de la presente invención, la terminología «trastorno relacionado con la CMT» designa otras neuropatías periféricas hereditarias y adquiridas.

La principal forma de la CMT, la CMT1a, está ocasionada por la duplicación del gen de PMP22. La PMP22 es un componente importante de mielina que se expresa en la porción compacta de esencialmente todas las fibras mielinizadas del sistema nervioso periférico. La proteína PMP22 interacciona con P0, otra proteína estructural de la mielina y, por lo tanto, la alteración de la proporción de proteínas PMP22/P0 podría influir en la compactación de las vainas de mielina (Vallat et al., 1996; D'Urso et al., 1999). Tal y como se demuestra en los estudios *in vitro*, la proteína PMP22 también está implicada en la regulación de la diseminación celular de una manera dependiente de  $p$  y, por lo tanto, podría afectar al recubrimiento del axón (Brancolini et al., 1999). Además, la PMP22 forma complejos con las integrinas  $\alpha 6\beta 4$  y podría intervenir en la interacción de las células de Schwann con la matriz extracelular (Amici et al., 2006; Amici et al., 2007). Además, el incremento de la cantidad de la proteína PMP22 puede alterar la vía de reciclaje endosómico de la membrana plasmática regulada por Arf6 y conducir a la acumulación de PMP22 en los endosomas tardíos (Chies et al., 2003). También se demostró que la sobreexpresión de la proteína PMP22 altera la clasificación intracelular de las proteínas y sobrecarga la maquinaria de degradación de proteínas de las células de Schwann (Notterpek et al., 1997; Tobler et al., 2002; Fortun et al., 2003; Fortun et al., 2006; Fortun et al., 2007; Khajavi et al., 2007). Finalmente, la PMP22 está implicada directamente en el control de la proliferación celular y de la muerte celular programada (Sancho et al., 2001; Atanasoski et al., 2002) y se demostró que la proteína PMP22 mutante provoca una reorganización profunda y la expresión aberrante de los canales iónicos de los axones (Ulzheimer et al., 2004; Devaux & Scherer, 2005).

Por consiguiente, la terminología «trastorno relacionado con la CMT» comprende trastornos periféricos tales como la ELA, neuropatías tóxicas, neuropatías idiopáticas, neuropatía diabética, cáncer y neuropatías inducidas por el VIH, síndrome de Guillain-Barré.

En una realización preferida, el trastorno relacionado con la CMT designa una neuropatía, tal como las neuropatías desmielinizantes, entre ellas NHPP (neuropatía hereditaria con posibilidad a parálisis por presión), CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1X, CMT2A, CMT2B, CMT2D, CMT2E, CMT2-P0, neuropatías desmielinizantes graves DSS (síndrome de Dejerine-Sottas), NHC (neuropatía hipomielinizante congénita), CMT4A, CMT4B1, CMT4B2, CMT4D, CMT4F, CMT4, AR-CMT2A, HSN1.

La invención es particularmente idónea para el tratamiento de la CMT1A.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «tratamiento» de un trastorno incluye el tratamiento, la prevención, la profilaxis, el retraso o la reducción del dolor provocado por el trastorno. La terminología «tratamiento» incluye en

particular el control de la progresión de la enfermedad y de los síntomas asociados.

De igual forma, la terminología compuesto designa los compuestos químicos tal y como se denominan específicamente en la solicitud, así como cualquier sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, éster, éter, isómeros, racematos, conjugados, profármacos del mismo.

- 5 De igual forma, la terminología «combinación» o «politerapia» designa un tratamiento en donde se coadministran al menos dos fármacos a un sujeto para ocasionar un efecto biológico. En una politerapia, los al menos dos fármacos se pueden administrar juntos o por separado, al mismo tiempo o secuencialmente. De igual forma, los al menos dos fármacos se pueden administrar por diferentes vías y con diferentes protocolos.

- 10 La invención muestra que la CMT o un trastorno relacionado con la CMT se puede tratar mediante una combinación determinada de fármacos. Más específicamente, la invención muestra que los compuestos tiamazol y pilocarpina, en combinación o combinaciones, se puede utilizar para tratar la CMT o los trastornos relacionados. En este sentido, los resultados experimentales muestran que una combinación de tiamazol y pilocarpina disminuye significativamente el nivel de la expresión del ARN del gen PMP22 en las células de Schwann de rata. Además, las ratas transgénicas para PMP22 que sirven de modelo de la enfermedad de CMT humana se han tratado a diario con combinaciones  
15 que contienen tiamazol y pilocarpina. Se observa la mejora significativa de los criterios de valoración conductuales.

Pilocarpina: (3*S*,4*R*)-3-etil-4-[(3-metilimidazol-4-il)metil]oxolan-2-ona

Esté fármaco, C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se ha propuesto para el tratamiento de 1) los síntomas de xerostomía debida al hipofuncionamiento de las glándulas salivales ocasionada por radioterapia antineoplásica de la cabeza y del cuello; y 2) el tratamiento de los síntomas de xerostomía en los pacientes con el síndrome de Sjogren.

- 20 Al ser agonista de los receptores muscarínicos, ocasiona la contracción de las fibras del músculo liso (tubo digestivo, ojo, bronquios), estimula la secreción de sudor, salival, bronquial y gástrica. Además, muestra una acción cardiovascular compleja, que estimula ambas vías excitoganglionares parasimpaticomiméticas (vasodilatación).

- 25 Los inventores han demostrado que la pilocarpina, un agonista de los receptores muscarínicos, disminuye la expresión *in vitro* de la proteína PMP22 en las células de Schwann. Proponemos que la estimulación de los receptores muscarínicos por la pilocarpina conduce —probablemente, a través de un conjunto complejo de mecanismos moleculares— al cambio del equilibrio intracelular de las actividades Erk/Akt, que regulan la expresión de las proteínas marcadoras asociadas a la mielina de una manera opuesta a una señalización de Erk más pronunciada (Ogata et al., 2004).

- 30 Sin desear comprometerse con ninguna teoría, se postula que la estimulación de los receptores muscarínicos puede modificar la actividad de las cinasas Akt y Erk mediante varios mecanismos concomitantes (Ma et al., 2004; Anger et al., 2007). Por ejemplo, los receptores muscarínicos pueden bloquear selectivamente la señalización por IGF-1, pero no los receptores de PDGF, lo que favorece la desfosforilación inhibitoria de la tirosina o la fosforilación inhibitoria de la serina de IRS-1 por PKC. A continuación, los receptores muscarínicos podrían intervenir en la transactivación intracelular de la señalización de ERK a través de Fyn, una cinasa de tipo Src; de igual forma, mediante la  
35 disminución de la actividad de la adenilato ciclasa, los receptores muscarínicos podrían estar implicados en la regulación funcional de la Akt/Gsk-3 $\beta$  y también las cinasas Erk a través del mecanismo mediado por PKA. Finalmente, se demostró que la estimulación de los receptores muscarínicos puede, a través de la activación de AMPK, ocasionar transitoriamente la desfosforilación de Akt y así disminuir la reserva intracelular de  $\beta$ -cateninas (Batty et al., 2004; King et al., 2006).

- 40 Como resultado, también se podrían utilizar otros agonistas de los receptores muscarínicos, tales como: cevimelina (número CAS 107233-08-9), carbacol (número CAS 51-83-2), metacolina (números CAS 55-92-5) y betanecol (número CAS 674-38-4).

Tiamazol: 1-metil-3*H*-imidazol-2-tiona

- 45 El tiamazol inhibe la producción de nuevas hormonas tiroideas al bloquear la actividad de la peroxidasa tiroidea, lo que convierte el yoduro a yodo y cataliza que la molécula de yoduro resultante se incorpore en el anillo fenólico de las tirosinas. Así pues, el tiamazol puede disminuir de manera eficaz la actividad transcripcional de los receptores de las hormonas tiroideas. Así pues, el tiamazol se ha descrito que suprime la producción de las prostaglandinas al atenuar la actividad de la prostaglandina H sintasa (Zelman et al., 1984). Las prostaglandinas —a través de sus receptores GPCR análogos— podrían hacer aumentar más la actividad de la vía de señalización de Akt, lo que  
50 promueve la expresión de las proteínas relacionadas con la mielina (Ogata et al., 2004; Castellone et al., 2006). Por consiguiente, los compuestos que inhiben la síntesis de las hormonas tiroideas y que afectan a la producción o señalización de las prostaglandinas son particularmente ventajosos para ser usados en la presente invención.

Otros compuestos relacionados con el tiamazol por el modo de acción son el carbimazol (profármaco de tiamazol; número CAS 22232-54-8) y el propiltiouracilo (número CAS 51-52-5), y la amiodarona (número CAS 1951-25-3).

Tal y como se describe en los ejemplos, los compuestos tiamazol y pilocarpina ejercen una acción combinada que conduce a que mejoren su efecto terapéutico contra la CMT, lo que permite reducir las dosis terapéuticas eficaces, lo que a su vez disminuye los efectos secundarios.

5 Una realización particular de la invención reside en una politerapia para tratar la CMT o un trastorno relacionado, en particular la CMT1A, en donde dicha politerapia comprende los compuestos tiamazol y pilocarpina y al menos un tercer compuesto capaz de realzar la actividad de esta combinación.

Otra realización particular de la invención reside en una politerapia para tratar la ELA, en donde dicha politerapia comprende los compuestos tiamazol y pilocarpina y al menos un tercer compuesto capaz de realzar la actividad de esta combinación.

10 Otra realización particular de la invención reside en una politerapia para tratar la neuropatía tóxica, en donde dicha politerapia comprende los compuestos tiamazol y pilocarpina, y al menos un tercer compuesto capaz de realzar la actividad de esta combinación.

Una realización particular de la invención reside en un tratamiento para tratar la CMT o un trastorno relacionado, en donde los compuestos tiamazol y pilocarpina se utilizan en monoterapia.

15 Otra realización particular de la invención reside en un tratamiento para tratar la CMT o un trastorno relacionado, en donde el tiamazol y/o la pilocarpina se utilizan en combinación con al menos un compuesto activo adicional. En una realización preferida, el al menos un compuesto adicional se selecciona del grupo de compuestos recogidos en la tabla 1.

20 Otra realización particular de la invención reside en una composición, que comprende cualquier combinación de fármacos que se describe en la tabla 1.

Otra realización particular de la invención reside en una politerapia para tratar la CMT o un trastorno relacionado, que comprende cualquier combinación de fármacos que se describe en la tabla 1.

Otra realización particular de la invención reside en una politerapia para tratar la ELA, que comprende cualquier combinación de fármacos que se describe en la tabla 1.

25 Otra realización particular de la invención reside en una politerapia para tratar la neuropatía tóxica, que comprende cualquier combinación de fármacos que se describe en la tabla 1.

30 El tratamiento de acuerdo con la invención se realiza como una combinación de fármacos, opcionalmente junto a cualquier otro tratamiento. Se puede administrar en casa, en la consulta del médico, en una clínica, en un departamento de consultas ambulatorias del hospital, o en un hospital, de tal modo que el médico puede observar de cerca los efectos del tratamiento y realizar los ajustes que estime necesarios.

La duración del tratamiento depende de la etapa de la enfermedad, de la edad y afección del paciente, y de cómo responde el paciente al tratamiento.

35 Adicionalmente, una persona que corra un mayor riesgo de sufrir un trastorno neuropático adicional (p. ej., una persona que está genéticamente predispuesta, o que tiene, por ejemplo, diabetes, o que está en tratamiento contra una afección oncológica, etc.) puede recibir el tratamiento profiláctico para aliviar o retrasar la probable respuesta neuropática.

40 Se pueden controlar de forma independiente la dosis, la frecuencia y el modo de administración de cada componente de la combinación. Por ejemplo, un fármaco se puede administrar por vía oral mientras que el segundo fármaco se puede administrar por vía intramuscular. La politerapia se puede dar en ciclos intermitentes que incluyen periodos de descanso, de modo que el cuerpo del paciente tenga la posibilidad de recuperarse de cualquier efecto secundario imprevisible. Los fármacos también se pueden formular juntos de tal modo que una administración introduzca los dos fármacos.

#### **Formulación de las composiciones farmacéuticas**

45 La administración de cada fármaco de la combinación puede ser mediante cualquier medio adecuado que da lugar a una concentración del fármaco que, combinada con el otro componente, es capaz de corregir el efecto del aumento de la expresión de PMP22 tras alcanzar los nervios periféricos.

50 Aunque es posible administrar los ingredientes activos de la combinación como la sustancia química pura, es preferible presentarlos como una composición farmacéutica, también denominada en este contexto formulación farmacéutica. Las composiciones posibles incluyen las adecuadas para la administración oral, rectal, tópica (entre ellas, transdérmica, vestibular y sublingual) o parenteral (entre ellas, subcutánea, intramuscular, intravenosa e

intradérmica).

Es más habitual que estas formulaciones farmacéuticas se receten al paciente en «envases del paciente» que contienen un número de dosis unitarias u otros medios para la administración de las dosis unitarias dosificadas para ser usadas durante un periodo de tratamiento distinto en un solo envase, con frecuencia un envase alveolado. Los envases del paciente tienen una ventaja sobre las recetas tradicionales, en las que un farmacéutico divide el suministro para un paciente a partir de una sustancia farmacéutica suministrada a granel, en que el paciente siempre tiene acceso al prospecto contenido en el envase del paciente, normalmente ausente en las recetas tradicionales. La inclusión de un prospecto se ha demostrado que mejora el cumplimiento del paciente con las instrucciones del médico. Así pues, la invención incluye además una formulación farmacéutica, tal y como se describe más arriba en la presente memoria, en combinación con un material de acondicionamiento idóneo para dichas formulaciones. En tal envase del paciente, el uso pretendido de una formulación para la politerapia se puede inferir mediante instrucciones, instalaciones, provisiones, adaptaciones y/otros medios para ayudar a utilizar la formulación lo más idóneamente para el tratamiento. Tales medidas hacen que el envase del paciente sea específicamente idóneo y esté adaptado para ser usado en el tratamiento con la combinación de la presente invención.

El fármaco puede estar contenido en cualquier cantidad adecuada en cualquier sustancia de vehículo adecuada, y puede estar presente en una cantidad del 1 al 99% en peso del peso total de la composición. La composición se puede dar a conocer en una forma farmacéutica que es adecuada para la vía de administración oral, parenteral (p. ej., intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, nasal, vaginal, por inhalación, cutánea (parche) u ocular. Así pues, la composición puede ser en forma de, p. ej., comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles que incluyen hidrogeles, emplastos, ungüentos, cremas, yesos, pociones, dispositivos de administración osmótica, supositorios, enemas, inyectables, implantes, pulverizadores o aerosoles.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (véase, p. ej., *Remington: The Science and Practice of pharmacy* (20<sup>th</sup> ed.). Ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden formular para liberar de forma inmediata el fármaco activo sustancialmente tras la administración o en cualquier momento o periodo de tiempo predeterminado después de la administración.

Las formulaciones de liberación controlada incluyen (i) formulaciones que crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un periodo extenso de tiempo; (ii) formulaciones que, tras una demora predeterminada, crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un periodo extenso de tiempo; (iii) formulaciones que mantienen la acción del fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado al mantener una concentración eficaz del fármaco relativamente constante en el cuerpo con la concomitante disminución al mínimo de los efectos secundarios indeseables asociados a las fluctuaciones de la concentración plasmática de la sustancia del fármaco activo; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco mediante, p. ej., colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente o dentro del tejido u órgano enfermo; y (v) formulaciones que se dirigen a la acción del fármaco mediante el uso de vehículos o derivados químicos para administrar el fármaco a un tipo de célula diana concreto.

La administración de fármacos en forma de una formulación de liberación controlada se prefiere especialmente en los casos en los que el fármaco, bien solo o bien en combinación, tiene (i) un índice terapéutico estrecho (a saber, es muy pequeña la diferencia entre la concentración plasmática que conduce a efectos secundarios perjudiciales o reacciones tóxicas y la concentración plasmática que conduce a un efecto terapéutico; en general, el índice terapéutico, IT, se define como la proporción de la dosis letal media (DL50) entre la dosis eficaz media (DE50)); (ii) una ventana de absorción estrecha en el tubo digestivo; o (iii) una semivida biológica muy corta de tal forma que se requiere una dosificación frecuente durante un día para mantener la concentración plasmática en un valor terapéutico.

Se puede seguir cualquiera de una serie de estrategias para obtener la liberación controlada en la que la velocidad de la liberación supere la velocidad del metabolismo del fármaco en cuestión. La liberación controlada se puede obtener mediante la selección adecuada de diferentes ingredientes y parámetros de formulación, entre ellos, p. ej., distintos tipos de composiciones de liberación controlada y de evestimientos. Así pues, el fármaco se formula con los excipientes adecuados en una composición farmacéutica que, tras la administración, libera el fármaco de una manera controlada (composiciones de comprimidos o cápsulas unitarias únicas o múltiples, soluciones oleosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches y liposomas).

Formas farmacéuticas sólidas para el uso oral

Las formulaciones para el uso oral incluyen comprimidos que contienen el ingrediente o los ingredientes activos en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos. Estos excipientes pueden ser, por

ejemplo, diluyentes o sustancias de relleno inertes (p. ej., sacarosa, celulosa microcristalina, almidones que incluyen el almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro de sodio, fosfato de calcio, sulfato de calcio o fosfato de sodio); agentes de granulación y disgregantes (p. ej., derivados de la celulosa que incluyen celulosa microcristalina, almidones que incluyen el almidón de patata, croscarmelosa de sodio, alginatos o ácido algínico); aglutinantes (p. ej., goma arábica, ácido algínico, alginato de sodio, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol); y lubricantes, deslizantes y antiadherentes (p. ej., ácido esteárico, sílices o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, aromatizantes, plastificantes, humectantes, tamponantes y similares.

10 Los comprimidos pueden estar sin revestir o pueden estar revestidos mediante técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la disgregación y absorción en el tubo digestivo, y con lo que prolonga la acción durante más tiempo. El revestimiento se puede adaptar para liberar la sustancia del fármaco activo en un patrón predeterminado (p. ej., para conseguir una formulación de liberación controlada) o se puede adaptar para que no libere la sustancia del fármaco activo hasta después del paso por el estómago (revestimiento entérico). El revestimiento puede ser un revestimiento de azúcar, un revestimiento pelicular (p. ej., hecho de hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona) o un revestimiento entérico (p. ej., hecho de copolímero de ácido metacrílico, ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de acetato de polivinilo, goma laca y/o etilcelulosa). Se puede emplear un material para retrasar la liberación, tal como, p. ej., monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones en comprimidos sólidos pueden incluir un revestimiento adaptado para proteger la composición de los cambios químicos indeseados, (p. ej., la degradación química antes de la liberación de la sustancia del fármaco activo). El revestimiento se puede aplicar sobre la forma farmacéutica sólida de una manera similar a la descrita en *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*.

25 Los dos fármacos se pueden mezclar juntos en el comprimido, o se pueden separar. Por ejemplo, el primer fármaco está contenido en el interior del comprimido y el segundo fármaco está en el exterior, de tal manera que una porción sustancial del segundo fármaco se libera antes de la liberación del primer fármaco.

Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como comprimidos masticables, o como cápsulas duras de gelatina, en donde el ingrediente activo está mezclado con un diluyente sólido inerte (p. ej., almidón de patata, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas blandas de gelatina en donde el ingrediente activo está mezclado con agua o con un medio oleoso, por ejemplo, parafina líquida o aceite de oliva. Se pueden preparar polvos y granulados en forma de comprimidos y cápsulas de una manera convencional con los ingredientes mencionados más arriba.

35 Las composiciones de liberación controlada para uso oral pueden, p. ej., estar construidas para liberar el fármaco activo mediante el control de la disolución y/o de la difusión de la sustancia del fármaco activo.

La liberación controlada por disolución o difusión se puede conseguir mediante el revestimiento adecuado de un comprimido, cápsula, microgránulo o formulación granulada de fármacos, o por la incorporación del fármaco en una matriz adecuada. Un revestimiento para liberación controlada puede incluir una o varias de las sustancias de revestimiento mencionadas anteriormente y/o, p. ej., goma laca, cera de abeja, GlycoWax®, cera de ricino, cera del Brasil, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, pamitoestearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido di-poliláctico, butirato de acetato de celulosa, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, vinilpirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metilmetacrilato, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3-butilenglicol, metacrilato de etilenglicol y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de la matriz también puede incluir, p. ej., metilcelulosa hidratada, cera del Brasil y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, metilacrilato-metilmecacrilato, cloruro de polivinilo, polietileno y/o fluorocarburo halogenado.

Una composición de liberación controlada que contiene uno o varios de los fármacos de las combinaciones reivindicadas también puede estar en forma de un comprimido o cápsula flotante (a saber, un comprimido o cápsula que, tras la administración oral, flota en la parte superior del contenido gástrico durante un determinado periodo de tiempo). Una formulación de comprimido flotante del fármaco o fármacos se puede preparar mediante la granulación de una mezcla del fármaco o fármacos con excipientes y el 20-75 % p/p de hidrocoloides, tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. Los gránulos obtenidos se pueden comprimir luego en comprimidos. Al entrar en contacto con el jugo gástrico, el comprimido forma una barrera de gel sustancialmente impermeable al agua alrededor de su superficie. Esta barrera de gel interviene en el mantenimiento de una densidad de menos de uno, lo que permite que el comprimido permanezca a flote en el jugo gástrico.

Líquidos para la administración oral

Son formas farmacéuticas convenientes para la administración oral los polvos, los polvos dispersables o los gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua. La formulación como suspensión proporciona el ingrediente activo en una mezcla con un dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes de suspensión adecuados son, por ejemplo, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, alginato de sodio y similares.

#### Composiciones parenterales

La composición farmacéutica también se puede administrar por vía parenteral mediante la inyección, infusión o implantación (intravenosa, intramuscular, subcutánea o similar) en formas farmacéuticas, formulaciones, o mediante dispositivos de administración adecuados o implantes que contienen los vehículos y adyuvantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos. La formulación y la preparación de tales composiciones las conocen bien los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica.

Las composiciones para el uso parenteral se pueden dar a conocer en formas de dosis unitarias (p. ej., en ampollas monodosis) o en viales que contienen varias dosis y en los que se puede añadir un conservante adecuado (véase más abajo). La composición puede estar en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión o un dispositivo de administración para la implantación, o se puede presentar como un polvo seco a reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Además del fármaco o fármacos activos, la composición puede incluir los vehículos y/o excipientes adecuados que son aceptables para la vía parenteral. El fármaco o los fármacos activos se pueden incorporar en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas o similares para la liberación controlada. La composición puede incluir agentes de suspensión, solubilizantes, estabilizantes, agentes de ajuste del pH y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden estar en la forma adecuada para la inyección estéril. Para preparar tal composición, el fármaco o fármacos activos adecuados se disuelven o suspenden en un vehículo líquido aceptable para la vía parenteral. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, el agua ajustada a un pH idóneo mediante la adición de una cantidad adecuada de ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o un tampón adecuado, 1,3-butanodiol, solución de Ringer y una solución isotónica de cloruro de sodio. La formulación acuosa también puede contener uno o más conservantes (p. ej., metilo, etilo o p-hidroxibenzoato de n-propilo). En los casos en los que uno de los fármacos es sólo escasa o ligeramente hidrosoluble, se puede añadir un solubilizante o un potenciador de la disolución, o el disolvente puede incluir el 10-60% p/p de propilenglicol o similares.

Las composiciones parenterales de liberación controlada puede estar en forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, soluciones oleosas, suspensiones oleosas o emulsiones. Otra posibilidad es que el fármaco o los fármacos activos se pueden incorporar en vehículos, liposomas, nanopartículas, implantes o dispositivos de infusión, todos ellos biocompatibles. Los materiales para ser usados en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, p. ej., polímeros biodegradables/bioerosionables tales como poligalactina, poli-(cianoacrilato de isobutilo), poli(2-hidroxietil-L-glutamina). Los vehículos biocompatibles que se pueden utilizar cuando se formula una formulación parenteral de liberación controlada son glúcidos (p. ej., dextranos), proteínas (p. ej., albúmina), lipoproteínas o anticuerpos. Los materiales para ser usados en los implantes pueden no ser biodegradables (p. ej., polidimetilsiloxano) o ser biodegradables (p. ej., poli(caprolactona), poli(ácido glicólico) o poli(ortoésteres)).

#### Composiciones rectales

Para la aplicación rectal, las formas de dosificación adecuadas para una composición incluyen supositorios (de tipo emulsión o suspensión) y cápsulas de gelatina rectales (soluciones o suspensiones). En una formulación de supositorio típica, el fármaco o los fármacos activos se combinan con una base de supositorio farmacéuticamente aceptable adecuada tal como mantequilla de cacao, ácidos grasos esterificados, gelatina glicerizada y diferentes bases dispersables o hidrosolubles, como los polietilenglicoles. Se pueden incorporar distintos aditivos, potenciadores o tensioactivos.

#### Composiciones tópicas y percutáneas

Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar por vía tópica sobre la piel para la absorción percutánea en formas farmacéuticas o formulaciones que contienen vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables convencionalmente no tóxicos que incluyen microesferas y liposomas. Las formulaciones incluyen cremas, ungüentos, lociones, linimientos, geles, hidrogeles, soluciones, suspensiones, palillos, pulverizadores, pastas, emplastos y otras clases de sistemas de administración transdérmica de fármacos. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir emulsionantes, antioxidantes, tamponantes, conservantes, humectantes, potenciadores de penetración, quelantes, formadores de geles, bases de ungüentos, perfumes y protectores de la piel.

Los emulsionantes pueden ser gomas que se producen de forma natural (p. ej., goma arábica o goma tragacanto).

Los conservantes, humectantes y potenciadores de la penetración pueden ser parabenos, tales como p-hidroxibenzoato de metilo o de propilo, y cloruro de benzalconio, glicerina, propilenglicol, urea, etc.

- 5 Las composiciones farmacéuticas descritas más arriba para la administración tópica sobre la piel también se pueden utilizar junto con la administración tópica sobre o cerca de la parte del cuerpo que se tiene que tratar. Las composiciones se pueden adaptar para la aplicación directa o para la aplicación por medio de dispositivos de administración de fármacos especiales tales como apósitos o alternativamente emplastos, almohadillas, esponjas, tiras u otras formas de material flexible adecuado.

Dosificación y duración del tratamiento

- 10 Se apreciará que los fármacos de la combinación se pueden administrar a la vez, bien en la misma formulación farmacéutica o bien en una diferente, o secuencialmente. En una realización preferida, los fármacos se formulan juntos, en el mismo excipiente o vehículo. Si hay administración secuencial, el intervalo hasta la administración del segundo (o adicional) ingrediente activo no debe ser de manera que se pierda el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. Un requisito mínimo para una combinación de acuerdo con esta descripción es que la combinación debe ser diseñada para ser usada en combinación y que ofrezca el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. El uso pretendido de una politerapia se puede inferir mediante las instalaciones, provisiones, adaptaciones y/o otros medios para ayudar a utilizar la combinación de acuerdo con la invención.

- 20 Las cantidades terapéuticamente eficaces de dos o más fármacos que son objeto de esta invención se pueden utilizar juntas para preparar un medicamento útil para reducir el efecto del aumento de la expresión del gen de PMP22, lo que previene o reduce el riesgo de desarrollar la enfermedad de CMT1A, al detener o enlentecer la progresión de la enfermedad de CMT1A una vez que se ha manifestado clínicamente, y al prevenir o reducir el riesgo de una primera o posterior aparición de un acontecimiento neuropático.

- 25 Aunque los fármacos activos de la presente invención se pueden administrar en varias dosis, por ejemplo, dos o tres veces al día, se prefiere una dosis diaria única de cada fármaco en la combinación, en donde lo más preferido es una única dosis diaria de todos los fármacos en una única composición farmacéutica (forma de dosis unitaria).

La administración puede ser una a varias veces al día durante varios días a varios años y puede incluso durar el resto de la vida del paciente. En la mayoría de los casos se indicará la administración a largo plazo crónica o al menos repetida con periodicidad.

- 30
- La terminología «forma de dosis unitaria» se refiere a unidades físicamente independientes (tales como cápsulas, comprimidos o cilindros de jeringuilla cargados) adecuados como dosis unitarias para sujetos humanos, en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada del material o materiales activos calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

- 35 La cantidad de cada fármaco en la combinación preferida para una dosis unitaria dependerá de varios factores, entre ellos el modo de administración, la masa corporal y la edad del paciente, la gravedad del daño neuropático causado por la enfermedad de CMT1A o el riesgo de potenciales efectos secundarios cuando se considera el estado de salud general de la persona a tratar.

Adicionalmente, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo sobre la farmacocinética, farmacodinámica o perfil de eficacia de un fármaco) sobre un determinado paciente puede afectar a la dosis utilizada.

- 40 Salvo cuando se responde a casos de enfermedad de CMT especialmente perjudiciales en los que se pueden necesitar dosis más altas, o cuando se tratan los niños en los que se deben elegir dosis más bajas, la dosis preferida de cada fármaco en la combinación normalmente yacerá dentro del intervalo de dosis no por encima de la receta normal para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo o que se ha demostrado que es segura en los grandes estudios clínicos de fase 3.

- 45 Por ejemplo,

- Para el tiamazol, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 mg al día si se toma por vía oral. Se deben elegir dosis especiales si se administra por vía tópica.
- Para la pilocarpina, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg al día si se toma por vía oral.

- 50 La dosis más preferida corresponderá a cantidades desde el 1% hasta el 10% de las normalmente recetadas para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo.

Se comprenderá que la cantidad del fármaco realmente administrado será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes que incluyen la afección o afecciones a tratar, la composición exacta a administrar, la edad, el peso y la respuesta de cada paciente, la gravedad de los síntomas del paciente y la vía de administración elegida. Por lo tanto, los intervalos de dosificación anteriores pretenden proporcionar una guía general y apoyo para las enseñanzas de la presente memoria, pero no pretenden limitar el alcance de la invención.

#### Programa terapéutico, dosis y vías de administración

A continuación se describen las dosis para las cobminaciones farmacológicas (que se diferencian en la vía de administración) en los humanos.

#### Tiamazol y pilocarpina

10 1 – Administrados por vía oral como una sola composición farmacéutica: tiamazol desde aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 mg y pilocarpina desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg al día por vía oral durante varios meses, y las dosis más preferidas para ambos fármacos en la composición oscilan de 0,6 a 35 mg por unidad (al día).

15 2 – Administrados simultáneamente por vía oral durante varios meses: tiamazol desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 15 mg y pilocarpina desde aproximadamente 0,02 a aproximadamente 20 mg al día por vía oral durante varios meses, y las dosis más preferidas para ambos fármacos en la composición oscilan de 1,02 a 35 mg por unidad (al día).

20 3 – Administrados simultáneamente durante varios meses: tiamazol desde aproximadamente 0,05 a aproximadamente 15 mg y pilocarpina desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg al día por vía oral durante varios meses, y las dosis más preferidas para ambos fármacos en la composición oscilan de 0,06 a 35 mg por unidad (al día).

Las dosis de este fármaco en cualquier combinación entre las descritas en la presente invención pueden ser distintas según las formulaciones propuestas para el tratamiento de los hombres o de las mujeres.

25 Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describirán en el siguiente apartado experimental, que se deben considerar solo a modo de ilustración.

### Ejemplos

#### I. Experimentos *in vitro*

##### Células de Schwann primarias de rata comerciales

30 Los viales de cultivo primario de células de Schwann (CS) (Sciencell n.º R1700) se descongelan y se inoculan a la densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> en el «medio de células de Schwann de Sciencell» (medio basal de Sciencell n.º R1701) en frascos de 75 cm<sup>2</sup> revestidos previamente con poli-L-lisina. El medio del cultivo se compone de medio basal, suero bovino fetal al 5% (3H-Biomedical AB n.º 1701-0025), complemento de crecimiento de células de Schwann al 1% (3H Biomedical AB n.º 1701-1752), gentamicina al 1% (Sigma n.º G1397) y 10 µM de forskolina (Sigma n.º F6886) para favorecer su proliferación.

35 Después de alcanzar la confluencia (de 4 a 10 días según el lote de células), las células de Schwann se purifican mediante agitación suave o mediante inmunocribado con thy1.1 que permite el aislamiento de las CS a partir de los fibroblastos adheridos, para producir cultivos que son puros al menos al 95%. A continuación, se cuentan las CS (con el método de azul tripano) y se inoculan en un frasco de 75 cm<sup>2</sup> revestido previamente con poli-L-lisina en el mismo medio de CS. En confluencia, las células se enjuagan, se tripsinizan (tripsina-EDTA a 1 x diluido de Invitrogen n.º 1540054), se diluyen en PBS sin calcio ni magnesio, se cuentan y se siembran en placas de 12 pocillos (140.000 células/pocillo) en el medio de células de Schwann de Sciencell con el 5% de FBS, 1% del complemento de crecimiento celular (CCC), 40 µg/ml de gentamicina y 4 µM de forskolina.

##### Células de Schwann primarias de rata hechas a medida

45 Los cultivos primarios de células de Schwann (CS) se establecen a partir de los nervios ciáticos (entre P0 y P2) de las ratas recién nacidas Sprague-Dawley. Todas las ratas recién nacidas se sacrifican y se aíslan en una placa Petri. La disección se realiza en condiciones estériles.

50 Se retira la piel dorsal de la pata trasera y del torso inferior. Se aísla el nervio ciático y se transfiere a una placa de cultivo que contiene Leibovitz enfriado en hielo (L15, Invitrogen n.º 11415) complementado con una solución de penicilina/estreptomina al 1% (50 UI/ml y 50 µg/ml, respectivamente; Invitrogen n.º 15070) y el 1% de seroalbúmina bovina (SAB, Sigma A6003). De cada rata se toman ambos nervios y se transfieren a un tubo de 15 ml que contiene

L15 enfriado en hielo. A continuación se retira el medio L15 y se reemplaza por 2,4 ml de DMEM (Invitrogen n.º 21969035) con 10 mg/ml de colagenasa (Sigma n.º A6003). Los nervios se incuban en este medio durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se retira el medio y ambos nervios se disocian con tripsina (10% de tripsina EDTA a 10 x, Invitrogen n.º 15400054) diluido en PBS sin calcio ni magnesio (Invitrogen n.º 2007-03) durante 20 min a 37 °C.

5 Se detiene la reacción con la adición de DMEM que contiene ADNasa I de grado II (0,1 mg/ml de Roche Diagnostic n.º 104159) y suero de ternera fetal (STF al 10%, Invitrogen n.º 10270). La suspensión celular se trituró con una pipeta de 10 ml y se pasó a través de un filtro en un tubo de 50 ml (unidades de filtro de 13 mm de Swinnex, Millipore, con filtros de malla de nilón de 20 µl, Fisher). La suspensión celular se centrifuga a 350g durante 10 min a temperatura ambiente (TA) y los sedimentos se suspenden en DMEM con STF al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%.

10 Se cuentan las células (con el método de azul tripano) y se inoculan en placas de cultivo de tejidos Primaria de 100 mm de Falcon a la densidad de  $5 \times 10^5$  a  $10^6$  células/placa.

Después de un día de cultivo, se cambia el medio por DMEM, STF al 10%, penicilina/estreptomicina al 1% y 10 µM de β-D-arabinofuranósido de citosina (Sigma n.º C1768). A las 48 horas se elimina el medio y las células se lavan tres veces con DMEM. A continuación se añade el medio de crecimiento de CS, compuesto por DMEM, STF al 10%, penicilina/estreptomicina al 1%, 2 µM de forskolina (Sigma n.º F6886), 10 µg/ml de extracto de pituitaria bovina (PEX, Invitrogen n.º 13028). El medio se reemplaza cada 2 o 3 días.

15

Al cabo de 8 días de cultivo (de 4 a 10 días según el lote de células), las células de Schwann alcanzan la confluencia y el cultivo, que contiene una gran cantidad de fibroblastos contaminantes, se purifica mediante el procedimiento de inmunocribado de thy1.1. Tras esta purificación, las células se suspenden en el medio de crecimiento a 10.000 células/cm<sup>2</sup> en frascos de 75 cm<sup>2</sup> revestidos previamente con poli-L-lisina. Una vez que alcanzan la confluencia, las células se enjuagan, se tripsinizan (tripsina-EDTA), se cuentan y se siembran en placas de 12 pocillos (100.000 células/pocillo).

20

#### Incubación del fármaco:

Después de haber sembrado las células en placas de 12 pocillos, se reemplaza el medio por un medio definido que consiste en una mezcla de DMEM-F12 (Invitrogen n.º 21331020) complementado con el 1% del complemento N2 (Invitrogen n.º 17502), 1% de L-glutamina (Invitrogen n.º 25030024), 2,5% de STF (Sciencell n.º 0025), 0,02 µg/ml de corticosterona (Sigma n.º C2505), 4 µM de forskolina y 50 µg/ml de gentamicina. No se añaden factores de crecimiento a este medio para favorecer la diferenciación de la CS.

25

Al cabo de 24 horas, se reemplaza el medio por un medio definido (DMEM-F12) complementado con el 1% de insulina-transferrina-selenio-X (ITS, Invitrogen n.º 51300), 16 µg/ml de putrescina (Sigma n.º P5780), 0,02 µg/ml de corticosterona y 50 µg/ml de gentamicina. En esta etapa, ni la progesterona ni la forskolina están presentes en el medio.

30

Un día después, las células de Schwann primarias se estimulan con fármacos durante 24 horas (3 pocillos/afección), La preparación de cada compuesto se realiza justo antes a su adición al medio de cultivo celular.

35 Se analizó la pilocarpina (SIGMA) en las células de Schwann primarias en un intervalo de concentración de 10 µM a 10 nM, mientras que el tiamazol (SIGMA) se analizó a 10 µM, 1 µM, 100 nM y 10 nM.

Se añaden fármacos a un medio definido compuesto por DMEM-F12, con el 1% de insulina-transferrina-selenio-X (ITS, Invitrogen n.º 51300), 16 µg/ml de putrescina, 0,02 µg/ml de corticosterona, 10 nM de progesterona y 50 µg/ml de gentamicina. La ausencia de forskolina antes y durante la estimulación con fármacos evita la saturación de la adenilato ciclasa.

40

#### Células de schwannoma cultivadas

La línea de células de schwannoma RT4-D6-P2T de rata (ATCC n.º CRL-2468™) se descongela en DMEM (ATCC n.º 30-2002) y STF al 10% (Invitrogen n.º 10106). Las células se mantienen a 37 °C en un incubador humidificado, en una atmósfera de aire (95 %) y CO<sub>2</sub> (5 %). En el pase n.º 4, las células se disocian mediante tripsinización (+ 1 ml de tripsina-EDTA, 0,25 %-0,53 nM; Invitrogen) de 5 a 15 min a 37 °C. Se detiene la reacción mediante la adición de DMEM que contiene suero bovino fetal (SBF) al 10%. Se cuentan los pocillos en un citómetro Neubauer mediante la prueba de exclusión de azul tripano (Sigma). La suspensión se tritura con una pipeta de 10 ml y, a continuación, las células se centrifugan a 350 xg durante 10 min a temperatura ambiente. El sedimento de las células disociadas se resuspende y se inoculan de base 30.000 células/ml en placas de 12 pocillos. Al cabo de 48 horas, el medio se reemplaza por un medio sin suero (DMEM). Al cabo de 15 horas, los pocillos RT4-D6P2T se estimulan con fármacos añadidos al medio de cultivo celular a la concentración elegida. La preparación de cada fármaco por separado o de la combinación de fármacos se realiza justo antes de su adición al medio de cultivo celular.

45

50

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa acoplada a la transcriptasa inversa (Q-RT-PCR, por su nombre en inglés)

Se utiliza la RT-PCR cuantitativa para comparar la cantidad de ARNm de PMP22 tras la estimulación con fármacos, respecto al ARNm del gen de mantenimiento RPS9 en la línea de células RT4-D6P2T.

Al cabo de 8 horas de incubación con los fármacos, las células se enjuagan con PBS esterilizado y frío, el ARN total de las CS de cada muestra celular se extrae y purifica con el microkit de Qiagen RNeasy (Qiagen n.º 74004). Los ácidos nucleicos se cuantifican con el espectrofotómetro Nanodrop utilizando 1 µl de la muestra de ARN. Se determina la integridad del ARN mediante un aparato BioAnalyzer (Agilent).

Los ARN se retrotranscriben en ADNc de acuerdo con el protocolo estándar. Las plantillas de ADNc para la amplificación por PCR se sintetizan a partir de 100 ng de ARN total mediante la transcriptasa-inversa SuperScript II (Invitrogen n.º 18064-014) durante 60 min a 42 °C en presencia de oligo(dT), en un volumen final de 20 µl.

Los ADNc se someten a la amplificación por PCR en el sistema «LightCycler® 480» (Roche Molecular Systems Inc.). Cada ADNc se diluye cinco veces antes de utilizarse para la amplificación por PCR. En la solución de la reacción de PCR entran 2 µl de este ADNc con 5 µl de la mezcla Master del kit (Roche n.º 04-887301001) en un volumen final de 10 µl. Los experimentos preliminares aseguraron que la cuantificación se realizó en la fase exponencial del procedimiento de amplificación para ambas secuencias y que la eficacia de la reacción es similar entre los genes diana y de mantenimiento.

Se utilizó la química Taqman para realizar el análisis por RT-Q-PCR. La reacción de la PCR se realiza mediante amplificación de la PMP22 de rata (NM\_017037) con 500 nM de cada cebador (F y R) y 200 nM de la sonda Taq1 de Sigma-Aldrich.

Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: 5 min de desnaturalización a 95 °C seguidos de 10 s a 95 °C, 40 s a 60 °C y 10 s a 72 °C y 1 min a 40 °C (cuarenta ciclos de amplificación). El nivel relativo de la expresión del gen PMP22 se mide con el procedimiento de  $\Delta\text{Ct}$  por comparación de la cantidad de productos generados del gen diana PMP22 y el análisis de expresión de PMP22 mediante citometría de flujo (FACS). Al cabo de 8 horas, 24 horas y 48 horas de la incubación con fármacos, se recuperan, se centrifugan y se congelan los sobrenadantes de las células de Schwann primarias de rata. Las CS se desprenden con tripsina-EDTA. Tan pronto como la mayoría de células están en suspensión, se neutraliza la tripsina con DMEM con STF al 10%.

Los sobrenadantes con las células se recuperan y se centrifugan. Los sedimentos de las células se transfieren a microtubos, se lavan en PBS una vez y se fijan con una solución específica (AbCys n.º Reactivo A BUF09B). 10 minutos después, las células se enjuagan una vez con PBS y se mantienen a 4 °C.

Cinco días después de la fijación celular, todas las preparaciones celulares con diferentes tiempos de incubación se marcan mediante el protocolo que se describe a continuación.

Las células se centrifugan a 7000 rpm durante 5 minutos y los sedimentos se suspenden en una solución de permeabilización (AbCys n.º Reactivo B BUF09B) y se marcan con el anticuerpo primario contra PMP22 (Abcam n.º ab61220, 1/50) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las células se centrifugan a 7000 rpm durante 5 minutos y los sedimentos celulares se enjuagan una vez en PBS. Se añade un anticuerpo secundario, unido a Alexa Fluor 488 (anti-IgG de conejo de cabra, Molecular Probes n.º A11008, 1/100) durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, las células se centrifugan a 7000 rpm durante 5 minutos y los sedimentos celulares se enjuagan una vez en PBS. Se incrementa el marcaje por la adición de un anticuerpo terciario acoplado a Alexa Fluor 488 (anti-IgG de cabra de pollo, Molecular Probes n.º A21467, 1/100) durante una hora de incubación, a temperatura ambiente. Las células se lavan entonces una vez en PBS. Se realiza el control sin ningún anticuerpo (células sin marcar) para determinar el nivel de autofluorescencia y adaptar la sensibilidad de los fotomultiplicadores. El control con los anticuerpos secundario y terciario, pero sin el anticuerpo primario, se realiza para valorar la fijación inespecífica de los anticuerpos.

La adquisición y el análisis de los datos se realiza con un citómetro FACS Array y el programa informático FACS Array (Becton Dickinson) sobre 5000 células. Se analizan la dispersión frontal (FSC, por su nombre en inglés) correlacionada con el volumen celular (tamaño) y la dispersión lateral (SSC, por su nombre en inglés) dependiente de la complejidad interna de las células (granulosidad). Para la expresión de PMP22, el análisis se realiza dentro de todas las células y se calcula el porcentaje de células positivas. Las células positivas son células con intensidad de fluorescencia más elevada que el control con el anticuerpo secundario.

Para cuantificar el número de CS, las células del medio de control se analizan con los anticuerpos anti-proteínas S100.

Las células se preparan de acuerdo con el protocolo siguiente: las células de Schwann se tiñen con el anticuerpo anti-proteínas S100 (Dako n.º S0311, 1/100) durante 1 hora a temperatura ambiente. Este anticuerpo se marca de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente para la inmunotinción de PMP22, pero sin la incubación con el anticuerpo terciario.

## Resultados

Observamos que la cantidad de ARNm de PMP22 (figura 1) disminuye significativamente en las células de Schwann primarias, y que una dosis de 1  $\mu$ M de pilocarpina induce la disminución más importante de PMP22. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; significativamente diferente del control (prueba de la  $t$  de Student de datos emparejados). A la derecha, expuestas 24 horas a la pilocarpina, el nivel de expresión del ARNm de PMP22 disminuye significativamente en las células de Schwann primarias incluso a dosis bajas (10 nM y 50 nM). De igual forma, observamos que la pilocarpina (1  $\mu$ M) disminuye significativamente el nivel de expresión de la proteína PMP22 tras 24 horas de incubación, aproximadamente un 38% en las células de Schwann primarias. Este efecto sigue siendo significativo tras 48 horas de incubación (-18%,  $p < 0,001$ ).

10 En otro experimento, los fármacos (recogidos en la tabla 1) se incuban con la línea celular de schwannoma de rata durante 8 horas y se cuantifica el nivel de expresión del ARNm de PMP22 mediante RT-Q-PCR.

Los inventores han observado (figura 2) que mientras que el tiamazol (0,1 nM) y la pilocarpina (0,001 nM), utilizados como fármacos por separado, no ejercen ninguna actividad significativa sobre el nivel de expresión del ARNm de PMP22, este último disminuye significativamente con la combinación. La actividad sinérgica de estos dos fármacos se ilustra en la figura 2. Estos datos demuestran que, a las concentraciones elegidas, la combinación de pilocarpina y tiamazol es capaz de disminuir significativamente la expresión del gen PMP22 en las células cultivadas de schwannoma, mientras que la pilocarpina y el tiamazol que son activos a concentraciones más altas en las células de Schwann primarias no disminuyen el nivel de expresión de este gen en este sistema.

II. Experimentos *in vivo* en un modelo animal de CMT

20 Los inventores han analizado el efecto terapéutico de los compuestos y de las combinaciones en el modelo de CMT de rata transgénica, unas ratas transgénicas hemocigotas para PMP22 que llevan tres copias adicionales del gen PMP22 de ratón y que muestran signos de desmielinización de los nervios periféricos y de los craneales (Sereda et al., 1996; Grandis et al., 2004). A nivel del ARNm, una sobreexpresión de PMP22 de 1,6 veces de media en las ratas con CMT se correlaciona con el fenotipo clínico. Un posible nivel umbral de la sobreexpresión de PMP22 en el cual el gen de tipo silvestre se convierte en un gen de enfermedad representa una «diana» obvia que ha de alcanzar todo tratamiento que persiga la reducción de la expresión del gen PMP22.

Este modelo de rata con CMT es una buena aproximación de la enfermedad de CMT1A humana desde un punto de vista clínico. Las ratas adultas con CMT muestran un enlentecimiento de la velocidad de conducción de los nervios motores con unos valores similares a los de los pacientes con CMT1A, a saber, menos del 50%. Tras la estimulación del nervio ciático, los potenciales de acción compuestos sobre el músculo muestran una reducción de amplitud y pérdida de la sincronización. Los cambios histológicos y electrofisiológicos preceden a los signos clínicos manifiestos del deterioro motor (Sereda et al., 1996, 2003). La pérdida de axones, confirmada mediante la atrofia muscular pronunciada desde el punto de vista histológico, concuerda con los síntomas de CMT1A humana.

35 Las ratas con CMT ya sirvieron de modelo para un tratamiento experimental de la CMT1A (Meyer zu Hörste et al., 2007). En este modelo de enfermedad de CMT1A, los signos manifiestos y ocultos de la enfermedad (deficiencia locomotora, las alteraciones particulares en las características electrofisiológicas y tisulares y, finalmente, el nivel de la sobreexpresión de PMP22) parecen estar más cerca de los encontrados en los pacientes con CMT1A.

Los inventores han detectado los compuestos y las combinaciones que producen el efecto terapéutico en un modelo de rata. Los grupos experimentales se forman con ratas jóvenes de ambos sexos por separado. Las ratas se asignan a los grupos mediante el programa de aleatorización basado en la masa corporal. En algunos experimentos, la aleatorización se basa en el comportamiento de las ratas en la prueba de la barra. Ambos sexos están representados mediante distintos grupos de control con crías de la misma camada que son numéricamente iguales o más grandes que los grupos de tratamiento.

45 Las ratas se tratan continuamente con fármacos: se les obliga a comer o se les inyecta mediante la bomba subcutánea osmótica de Alzet (DURECT Corporation Cupertino, CA), según la biodisponibilidad de cada fármaco durante 3 o 6 semanas.

Los animales se pesan dos veces a la semana para ajustar las dosis a la masa corporal creciente. Si se elige la bomba osmótica para la administración del tratamiento, la dosis del fármaco se calcula sobre la base de la masa corporal media estimada de los animales que se espera según la edad mientras dura el bombeo (6 semanas). Las bombas se reimplantan, si fuera necesario, con el protocolo de anestesia adecuado.

## Pruebas conductistas

Cada tres o cuatro semanas, los animales se someten a una prueba conductista. Cada prueba la realiza el mismo investigador en la misma habitación y en el mismo momento del día; esta homogeneidad se mantiene a lo largo del experimento. El investigador desconoce los tratamientos y la determinación del genotipo. «Prueba de la barra» y

«Fuerza pensil» se han utilizado principalmente para valorar el comportamiento a lo largo del estudio. El programa de la prueba de la barra puede cambiar a medida que el animal crece (para evitar el sesgo debido al aprendizaje, por ejemplo). La prueba de la fuerza prensil permite detectar diferencias sutiles de la capacidad prensil que parece estar compuesta de la fuerza muscular, el estado de la sensibilidad (por ejemplo, las sensaciones táctiles dolorosas pueden cambiar los valores medidos de la fuerza), y el componente conductista («motivación»). Los valores difieren entre las extremidades anteriores y posteriores, y dependen enormemente de la edad de los animales.

La prueba de la fuerza prensil mide la fuerza con la que un animal se mantiene agarrado con las patas delanteras y con las patas traseras por separado. Se coloca un dinamómetro con un agarre para medir la fuerza (indicador de fuerza FG-5000A). El experimentador mantiene a la rata de una manera que aferra al agarre bien con las patas delanteras o con las patas traseras y tira suavemente de la rata hacia atrás hasta que libera la presión. Se anota la fuerza medida cuando el animal libera la presión.

Por animal, se procesan dos ensayos sucesivos que miden la fuerza de las patas delanteras y dos ensayos sucesivos que miden la fuerza de las patas traseras; sólo se presta atención (en N) a la puntuación máxima (una para las patas delanteras y otra para las patas traseras) .

#### 15 Prueba de la barra

La prueba de la barra evalúa la capacidad de la rata para mantenerse en un rodillo fijo. Las ratas PMP22 que presentan debilidad muscular realizan esta prueba de forma defectuosa (Sereda et al., 1996). Se coloca la rata sobre sus cuatro patas en medio del rodillo (diámetro; 2,5 cm; longitud: 50 cm; 30 cm por encima de la mesa). Los ensayos se realizan consecutivamente; el número (5 o 10) y la duración (30 o 60 s) de los ensayos en nuestros experimentos ha dependido del lote de los animales. Se ha introducido esta variabilidad en las pruebas para determinar el programa adecuado para la mejor detección de la deficiencia motora en las ratas con CMT en el transcurso de los experimentos.

Los índices de cumplimiento se registran en cada sesión:

- El número de intentos necesarios para mantenerse durante 60 s o 30 s en el rodillo.
- El tiempo medio que pasa en la barra (a saber, la latencia de caída) en cada intento y el promedio de la sesión. En los procedimientos experimentales, la sesión termina después de que la rata haya permanecido dos veces durante un tiempo mínimo, a saber, 30 s o 60 s sobre la barra. Se asigna un cumplimiento de tiempo mínimo (30 s o 60 s) en los intentos que no se completaron.
- El número de caídas.

#### 30 Valoración de la salud general

A lo largo del experimento se monitorizan la masa corporal y los signos manifiestos (apariencia del pelaje, postura corporal, temblor) de los animales. Para el registro se utiliza la escala de valoración siguiente: 0 = normal, 1 = anormal.

#### La marcha

Se observa cada rata en una nueva jaula para ratas (dimensiones 55 x 33 x 18 cm) sin camada durante cinco minutos. La marcha de las ratas se evalúa con 4 parámetros:

- Puntuación 0 = marcha normal (fluida).
- Puntuación 1 = marcha anormal (no es fluida o la rata tiene una ligera cojera).
- Puntuación 2 = incapacidad moderada (la rata arrastra una pata y es capaz de ponerla recta y caminar).
- Puntuación 3 = incapacidad importante (la rata arrastra una o ambas patas traseras, pero es incapaz de ponerla/s recta/s).

#### Prueba del plano inclinado

El aparato de deslizamiento tiene un plano de plexiglás de 30 x 50 cm que se puede inclinar con un ángulo de 0° (horizontal) a 60°. Cada rata se colocó inicialmente en el plano inclinado con un ángulo de 25° en la posición con la cabeza hacia arriba (orientación cabeza arriba); se realizan dos intentos independientes durante 1 minuto. Al cabo de 30 min se realiza el mismo experimento con un plano inclinado de 35°, y luego con un plano inclinado en un ángulo de 40°. Durante este tiempo, la rata regresó a su jaula. El plano se limpia después de cada intento.

El cumplimiento de las ratas se evalúa con 4 puntuaciones diferentes:

- Puntuación 0: no resbala.
- Puntuación 1: resbala un poco (una o dos patas).
- Puntuación 2: resbala moderadamente (las 4 patas), pero no hasta el final del plano.
- 5    – Puntuación 3: la rata se resbala hasta final del plano.

#### Electrofisiología

10 Cuando sea adecuado, las ratas se someten a una evaluación electrofisiológica: se miden la velocidad de la conducción del nervio (VCN) sensorial así como la latencia y amplitud del potencial. La medición de la VCN y la adquisición del potencial (subcutáneo) se realizaron con ayuda de la cadena compuesta por un amplificador (AM System 1700 y/o EMG-UTC), un estimulador (Haward apparatus 223) y un ordenador equipado con una tarjeta de adquisición y un programa informático para la adquisición (SPATOL) y para el tratamiento de las señales (CALVISE).

15 Se anestesiaron los animales con ketamina/xalazina y se mantuvieron en la placa termostata a 37 °C a lo largo de la prueba (se proporcionaron anestésicos cuando era necesario). Se insertaron electrodos estimuladores de aguja de plata en la parte proximal de la cola. El electrodo de registro se introdujo por vía subcutánea a través de aproximadamente 1 mm de la piel en la parte distal de la cola (a 4 y 6 cm del electrodo estimulador). Se administraron estímulos de onda cuadrada de corriente constante, de 0,2 s de duración, a una frecuencia de 0,3 por segundo. Las respuestas, amplificadas de 5000 a 20.000, se visualizaron y recogieron en un sistema de adquisición de datos basado en un ordenador. Se midió la latencia de cada inicio de onda (definido como la primera desviación identificada con claridad desde el nivel basal). La amplitud entre los picos de las desviaciones más grandes se calcularon para determinar la amplitud máxima. Para cada registro se realizaron mediciones sobre las respuestas promediadas a al menos diez estímulos idénticos. La velocidad de conducción relacionada sensorial (VCSN) se calculó mediante la división de la distancia entre los cátodos estimuladores por la diferencia entre las latencias correspondientes obtenidas de dos sitios de estimulación.

#### Mediciones histológicas

25 Después de las últimas pruebas (los tratamientos continuaron hasta el último día), se sacrificaron las ratas. Las patas traseras de las ratas transgénicas y de tipo silvestre se diseccionaron y se fijaron introduciéndolas en una solución de formol al 4% durante 48 horas, y se transfirieron a una solución de formol al 10% durante 2 días más. Después de enjuagarse 15 min en agua, se procesaron para la descalcificación durante 26 horas (Descalcificador Labonord rápido n.º 3 n.º DC3\_09128300).

30 Los pies se cortaron entonces transversalmente en dos trozos que se procesan para la coloración con osmio.

Los tejidos se suspendieron por encima de una solución de tetróxido de osmio al 1% (VWR, óxido de ósmio VIII 0,5 g n.º 20551.076) durante 24 horas y después se enjuagan con agua desmineralizada durante 4 a 6 horas. A continuación, los tejidos se deshidratan de manera automática por impregnación (VIP2000 Vertical, Bayer Diagnostics) y se embebieron de forma clásica en parafina.

35 Los cortes de tejido de 4 µm se deshidratan en baños sucesivos de xileno y alcohol, y se montan (cola Pertex, n.º T/00811\_MICROM) para el análisis posterior.

#### Análisis de imagen

40 Se eligieron cuidadosamente cortes de los 6 animales para ilustrar el mismo nivel anatómico (articulación de dedo del pie) y se analizaron con un microscopio Olympus que lleva acoplado un programa informático de Saisam Microvision (Archimed Pro® 1997-2000 de Microvision Instruments).

El nervio periférico se localiza y analiza como sigue: se cuentan las fibras mielinizadas en forma circular (en un haz nervioso de al menos 150 fibras/animal). Se determina el diámetro del eje de los cilindros que corresponden al perímetro interno de las fibras mielinizadas y el perímetro externo de las mismas fibras. A continuación, comparamos la distribución del grosor de la mielina y el diámetro de los axones de los animales transgénicos y de tipo silvestre.

45 Además, medimos la densidad óptica del corte del mismo nervio para determinar si el contenido de fibras sin mielinizar (invisibles en los cortes con osmio y, por lo tanto, sin analizar) es mayor en los animales transgénicos (reflejado por un aspecto pálido global del corte del nervio).

Finalmente, todos los músculos del pie, presentes en el mismo corte que el utilizado para el análisis del nervio, se delimitan a mano para determinar la superficie muscular global. A continuación, calculamos la proporción «contenido

muscular/superficie del corte».

Los nervios ciáticos se escinden y se pesan, y también se usan para los ensayos bioquímicos y/o de biología molecular (RT-Q-PCR para el ARNm de PMP22 y el análisis de inmunotransferencia de tipo Western para las cuantificaciones de las proteínas de la mielina; kits de EIA de Cayman, para marcadores bioquímicos tales como metabolitos de ácido araquidónico, cuantificación por HPLC para corticoesteroides y aminas, ELISA para CNTF, IL-6, etc.) realizados de acuerdo con los protocolos utilizados de forma general y para los procedimientos analíticos (mediciones de la concentración de los fármacos).

Se toman muestras de los músculos de las extremidades traseras (sóleos), se pesan, se congelan instantáneamente y se conservan a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis (lo mismo que para los nervios ciáticos).

## 10 Resultados

El tiamazol (0,35 mg/kg de dosis diaria) y la pilocarpina (0,2 mg/kg de dosis diaria) administrados mediante alimentación forzada mejoran el comportamiento en la prueba de la barra durante el procedimiento de tratamiento (figura 3), mientras que el compuesto PXT25 (que se presenta aquí solo por motivos de comparación) apenas muestra ninguna mejora.

15 El comportamiento motor fue de media 3 veces menos exitoso en diferentes ratas TG con CMT tratadas con placebo en comparación con el grupo del tipo silvestre (WT, por su nombre en inglés). El tratamiento con tiamazol y pilocarpina permitió que los animales TG mejoraran en este experimento, y el efecto se hace estadísticamente significativo a tan solo 8 semanas de alimentación forzada. Los datos muestran que las ratas con CMT tratadas con tiamazol y pilocarpina en estas dosis relativamente altas tienen significativamente un mejor comportamiento en comparación con el grupo con placebo. El grupo tratado con el compuesto pilocarpina incluso recuperó el nivel de funcionamiento que no difiere significativamente del del grupo WT con placebo.

20 El PANS medido en la porción distal de la cola se encontró que disminuía significativamente en el grupo de TG con placebo, lo que puede reflejar la importante pérdida de axones que, a su vez, se debe a la desmielinización. Este parámetro electrofisiológico cambia para mejorar significativamente tras el tratamiento con el compuesto A (figura 4), mientras que el PANS para las ratas transgénicas tratadas con el compuesto B se acerca al umbral nominal del 5% para la significación.

25 Esta observación nos permite suponer que la acción del tiamazol puede impedir que se pierdan los axones, incluso si el estado de mielinización de los nervios periféricos no mejora de forma medible. El efecto de la pilocarpina parece ser esencialmente el mismo, incluso si, debido a la variabilidad intragrupal, la diferencia con el parámetro del grupo con placebo no logró alcanzar la significación estadística. En la CMT1A, la amplitud del potencial de acción de los nervios sensoriales (PANS) fue más reducida y la duración del PANS más prolongada que en la CMT2. La reducción del potencial de acción compuesto del músculo (PACM) y las amplitudes del PANS en la CMT1A es probablemente un efecto combinado de la desmielinización y la disfunción de los axones (Bienfait et al., 2006).

30 Al final del estudio se realizó un análisis morfométrico. La medición de los tejidos de las extremidades traseras revela que los nervios ciáticos y los músculos sóleos se reducen significativamente en las ratas hembra con CMT tratadas con placebo en comparación con las ratas WT de control (figura 5).

35 Estas deficiencias aparecen completamente corregidas cuando se tratan con el compuesto A: la masa absoluta de los músculos y de los nervios es incluso más alta que en las ratas WT de control, mientras que la masa corporal completa más bien disminuye en el grupo del compuesto A en comparación con el grupo con placebo (no se muestran los datos). El efecto del tratamiento con pilocarpina sobre el músculo de la extremidad posterior y los nervios aparece más pequeño que el del tiamazol.

La mezcla 1 (tabla 1) a dosis 50 veces más bajas de tiamazol (4 mkg/kg) y de pilocarpina (7 mkg/kg) mejora la puntuación de la marcha de las ratas hembra al cabo de 10 semanas de tratamiento con alimentación forzada según se muestra en la figura 6. Observamos una tendencia positiva al cabo de 6 semanas de tratamiento.

45 Las figuras siguientes ilustran el efecto positivo de la mezcla 2 (tabla 1) que contiene pilocarpina (7 mkg/kg); tiamazol (4 mkg/kg), mifepristona (40 mkg/kg), naltrexona (4 mkg/kg), baclofeno (60 mkg/kg) y sorbitol (2 mg/kg) en las ratas macho en 3 pruebas conductistas y electrofisiológicas diferentes.

La figura 7 revela que la mezcla 2 a estas dosis disminuye la subida del umbral de excitabilidad, encontrado en las ratas con CMT con placebo, después de una estimulación eléctrica del nervio caudal.

50 La figura 8 muestra el efecto positivo de la mezcla 2 sobre el comportamiento de los machos en la prueba de la barra; después de un tratamiento de 4 semanas, disminuye el número de caídas y aumenta el tiempo que pasan en el rodillo.

La figura ilustra el hecho de que la mezcla 2 mejora también el comportamiento de la marcha de las ratas macho tras 3 semanas de tratamiento; el porcentaje de las ratas que caminan con una marcha fluida se incrementa un 35% en las ratas tratadas en comparación con las ratas con CMT con placebo.

5 Se producen unos resultados similares para otras combinaciones y el resumen de los resultados se mostraría en la tabla 1.

Tabla 1

POS: reversión de los síntomas de la enfermedad *in vivo*

Efecto <i>in vivo</i>	POS	Mezcla 1	POS	Mezcla 2	POS	Mezcla 3	POS	Mezcla 4	POS	Mezcla 5	POS	Mezcla 6	POS	Mezcla 7	POS	Mezcla 8	POS	Mezcla 9	POS	Mezcla 10	POS	Mezcla 11	POS	Mezcla 12	POS	Mezcla 13	POS	Mezcla 14	POS	Mezcla 15	POS	Mezcla 16	POS	Mezcla 17	POS	Mezcla 18		
Combinación		Mezcla 1		Mezcla 2		Mezcla 3		Mezcla 4		Mezcla 5		Mezcla 6		Mezcla 7		Mezcla 8		Mezcla 9		Mezcla 10		Mezcla 11		Mezcla 12		Mezcla 13		Mezcla 14		Mezcla 15		Mezcla 16		Mezcla 17		Mezcla 18		
Mifepristona		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*
Pilocarpina	*	*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*
Tiamazol	*	*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*
Sorbitol		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*
Naltrexona		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*
Baclofeno		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*
Rapamicina										*																												*
Ketoprofeno												*																			*							
Flurbiprofeno														*																								
Cevimelina																*																						
Propiltiouracilo																		*																				

Estos datos muestran que, *in vivo*, las combinaciones y posologías de esta invención podrían permitir un tratamiento eficaz de la CMT.

### III. Efecto *in vivo* en un modelo de neuropatía tóxica

- 5 Los tratamientos o posologías farmacológicas se administran por vía oral desde el día antes de la primera inyección intraperitoneal de oxaliplatino (3 mg/kg) (D-1) hasta el día antes del último día de análisis (D16). Los animales que pertenecen al grupo tratado con oxaliplatino reciben una dosis diaria de agua destilada (10 ml/kg). Los animales reciben dosis del tratamiento analizado y agua destilada cada día durante la mañana, mientras que el oxaliplatino se administra por la tarde.
- 10 Durante los días de la prueba (a saber, D1, D4, D10), el tratamiento y el agua destilada se administran después de la prueba. En cuanto al día de la prueba (D4), incluidas las administraciones del vehículo y de los compuestos y la inyección de oxaliplatino, el tratamiento y el agua destilada se administran antes que la inyección de oxaliplatino después de la prueba. Los animales del grupo tratado de referencia se dosifican sólo durante los días de las pruebas (a saber, D1, D4, D10 y D17). La alodinia al frío se valora con la medición de las respuestas a la estimulación no nocirreceptora térmica (prueba de la acetona) el D1 (en torno a las 24 h después de la primera inyección de oxaliplatino a 3 mg/kg) (efecto agudo de oxaliplatino), el D4, el D10 y (efecto crónico del oxaliplatino) y el D17 (efecto residual del oxaliplatino una semana después completar el tratamiento).
- 15

Las pruebas se realizan con la prueba de la acetona 2 horas después de la administración de la referencia.

La sustancia de referencia es la gabapentina, 100 mg/kg, por vía oral (una vez al día x 4 días de ensayo).

#### 20 Prueba de la acetona

Se evalúa la alodinia al frío mediante la prueba de la acetona. En esta prueba, la latencia de la retirada de la pata trasera se mide después de la aplicación de una gota de acetona en la superficie plantar de ambas patas traseras (tiempo de reacción) y se puntúa la intensidad de la respuesta (puntuación de frío).

- 25 El tiempo de reacción para el efecto de enfriamiento de la acetona se mide en el plazo de 20 s (umbral de corte) después de la aplicación de la acetona. La respuesta a la acetona también se gradúa con la siguiente escala de 4 puntos: 0 (sin respuesta); 1 (retirada rápida, tirón de la pata); 2 (retirada prolongada o tirón marcado de la pata); 3 (tirón repetido de la pata con lametón o mordisco). Se realizaron seis ensayos por rata. Para cada grupo experimental, los resultados se expresan como la puntuación de frío acumulada que se define como la suma de 6 puntuaciones para cada rata junto con  $\pm$  E.E.M. La puntuación mínima es 0 (ninguna respuesta en ninguno de los 6 intentos) y la puntuación máxima posible es 18 (tirón repetido y lametón o mordisco de la pata en cada uno de los seis ensayos). Fuente de gabapentina: Zhejiang Chiral Medicine Chemicals, China. Fuente de oxaliplatino: Sigma, Francia.
- 30

#### Resultados

- 35 Los resultados de la prueba de la mezcla 2 en oxaliplatino se muestran en la figura 10. Es evidente que la mezcla 2 protege a los animales de la neuropatía inducida por el tratamiento con el fármaco tóxico.

### IV. Efecto *in vivo* en un modelo de ELA

#### Modelo animal

- 40 Hemos elegido el modelo de rata SOD1<sup>G93A</sup> (generado en Howland D. S. et al, 2002) para imitar la enfermedad de la esclerosis lateral amiotrófica. En este modelo se sobreexpresa el gen SOD1 mutado en la médula espinal, en muchas regiones del cerebro, así como en los tejidos periféricos (Howland D. S. et al, 2002). El comienzo de la enfermedad de las motoneuronas de este modelo está a aproximadamente los 115 días (Howland D. S. et al., 2002); aparece como una marcha anormal de las extremidades posteriores. En pocos días, surge parálisis de la extremidad posterior.

#### Procedimientos experimentales

- 45 Obtuvimos colonias cruzando las ratas SOD1<sup>G93A</sup> reproductoras con ratas hembra Sprague Dawley. Se identificaron las ratas SOD1<sup>G93A</sup> heterocigotas con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el ADN de la cola y cebadores específicos para la hSOD1 (Howland D. S. et al., 2002). Los animales se mantuvieron en una habitación con iluminación (con luz durante 0500-1900 h) y temperatura ( $23 \pm 1$  °C) controladas, y se les dio acceso sin restricciones a la comida y al agua. Todos los procedimientos con los animales en el presente estudio se realizaron de acuerdo con las directrices estándares del cuidado animal.
- 50

La medición de la masa corporal se realizó cada semana y las pruebas conductistas comenzaron a la edad de 60 días y continuaron hasta el punto final. Los tratamientos se administraron cada día por vía oral o subcutánea a partir de la edad de 5 semanas.

Prueba de observación: caracterización del aspecto general

- 5 Se observó cada rata en una nueva jaula de ratas (dimensiones: 55 x 33 x 18 cm) sin camada durante cinco minutos. Se registraron 5 parámetros diferentes:

La marcha

- puntuación 0 : marcha normal (fluida)
  - puntuación 1: marcha anormal (sin fluidez o la rata tiene una ligera cojera)
- 10
- puntuación 2: incapacidad moderada (la rata arrastra una pata y puede ponerla derecha y caminar)
  - puntuación 3: incapacidad intensa (la rata arrastra una o las dos patas traseras, pero es incapaz de ponerla o ponerlas rectas)

El aspecto del pelaje

- puntuación 0: pelaje limpio y sedoso.
- 15
- puntuación 1: piloerección o pelaje sucio.

El temblor

- puntuación 0: sin temblor.
- puntuación 1: con temblor

Posición corporal

- 20
- puntuación 0: normal
  - puntuación 1: anormal (aplanada o con la espalda arqueada)

La posición de las patas traseras

- puntuación 0: normal
- puntuación 1: patas traseras extendidas.

- 25 Prueba de la puntuación motora: caracterización del déficit motor

Esta prueba evalúa la capacidad de las ratas para enderezarse en menos de 30 s después de volverlas sobre cualquier costado (reflejo de enderezamiento) (Gale K. et al., 1985).

Se utilizó un sistema de puntuación no paramétrico que sigue estos criterios (Matsumoto A. et al., 2006; Thonhoff J. R. et al., 2007);

- 30
- puntuación 0: la rata no puede enderezarse por sí sola desde cualquier costado en menos de 30 s;
  - puntuación 1: la rata no puede enderezarse por sí sola desde un costado en menos de 30 s;
  - puntuación 2: la rata puede enderezarse por sí sola desde ambos costados en menos de 30 s, pero no puede permanecer en pie en la jaula; siempre está arrastrando alguna parte del cuerpo;
- 35
- puntuación 3: la rata puede enderezarse por sí sola desde ambos costados en menos de 30 s, no puede permanecer en pie en la caja, pero no arrastra ninguna parte del cuerpo;
  - puntuación 4: la rata puede enderezarse por sí sola desde ambos costados en menos de 30 s, puede permanecer en pie en la jaula, pero tiene deficiencias funcionales visibles;
  - puntuación 5: la rata puede enderezarse por sí sola desde ambos costados en menos de 30 s, puede permanecer en pie en la jaula y no tiene deficiencias funcionales visibles.

El criterio de valoración de la enfermedad se fija en la puntuación 0; a continuación, se sacrifica la rata.

Prueba del plano inclinado: caracterización de la deficiencia motora

5 El aparato deslizante tenía un plano de plexiglás de 30 x 50 cm que podría inclinarse en un ángulo de 0 °C (horizontal) a 60 °C. Cada rata se colocó inicialmente en un plano inclinado con un ángulo de 25° en la posición con la cabeza hacia arriba (orientación cabeza arriba); se realizan dos intentos independientes durante 1 min. Al cabo de 30 min se realiza el mismo experimento en un plano inclinado con un ángulo de 35°, y a continuación en un plano inclinado con un ángulo de 40°. Durante este tiempo, la rata se devolvió a su jaula. El plano se limpia después de cada intento.

El cumplimiento de las ratas se evalúa mediante 4 puntuaciones diferentes:

- 10
- Puntuación 0: no resbala.
  - Puntuación 1: resbala un poco (una o dos patas).
  - Puntuación 2: resbala moderadamente (las 4 patas), pero no hasta el final del plano.
  - Puntuación 3: la rata se resbala hasta final del plano.

La prueba de la malla de alambre: caracterización de la capacidad motora en una situación difícil

15 Se pone en contacto una malla de alambre con una caja en la parte superior (en un ángulo de 70°) y el borde de una mesa en el fondo (Thonhoff J. R. et al., 2007). Cada rata se coloca en el fondo de la malla de alambre y se le hace subir al colocarle su camada en la caja de la parte superior. Cada rata se entrenó una vez a la semana (3 intentos).

El parámetro que se anotó fue el tiempo de latencia para alcanzar la parte superior de la malla de alambre.

La prueba a campo abierto: caracterización de la actividad locomotora

20 La actividad locomotora se mide en una caja de plexiglás (45 x 45 x 30 cm, Anti-Track de BIOSEB, Lyon, Francia) con haces de 16 fotocélulas que siguen los dos ejes, 1 y 5 cm por encima del suelo.

La actividad espontánea y exploradora de cada rata se evaluó durante 3 horas.

Se recogen 4 parámetros (la distancia total viajada, el número de empinamientos sobre las patas traseras, el porcentaje de la distancia viajada y el tiempo que pasa en el centro del campo abierto).

25

**Bibliografía**

Amici SA, Dunn WA Jr, Murphy AJ, Adams NC, Gale NW, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Notterpek L. Peripheral myelin protein 22 is in complex with alpha6beta4 integrin, and its absence alters the Schwann cell basal lamina. *J Neurosci.* 2006; 26(4):1179-1189.

Amici SA, Dunn WA Jr, Notterpek L. Developmental abnormalities in the nerves of peripheral myelin protein 22-deficient mice. *J Neur Res.* 2007; 85(2):238-249.

Anger T, Klintworth N, Stumpf C, Daniel WG, Mende U, Garlich CD. RGS protein specificity towards Gq- and Gi/o-mediated ERK 1/2 and Akt activation in vitro. *J Biochem Mol Biol.* 2007; 40(6):899-910.

Atanasoski S, Scherer SS, Nave K-A, Suter U. Proliferation of Schwann Cells and Regulation of Cyclin D1 Expression in an Animal Model of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A. *J Neurosci Res.* 2002; 67(4):443-449.

Bassi S, et al., Encephalo myelitis with thyro toxicosis. *J Neur.* 1978; 218(4): 293-296.

Batty IH, Fleming IN, Downes CP. Muscarinic-receptor-mediated inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor-stimulated phosphoinositide 3-kinase signalling in 1321N1 astrocytoma cells. *Biochem J.* 2004; 379(Pt 3):641-651.

Bienfait HM, Verhamme C, van Schaik IN, Koelman JH, de Visser BW, de Haan RJ, Baas F, van Engelen BG, de Visser M. Comparison of CMT1A and CMT2: similarities and differences. *J. Neurol.* 2006 Dec; 253(12):1572-80.

Brancolini C, Marzinotto S, Edomi P, Agostoni E, Fiorentini C, Müller HW, Schneider C. Rho-dependent regulation of cell spreading by the tetraspan membrane protein Gas3/PMP22. *Mol. Biol. Cell.* 1999; 10: 2441-2459.

Castellone MD, Teramoto H, Gutkind JS. Cyclooxygenase-2 and Colorectal Cancer Chemoprevention: The B-Catenin Connection. *Cancer Res.* 2006; 66(23):11085-11088.

Chies R, Nobbio L, Edomi P, Schenone A, Schneider C, Brancolini C. Alterations in the Arf6-regulated plasma membrane endosomal recycling pathway in cells overexpressing the tetraspan protein Gas3/PMP22. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 6): 987-999.

Cosgaya J. M., Chan J. R., Shooter E. M. 2002. The Neurotrophin Receptor p75NTR as a Positive Modulator of Myelination *Science* 298; 1245-1248.

Devaux JJ, Scherer SS. Altered ion channels in an animal model of Charcot-Marie-Tooth disease type IA. *J Neurosci*. 2005; 25(6): 1470-1480.

D'Urso D, Ehrhardt P, Müller HW. PMP 22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. *J Neurosci*. 1999; 19(9):3396-3403.

Fortun J, Dunn WA Jr, Joy S, Li J, Notterpek L. Emerging role for autophagy in the removal of aggregates in Schwann cells. *J Neurosci*. 2003; 23(33): 10672-10680.

Fortun J, Go JC, Li J, Amici SA, Dunn WA Jr, Notterpek L. Alterations in degradative pathways and protein aggregation in a neuropathy model based on PMP22 overexpression. *Neurobiol Dis*. 2006; 22(1):153-164.

Fortun J, Verrier JD, Go JC, Madorsky I, Dunn WA, Notterpek L. The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of cytoplasmic chaperones. *Neur.Dis*. 2007; 25(2): 252-265.

Keltner J. et al. Myotonic pupils in Charcot-Marie-Tooth disease. *Archives of ophthalmology*, 1975; 93(11):1141-1148.

Khajavi M, Shiga K, Wiszniewski W, He F, Shaw CA, Yan J, Wensel TG, Snipes GJ, Lupski JR. Oral curcumin mitigates the clinical and neuropathologic phenotype of the Trembler-J mouse: a potential therapy for inherited neuropathy. *Am J Hum Genet*. 2007; 81(3): 438-453.

King TD, Song L, Jope RS. AMP-activated protein kinase (AMPK) activating agents cause dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase-3. *Biochem Pharmacol*. 2006; 71(11):1637-1647.

Lupski JR, Wise CA, Kuwano A, Pentao L, Parke JT, Glaze DG, Ledbetter DH, Greenberg F, Patel PI. Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type IA. *Nat Genet*. 1992 ;1(1): 29-33.

Ma W, Li BS, Zhang L, Pant HC. Signaling cascades implicated in muscarinic regulation of proliferation of neural stem and progenitor cells. *Drug News Perspect*. 2004; 17(4):258-266.

Meyer Zu Horste G., Nave K-A. Animal models of inherited neuropathies. *Curr. Opin. Neurol*. 2006; 19(5): 464-473.

Meyer zu Horste G, Prukop T, Liebetanz D, Mobius W, Nave KA, Sereda MW. Antiprogestosterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Ann Neurol*. 2007; 61 (1): 61-72.

Nave KA, Sereda MW, Ehrenreich H. Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007; 3(8): 453-464.

Niemann S, Sereda MW, Rossner M, Stewart H, Suter U, Meinck HM, Griffiths I.R., Nave K-A. The "CMT rat": peripheral neuropathy and dysmyelination caused by transgenic overexpression of PMP22. *Ann. N.- Y. Acad. Sci.* 1999; 883:254-261.

Notterpek L, Shooter EM, Snipes GJ. Upregulation of the endosomal-lysosomal pathway in the trembler-J neuropathy. *J Neurosci*. 1997;17(11): 4190-4200.

Ogata T, Iijima S, Hoshikawa S, Miura T, Yamamoto S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Opposing extracellular signal-regulated kinase and Akt pathways control Schwann cell myelination. *J Neurosci*. 2004; 24(30):6724-6732.

Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontes M. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of CMT disease. *Nature Med*. 2004; 10(4): 396-401.

Perea J, Robertson A, Tolmachova T, Muddle J, King RH, Ponsford S, Thomas PK, Huxley C. Induced myelination and demyelination in a conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Hum Mol Genet*. 2001; 10(10):1007-1018.

Rangaraju S., Madorsky I., Go Pileggi J., Kamal A., Notterpek L. 2008. Pharmacological induction of the heat shock response improves myelination in a neuropathic model *Neurobiology of Disease* 32; 105–115.

Roa BB, et al.. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med*. 1993; 329(2): 96-101.

Robaglia-Schlupp A, Pizant J, Norreel JC, Passage E, Saberan-Djoneidi D, Ansaldi JL, Vinay L, Figarella-Branger D, Levy N, Clarac F, Cau P, Pellissier JF, Fontes M. PMP22 overexpression causes dysmyelination in mice. *Brain* 2002; 125(Pt 10): 2213-2221.

Sancho S, Young P, Suter U. Regulation of Schwann cell proliferation and apoptosis in PMP22-deficient mice and mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 2001; 124(Pt 11): 2177-2187.

Sereda M. et al. A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron*. 1996;16(5):1049-60.

Sereda MW, Meyer zu Horste G, Suter U, et al. Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med* 2003; 9: 1533–1537.

Sereda MW, Nave KA. Animal models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A). *Neuromol Med* 2006; 8: 205–215.

Suter U, Scherer SS. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4: 714-726.

Suter U, Welcher AA, Ozcelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U, Billings-Gagliardi S, Sidman RL, Shooter EM. Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature.* 1992; 356(6366): 241-244.

Tashiro H, Fukuda Y, Hoshino S, Furukawa M, Shintaku S, Ohdan H, Dohi K. Assessment of microchimerism following rat liver transplantation. *Transplant Proc.* 1996 Jun;28(3):1279-80

Thomas PK, Marques W Jr, Davis MB, Sweeney MG, King RH, Bradley JL, Muddle JR, Tyson J, Malcolm S, Harding AE. The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain* 1997; 120 ( Pt 3): 465-478.

Tobler AR, Liu N, Mueller L, Shooter EM. Differential aggregation of the Trembler and Trembler J mutants of peripheral myelin protein 22. *PNAS U S A.* 2002; 99(1):483-488.

Ulzheimer JC, Peles E, Levinson SR, Martini R. Altered expression of ion channel isoforms at the node of Ranvier in P0-deficient myelin mutants. *Mol Cell Neurosci.* 2004; 25(1): 83-94.

Vallat JM, Sindou P, Preux PM, Tabaraud F, Milor AM, Couratier P, LeGuern E, Brice A. Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann Neurol.* 1996; 39(6): 813-817.

Zelman SJ, Rapp NS, Zenser TV, Mattammal MB, Davis BB. Antithyroid drugs interact with renal medullary prostaglandin H synthase. *J Lab Clin Med.* 1984; 104(2):185-192.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Pharnext  
<120> Combinaciones de fármacos de molécula pequeña para tratar CMT y trastornos relacionados
- 10 <130> B738PC00  
<160> 16  
<170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1  
<211> 1816  
<212> DNA  
<213> Rattus norvegicus
- 20 <220>  
<221> CDS  
<222> (208)..(690)
- <400> 1

ES 2 460 617 T3

gagttacagg gagctccacc agagaacatc tcagggagcc tggctggaag cagcagagct	60
ccgagtctgg tctgctgtga gcatccgctg tcttgcgggg agggctccca tccttggtc	120
tcgattgcaa agaaatccaa gcggaggaag ggcgtacacc attggtctgg cacgctccac	180
cgagccccgag cccaactccc agccacc atg ctt cta ctc ttg ttg ggg atc ctg	234
Met Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ile Leu	
1 5	
ttc ctt cac atc gcg gtg cta gtg ttg ctc ttc gtc tcc acc atc gtc	282
Phe Leu His Ile Ala Val Leu Val Leu Leu Phe Val Ser Thr Ile Val	
10 15 20 25	
agc caa tgg ctc gag ggc aat gga cac agg act gat ctc tgg cag aac	330
Ser Gln Trp Leu Glu Gly Asn Gly His Arg Thr Asp Leu Trp Gln Asn	
30 35 40	
tgt acc aca tcc gcc ttg gga gcc gtc cag cac tgc tac tcc tca tct	378
Cys Thr Thr Ser Ala Leu Gly Ala Val Gln His Cys Tyr Ser Ser Ser	
45 50 55	
gtg agc gaa tgg ctt cag tct gtc cag gcc acc atg atc ctg tct gtc	426
Val Ser Glu Trp Leu Gln Ser Val Gln Ala Thr Met Ile Leu Ser Val	
60 65 70	
atc ttc agc gtc ctg tcc ctg ttc ctg ttc ttc tgc cag ctc ttc act	474
Ile Phe Ser Val Leu Ser Leu Phe Leu Phe Phe Cys Gln Leu Phe Thr	
75 80 85	
ctc acc aaa ggc ggc cgc ttt tac atc act gga gtc ttc caa atc ctt	522
Leu Thr Lys Gly Gly Arg Phe Tyr Ile Thr Gly Val Phe Gln Ile Leu	
90 95 100 105	
gct ggt ctg tgt gtg atg agt gca gcg gcc atc tac aca gtg aga cac	570
Ala Gly Leu Cys Val Met Ser Ala Ala Ala Ile Tyr Thr Val Arg His	
110 115 120	
agt gag tgg cat gtc aac aac gac tac tcc tat ggc ttt gct tac atc	618
Ser Glu Trp His Val Asn Asn Asp Tyr Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Ile	
125 130 135	
ctg gcc tgg gtg gct ttc ccg ctg gcc ctc ctt agt ggc atc atc tac	666
Leu Ala Trp Val Ala Phe Pro Leu Ala Leu Leu Ser Gly Ile Ile Tyr	
140 145 150	

ES 2 460 617 T3

```

gtg atc ctg cgg aaa cgc gaa tga ggcgcccgcac gcaccatccg tctaggctct      720
Val Ile Leu Arg Lys Arg Glu
    155                               160

gagcgtgcat agggtagaca gggagggagg aaggaaacca gaaaaccaa ccaaccaacc      780
caaaagagct agccccaaa cccaaacgca agccaaacca aacagaacac agttgagtgg      840
ggattgctgt cgattgaaga tgtatataat atctatggtt tataaaacct atttataaca      900
ctttttacat acatgtacat aggattgttt gctttttatg ttgaccgtca gcctcgtggt      960
gaatcttaaa cgactctaca tcctaacact ataaccaagc tcagtatttt cgttttgttt     1020
cgtttttttc atctttttgt tttgctcaga cataaaaaaa aaaaaatcca cgtggccccc     1080
tttcatctga aagcagatcc ctcctccca ttcaacctca taggataacc aaagtgcggg      1140
gacaaacccc agatggccag aggttcacac tatgggtgac ccagtgaatt tagcaggaat     1200
aatccgctgc ccgaatcaat gtgtgaagcc ctaagcactc acagacgaaa cgccctgacc     1260
agagccctct gcgaaaccaa tagctggtgg ctgcggaaca cttgaccctg aaggcggagt     1320
actggggcca catgttttaa tgagacgtca gagacaagca atctgtgaaa tgggtgctata     1380
gatttaccat tccttgttat tactaatcat ttaaaccact cactggaaac tcaattaaca     1440
gttttatgac ctacagcaga acagagaccg gatacaaacg gttcgtaact gctttcgtac     1500
atagctaggc tgttggttatt actacaataa ataaatctca aagccttcgt cactcccaca     1560
gttttctcac ggtcggagca tcaggacgag cgtctagacc cttgggacta gcaaattccc     1620
tggctttctg ggtctagagt gttctgtgcc tccaaggact gtctagcgat gacttgtatt     1680
ggccaccaac tgtagatgta tatacgggtgt ctttctgatg ctaagactcc agacctttct     1740
tggttttgct tgctttttct gattttatac caactgtgtg gactaagatg cattaataa     1800
aacatcagag taactc

```

```

<210> 2
<211> 160
5 <212> PRT
  <213> Rattus norvegicus

<400> 2

```

ES 2 460 617 T3

Met Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ile Leu Phe Leu His Ile Ala Val Leu  
 1 5 10 15

Val Leu Leu Phe Val Ser Thr Ile Val Ser Gln Trp Leu Glu Gly Asn  
 20 25 30

Gly His Arg Thr Asp Leu Trp Gln Asn Cys Thr Thr Ser Ala Leu Gly  
 35 40 45

Ala Val Gln His Cys Tyr Ser Ser Ser Val Ser Glu Trp Leu Gln Ser  
 50 55 60

Val Gln Ala Thr Met Ile Leu Ser Val Ile Phe Ser Val Leu Ser Leu  
 65 70 75 80

Phe Leu Phe Phe Cys Gln Leu Phe Thr Leu Thr Lys Gly Gly Arg Phe  
 85 90 95

Tyr Ile Thr Gly Val Phe Gln Ile Leu Ala Gly Leu Cys Val Met Ser  
 100 105 110

Ala Ala Ala Ile Tyr Thr Val Arg His Ser Glu Trp His Val Asn Asn  
 115 120 125

Asp Tyr Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Ile Leu Ala Trp Val Ala Phe Pro  
 130 135 140

Leu Ala Leu Leu Ser Gly Ile Ile Tyr Val Ile Leu Arg Lys Arg Glu  
 145 150 155 160

5 <210> 3  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador directo\_PMP22 de rata  
 <400> 3

15 gaaacgcga atgaggc 17

<210> 4  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador inverso\_PMP22 de rata

25 <400> 4  
 gttctgttg gtttgctt 19

<210> 5  
 32

ES 2 460 617 T3

<211> 690  
 <212> DNA  
 <213> Rattus norvegicus

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (15)..(626)

<400> 5

	ggcggctgcc	gaag	atg	gcg	gag	ggg	cag	gtt	cta	gta	ttg	gat	ggc	cgg		50	
			Met	Ala	Glu	Gly	Gln	Val	Leu	Val	Leu	Asp	Gly	Arg			
			1			5					10						
	ggc	cat	ctt	ctg	ggc	cgc	ctg	gcg	gcc	att	gtg	gcc	aag	cag	gta	ctg	98
	Gly	His	Leu	Leu	Gly	Arg	Leu	Ala	Ala	Ile	Val	Ala	Lys	Gln	Val	Leu	
			15				20						25				
	ctg	ggc	cga	aag	gtg	gtg	gtt	gta	cgc	tgt	gag	ggc	atc	aac	att	tct	146
	Leu	Gly	Arg	Lys	Val	Val	Val	Val	Arg	Cys	Glu	Gly	Ile	Asn	Ile	Ser	
		30				35					40						
	gga	aat	ttc	tac	aga	aac	aag	tta	aag	tat	ctg	gcc	ttt	ctc	cga	aag	194
	Gly	Asn	Phe	Tyr	Arg	Asn	Lys	Leu	Lys	Tyr	Leu	Ala	Phe	Leu	Arg	Lys	
10	45					50				55						60	
	cgg	atg	aac	acc	aac	ccg	tct	cga	ggc	ccc	tac	cac	ttc	cga	gcc	cca	242
	Arg	Met	Asn	Thr	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Pro	Tyr	His	Phe	Arg	Ala	Pro	
					65					70					75		
	agc	cgc	att	ttt	tgg	cgc	act	gtg	cga	ggc	atg	ctg	ccg	cac	aag	acc	290
	Ser	Arg	Ile	Phe	Trp	Arg	Thr	Val	Arg	Gly	Met	Leu	Pro	His	Lys	Thr	
				80					85					90			
	aaa	aga	ggc	cag	gct	gcc	ctg	gaa	cgc	ctc	aag	gtg	ttg	gat	ggg	atc	338
	Lys	Arg	Gly	Gln	Ala	Ala	Leu	Glu	Arg	Leu	Lys	Val	Leu	Asp	Gly	Ile	
			95					100					105				
	cct	cca	ccc	tat	gac	aag	aaa	aag	cgg	atg	gtg	gtc	cct	gct	gcc	ctc	386
	Pro	Pro	Pro	Tyr	Asp	Lys	Lys	Lys	Arg	Met	Val	Val	Pro	Ala	Ala	Leu	
		110					115					120					
	aag	ggt	gtg	cgg	ctg	aag	cct	acc	aga	aag	ttt	gct	tac	ctg	ggg	cg	434
	Lys	Val	Val	Arg	Leu	Lys	Pro	Thr	Arg	Lys	Phe	Ala	Tyr	Leu	Gly	Arg	
						130					135					140	
	ctg	gct	cat	gag	gtc	ggg	tgg	aag	tac	cag	gca	gtg	aca	gct	act	ctg	482
	Leu	Ala	His	Glu	Val	Gly	Trp	Lys	Tyr	Gln	Ala	Val	Thr	Ala	Thr	Leu	
					145					150					155		
	gag	gag	aaa	cgg	aag	gaa	aag	gca	aag	atc	cat	tac	cgg	aag	aag	aag	530
	Glu	Glu	Lys	Arg	Lys	Glu	Lys	Ala	Lys	Ile	His	Tyr	Arg	Lys	Lys	Lys	
				160				165						170			
	cag	ctc	ttg	agg	cta	agg	aaa	cag	gca	gaa	aag	aat	gtg	gag	aag	aaa	578
	Gln	Leu	Leu	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Asn	Val	Glu	Lys	Lys	
			175					180					185				
	atc	tgc	aag	ttc	aca	gag	gtc	ctc	aag	acc	aat	gga	ctc	ttg	gtg	tga	626
	Ile	Cys	Lys	Phe	Thr	Glu	Val	Leu	Lys	Thr	Asn	Gly	Leu	Leu	Val		
		190					195					200					
	accaataaaa	gactgtttgt	gcctcaaaaa	aaaaaaaaaa	686												
	aaaa																690

<210> 6  
 15 <211> 203

ES 2 460 617 T3

<212> PRT  
<213> Rattus norvegicus

<400> 6

Met Ala Glu Gly Gln Val Leu Val Leu Asp Gly Arg Gly His Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Arg Leu Ala Ala Ile Val Ala Lys Gln Val Leu Leu Gly Arg Lys  
20 25 30

Val Val Val Val Arg Cys Glu Gly Ile Asn Ile Ser Gly Asn Phe Tyr  
35 40 45

Arg Asn Lys Leu Lys Tyr Leu Ala Phe Leu Arg Lys Arg Met Asn Thr  
50 55 60

Asn Pro Ser Arg Gly Pro Tyr His Phe Arg Ala Pro Ser Arg Ile Phe  
65 70 75 80

5 Trp Arg Thr Val Arg Gly Met Leu Pro His Lys Thr Lys Arg Gly Gln  
85 90 95

Ala Ala Leu Glu Arg Leu Lys Val Leu Asp Gly Ile Pro Pro Pro Tyr  
100 105 110

Asp Lys Lys Lys Arg Met Val Val Pro Ala Ala Leu Lys Val Val Arg  
115 120 125

Leu Lys Pro Thr Arg Lys Phe Ala Tyr Leu Gly Arg Leu Ala His Glu  
130 135 140

Val Gly Trp Lys Tyr Gln Ala Val Thr Ala Thr Leu Glu Glu Lys Arg  
145 150 155 160

Lys Glu Lys Ala Lys Ile His Tyr Arg Lys Lys Lys Gln Leu Leu Arg  
165 170 175

Leu Arg Lys Gln Ala Glu Lys Asn Val Glu Lys Lys Ile Cys Lys Phe  
180 185 190

Thr Glu Val Leu Lys Thr Asn Gly Leu Leu Val  
195 200

<210> 7

10 <211> 17

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cebador directo\_RPL13A

ES 2 460 617 T3

<400> 7  
 ctgccctcaa ggttggtg 17  
  
 <210> 8  
 5 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 10 <223> Cebador inverso\_RPL13A  
  
 <400> 8  
 cttctcttc cgtaatgga t 21  
  
 15 <210> 9  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> sonda FRET\_Pmp22\_marcada con fluoresceína  
  
 <400> 9  
 25 gctctgagcg tgcatagggt ac 22  
 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> sonda FRET\_Rpl13A\_marcada con fluoresceína  
  
 <400> 10  
 35 tcgggtggaa gtaccagcc 19  
  
 <210> 11  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> sonda FRET\_Pmp22\_marcada con rodamina  
  
 <400> 11  
 45 agggaggag gaaggaaacc agaaa 25  
  
 <210> 12  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 50 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> sonda FRET\_Rpl13A\_marcada con rodamina  
  
 55 <400> 12  
 tgacagctac tctggaggag aaacggaa 28  
  
 <210> 13  
 <211> 19  
 60 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>

<223> Cebador 1\_especifico para Sry

400> 13  
 gagagaggca caagttggc 19

5 <210> 14  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador 2\_especifico para Sry

15 <400> 14  
 gcctcctgga aaaagggcc 19

20 <210> 15  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador directo \_transgén PMP22

25 <400> 15  
 gacaaacccc agacagttg 19

30 <210> 16  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Cebador inverso\_ transgén PMP22

<400> 16  
 ccagaaagcc aggaactc 19

40

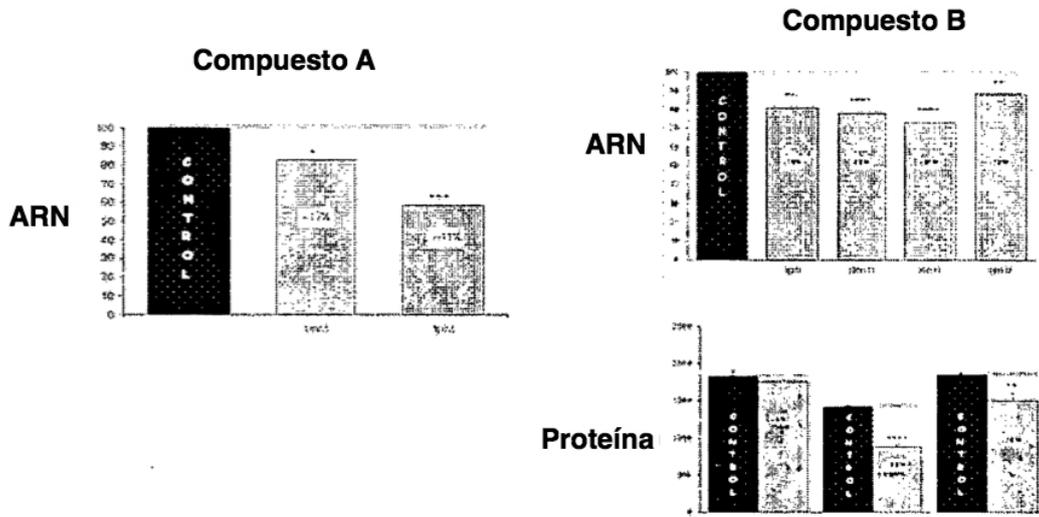
**REIVINDICACIONES**

1. Composición que comprende un agonista del receptor muscarínico seleccionado del grupo que consiste en pilocarpina, cevimelina, carbacol, metacolina y betanecol, o una sal de los mismos y un inhibidor de la síntesis de las hormonas tiroideas seleccionado del grupo que consiste en tiamazol, carbimazol, propiltiouracilo y amiodarona, o una sal de los mismos, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agonista del receptor muscarínico es pilocarpina.
3. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor de la síntesis de las hormonas tiroideas es tiamazol o carbimazol.
4. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende pilocarpina y tiamazol, o pilocarpina y carbimazol, o sales de los mismos y, opcionalmente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
5. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para ser usada en el tratamiento de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth o de un trastorno relacionado con la CMT.
6. Composición para ser usada en el tratamiento de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es CMT1A.
7. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende al menos un compuesto activo adicional.
8. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho al menos un compuesto activo adicional se selecciona de baclofeno, mifepristona, sorbitol, naltrexona, rapamicina, ketoprofeno y flurbiprofeno.
9. Composición de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde dicho al menos un compuesto adicional es baclofeno o mifepristona.
10. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende tiamazol, pilocarpina, baclofeno, mifepristona y sorbitol.
11. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende tiamazol, pilocarpina, baclofeno, mifepristona, sorbitol y naltrexona.
12. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende alguna de las siguientes combinaciones:
  - pilocarpina, tiamazol, mifepristona y sorbitol;
  - pilocarpina, tiamazol, mifepristona, sorbitol y rapamicina;
  - pilocarpina, tiamazol, mifepristona, sorbitol y ketoprofeno;
  - pilocarpina, tiamazol, mifepristona, sorbitol y flurbiprofeno;
  - tiamazol y cevimelina;
  - pilocarpina y propiltiouracilo;
  - pilocarpina, tiamazol y baclofeno;
  - pilocarpina, tiamazol y mifepristona;
  - pilocarpina, tiamazol y sorbitol;
  - pilocarpina, tiamazol y naltrexona;
  - pilocarpina, tiamazol y rapamicina;
  - pilocarpina, tiamazol y ketoprofeno;
  - pilocarpina, tiamazol y flurbiprofeno;
  - pilocarpina, tiamazol, mifepristona, sorbitol, baclofeno y rapamicina; o

– pilocarpina, tiamazol, mifepristona, sorbitol, naltrexona y rapamicina.

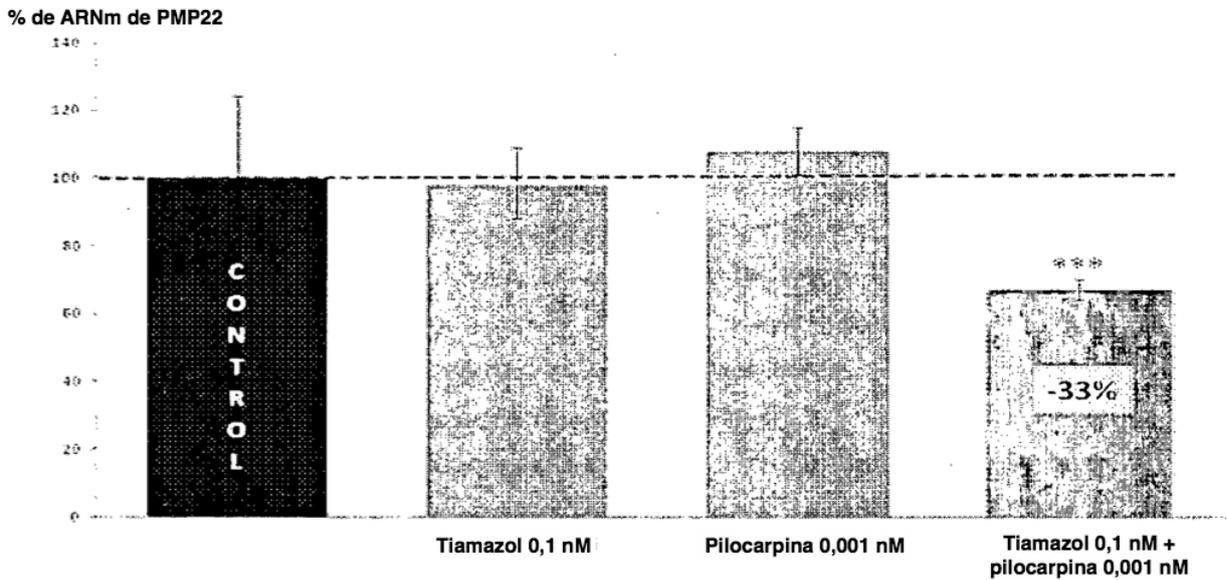
13. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde los compuestos se combinan para una administración agrupada o por separado, de forma simultánea o secuencial.

5 14. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el tratamiento además comprende una etapa de determinación de si el paciente tiene CMT1A.

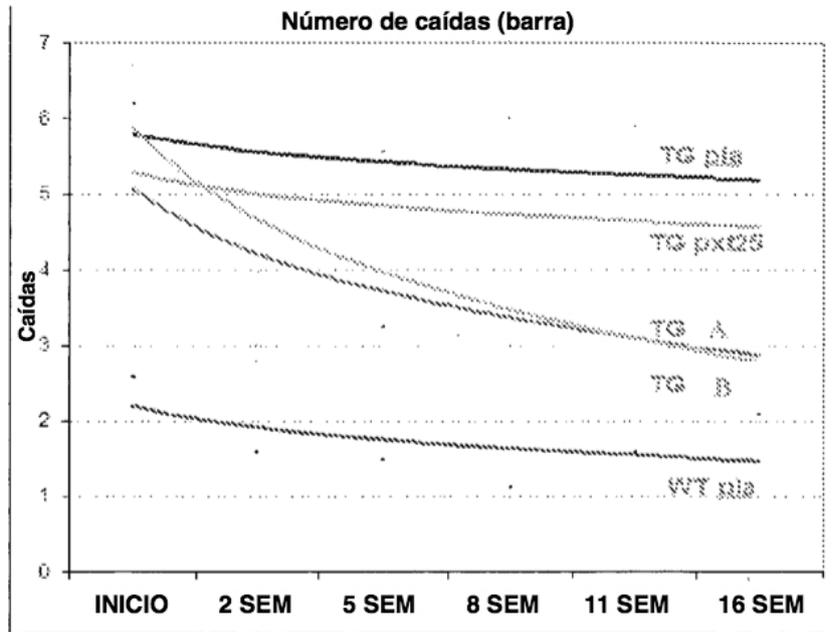


\*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ ; significativamente diferente del control (prueba de la *t* de Student para datos emparejados)

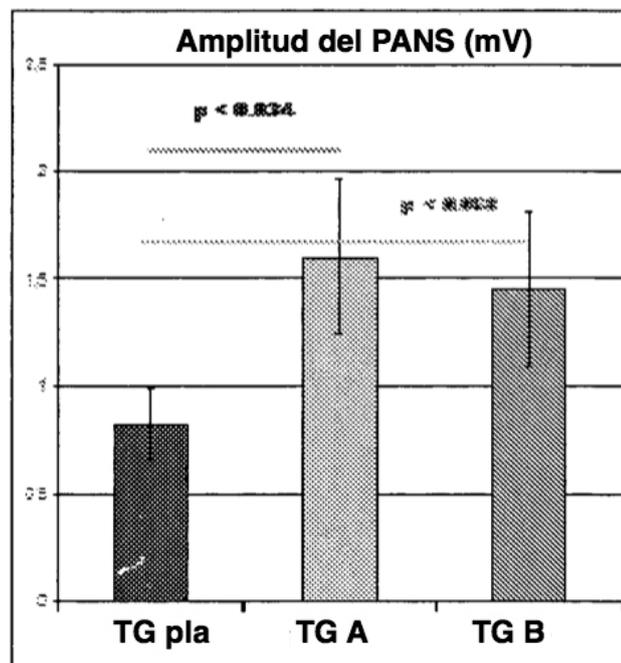
**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**

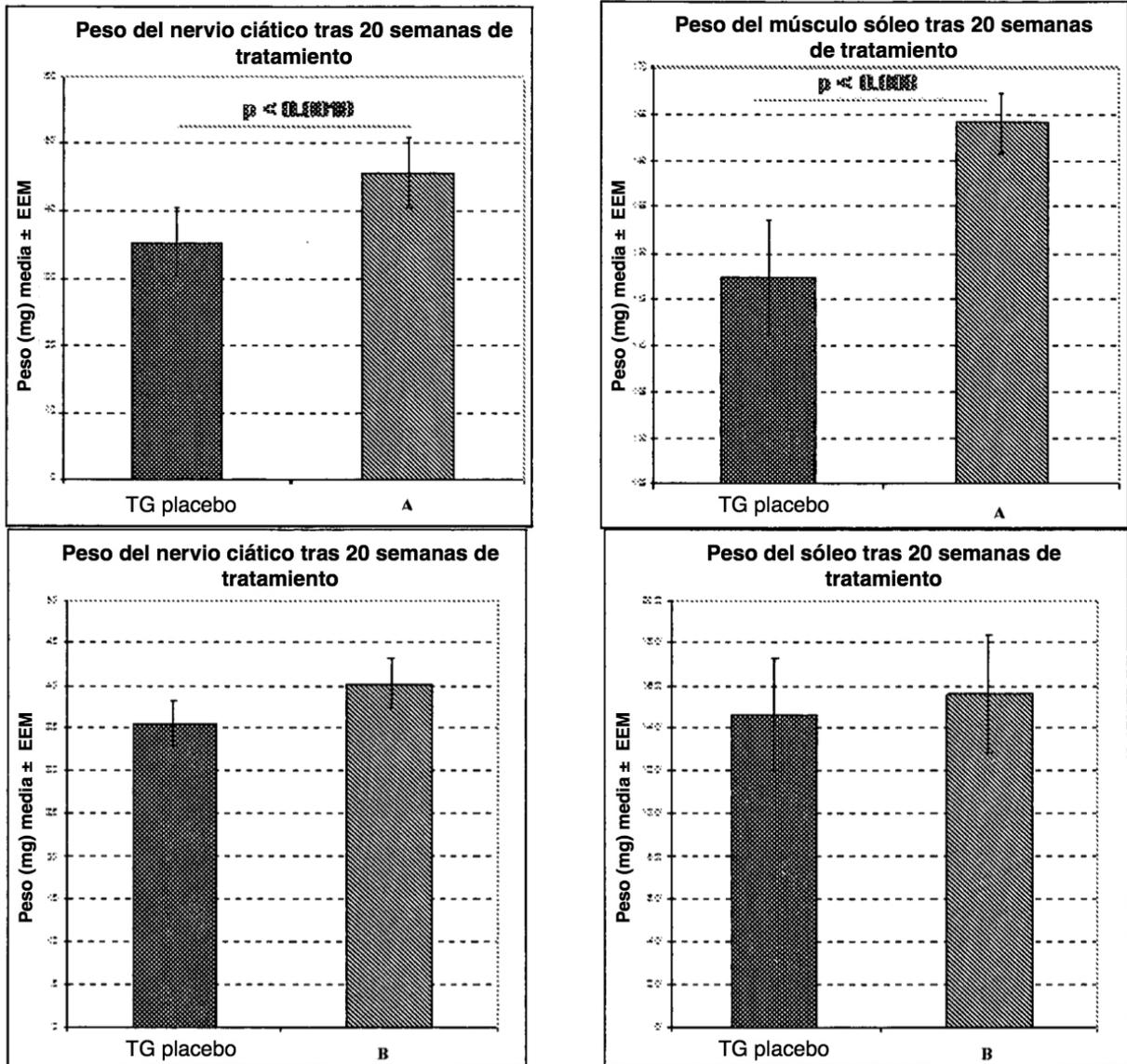


FIGURA 5

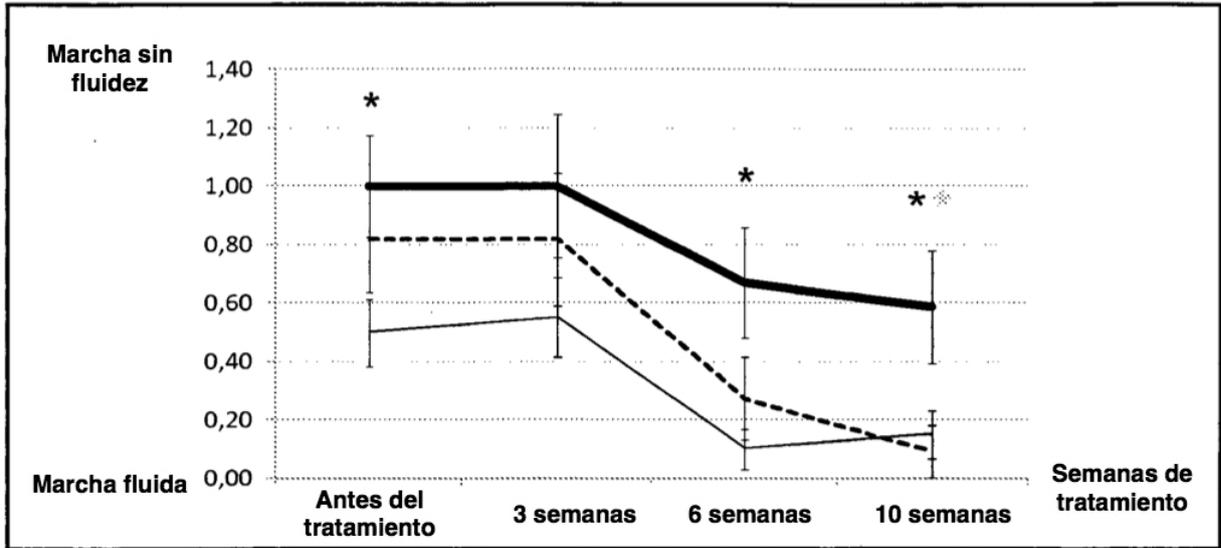


FIGURA 6

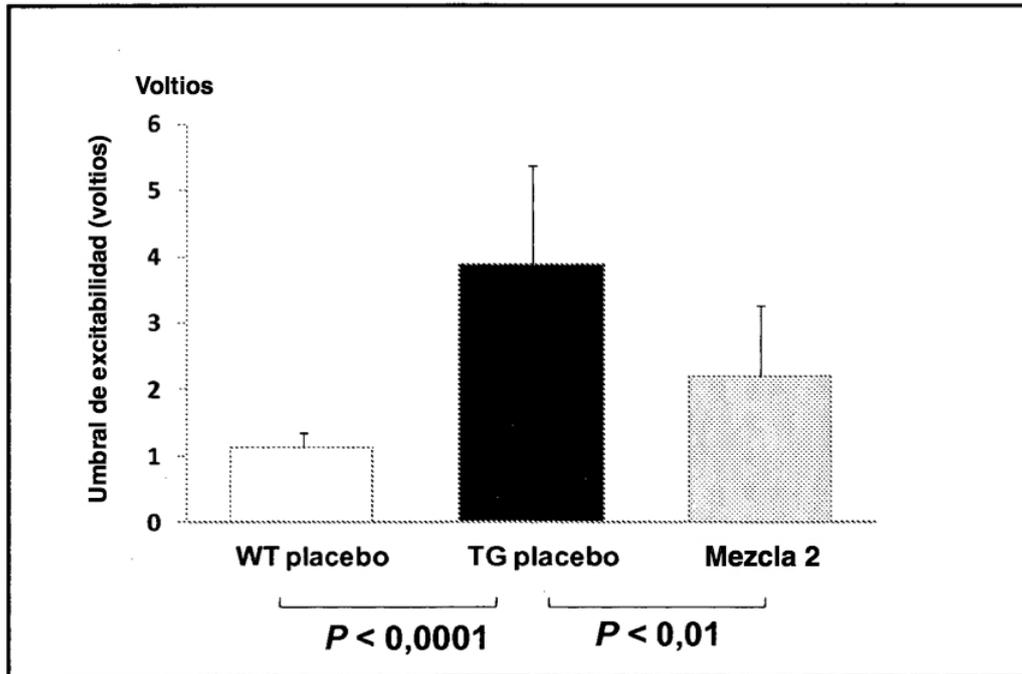


FIGURA 7

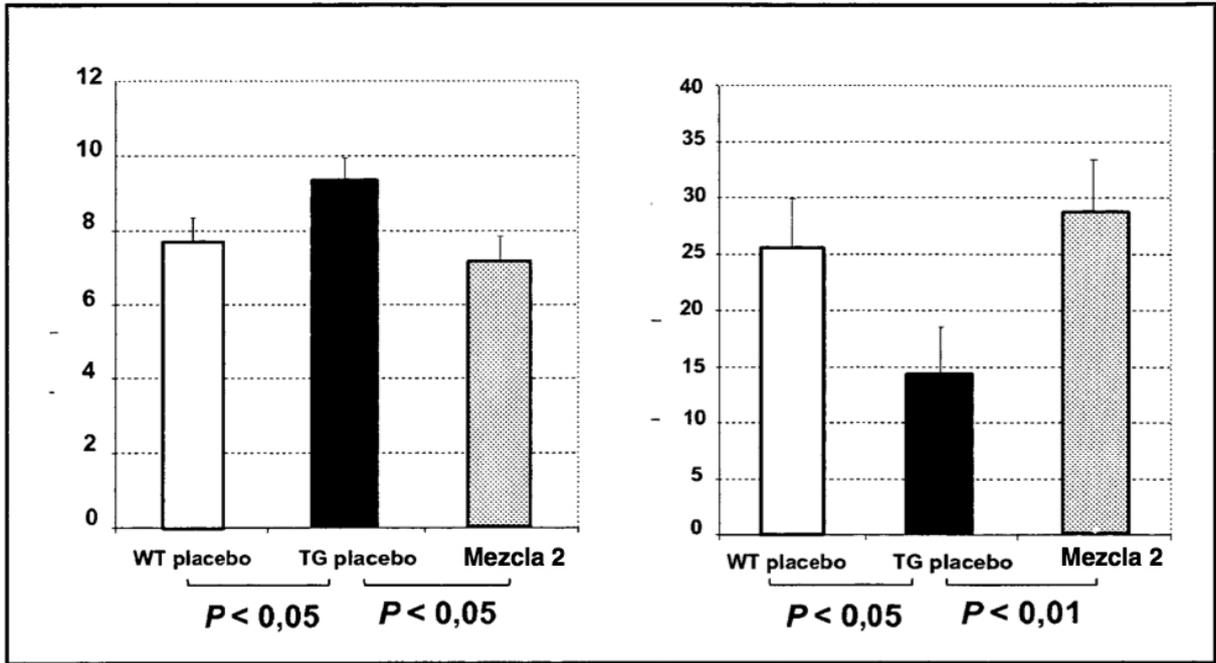


FIGURA 8

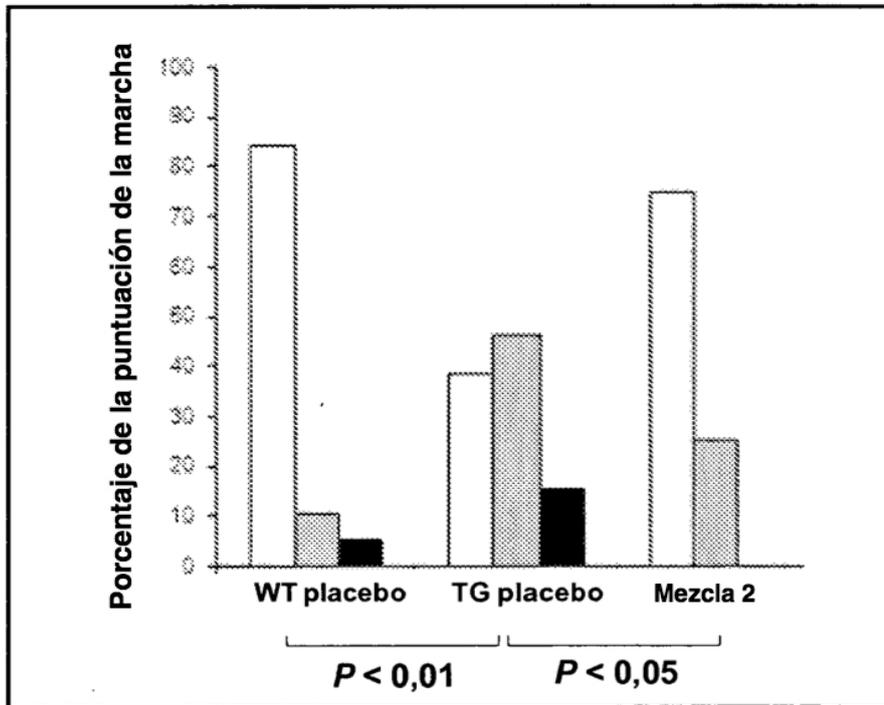
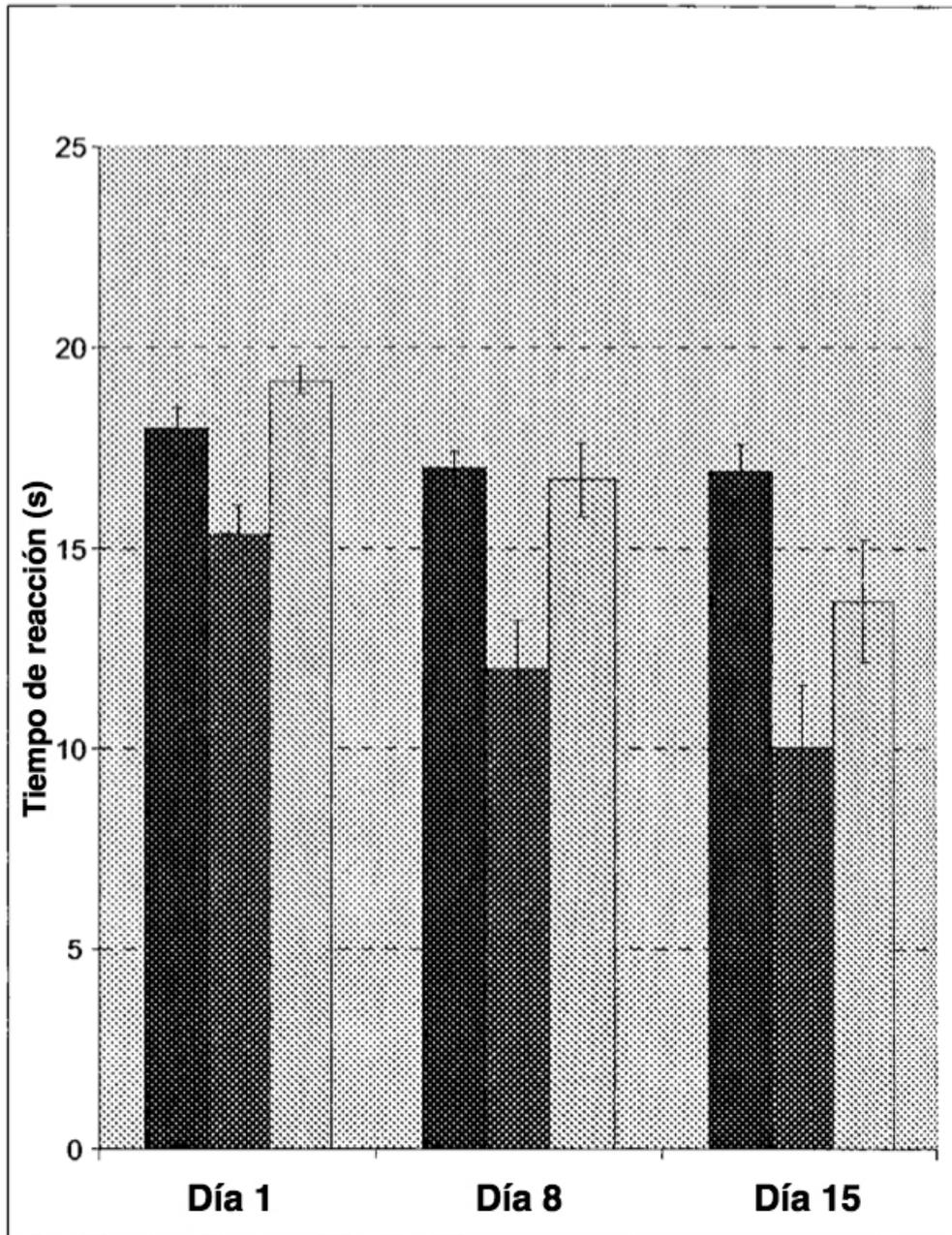


FIGURA 9



**FIGURA 10**