

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 268**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/192</b>	(2006.01)	<b>A61P 25/18</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/197</b>	(2006.01)	<b>A61P 25/24</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/4164</b>	(2006.01)	<b>A61P 25/28</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/4178</b>	(2006.01)	<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/436</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/485</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/575</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/7004</b>	(2006.01)		
<b>A61P 25/14</b>	(2006.01)		
<b>A61P 25/16</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2010 E 10724399 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2437742**

54 Título: **Nuevas composiciones para tratar la CMT y trastornos relacionados**

30 Prioridad:

**02.06.2009 EP 09305506**

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

**24.11.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**COHEN, DANIEL;  
NABIROCHKIN, SERGUEI y  
CHUMAKOV, ILYA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 523 268 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**

Nuevas composiciones para tratar la CMT y trastornos relacionados

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

5 La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ("CMT") es una polineuropatía periférica genética huérfana. Afectando a aproximadamente a 1 de cada 2.500 individuos, esta enfermedad es el trastorno hereditario más común del sistema nervioso periférico. Su aparición se produce normalmente durante la primera o segunda década de vida, aunque puede detectarse en la infancia. La evolución de la enfermedad es crónica con degeneración neuromuscular gradual. La enfermedad es invalidante con casos de dolor neurológico acompañante y discapacidad muscular extrema. La CMT es una de las patologías genéticas mejor estudiadas, con aproximadamente 30.000 casos en Francia. Aunque la mayoría de los pacientes con CMT alojan una duplicación de un fragmento del cromosoma 17 que contiene un gen de mielina: PMP22 (forma CMT1A), dos docenas de genes han sido implicados en diferentes formas de la CMT. Por consiguiente, aunque es de origen monogénico, esta patología manifiesta heterogeneidad clínica debido a posibles genes moduladores. Los genes mutados en pacientes con CMT se agrupan alrededor de 15 vías moleculares estrechamente conectadas que afectan la diferenciación de las células de Schwann o neuronas o cambian la interacción de estas células en nervios periféricos.

La explotación de datos públicamente disponibles que describen mecanismos moleculares y manifestaciones patológicas de la enfermedad de CMT1A permitió a los inventores priorizar unos cuantos módulos celulares funcionales - la regulación de la transcripción del gen PMP22, el plegamiento/degradación de la proteína PMP22, la proliferación y apoptosis de células de Schwann, la muerte de neuronas, la deposición y remodelación de la matriz extracelular, la respuesta inmunitaria - como potenciales dianas legítimas de las intervenciones terapéuticas relevantes para la CMT. El impacto combinado de estos módulos funcionales desregulados sobre la aparición y la progresión de manifestaciones patológicas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth justifica una potencial eficacia del tratamiento combinatorio para la CMT.

25 La solicitud de patente internacional WO2009/068659 describe un método de identificación de candidatos a fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth construyendo un modelo dinámico de la patología y eligiendo como diana vías celulares funcionales que son relevantes en la regulación de la enfermedad de CMT.

30 La solicitud de patente internacional WO2009/068668 describe composiciones para el tratamiento de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth que comprenden al menos dos compuestos seleccionados del grupo de múltiples candidatos a fármacos.

**Sumario de invención**

35 El fin de la presente invención es proporcionar nuevas combinaciones terapéuticas para tratar CMT y trastornos relacionados. Por tanto, la invención se refiere a nuevas composiciones y sus usos para tratar CMT y trastornos relacionados, en particular neuropatía tóxica y esclerosis lateral amiotrófica, usando combinaciones de fármacos particulares.

El objeto de la presente invención se refiere más a una composición como se define en las reivindicaciones. Más particularmente, la invención se refiere a una composición que comprende baclofeno, D-sorbitol y naltrexona, para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto mamífero.

40 Esta invención describe también una composición que comprende baclofeno, sorbitol y un compuesto seleccionado de pilocarpina, metimazol, mifepristona, naltrexona, rapamicina, flurbiprofeno y ketoprofeno, sus sales o profármacos, para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto mamífero.

La invención describe también una composición que comprende: (a) rapamicina, (b) mifepristona o naltrexona y (c) un modulador de PMP22 para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto mamífero.

45 Por ejemplo, el modulador de PMP22 se selecciona de acetazolamida, albuterol, amilorida, aminoglutetimida, amiodarona, aztreonam, baclofeno, balsalazida, betaína, betanecol, bicalutamida, bromocriptina, bumetanida, buspirona, carbacol, carbamazepina, carbimazol, cevimelina, ciprofloxacina, clonidina, curcumina, ciclosporina A, diazepam, diclofenaco, dinoprostona, disulfiram, D-sorbitol, dutasterida, estradiol, exemestano, felbamato, fenofibrato, finasterida, flumazenilo, flunitrazepam, flurbiprofeno, furosemida, gabapentina, galantamina, haloperidol, ibuprofeno, isoproterenol, ketoconazol, ketoprofeno, L-carnitina, liotironina (T3), litio, losartán, loxapina, meloxicam, metaproterenol, metaraminol, metformina, metacolina, metimazol, metilergonovina, metoprolol, metirapona, miconazol, mifepristona, nadolol, naloxona, naltrexona, norfloxacin, pentazocina, fenoxibenzamina, fenilbutirato, pilocarpina, pioglitazona, prazosina, propiltiouracilo, raloxifeno, rapamicina, rifampina, simvastatina, espiroinolactona, tacrolimus, tamoxifeno, trehalosa, trilostano, ácido valproico, sus sales o profármacos.

55 Esta invención describe también una composición que comprende rapamicina y mifepristona para administración

simultánea, separada o secuencial a un sujeto mamífero.

Otro objeto de la presente invención es una composición como se ha descrito anteriormente que comprende además uno o varios excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables (es decir, una composición farmacéutica).

5 Otro objeto de la presente invención se refiere a una composición como se ha descrito anteriormente para tratar la CMT o un trastorno relacionado.

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de una combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la CMT o un trastorno relacionado.

La invención describe también un método para tratar la CMT o un trastorno relacionado, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición como se ha definido anteriormente.

10 Otro objeto de la presente invención es un método de preparación de una composición farmacéutica, comprendiendo el método mezclar los compuestos anteriores con un excipiente o vehículo apropiado.

Esta invención describe también un método para tratar CMT1A en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

15 Esta invención describe también un método para tratar neuropatía tóxica en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

20 Esta invención describe también un método para tratar la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

Cualquiera de los diversos usos o métodos de tratamiento descritos en la presente memoria puede incluir también una etapa opcional de diagnóstico de un paciente que tiene CMT o un trastorno relacionado, particularmente CMT1A, o de identificación de un individuo en riesgo de desarrollar CMT o un trastorno relacionado, particularmente CMT1A.

25 A este respecto, la invención describe también un método para tratar CMT, particularmente CMT1A, comprendiendo el método: (1) determinar si un sujeto tiene CMT, particularmente CMT1A, y (2) tratar el sujeto que tiene CMT, particularmente CMT1A, con una cantidad eficaz de una combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente. La determinación de si un sujeto tiene CMT, particularmente CMT1A, puede hacerse por diversas pruebas conocidas per se en la técnica, tales como ensayos de DNA.

30 La invención se puede usar para tratar CMT o un trastorno relacionado en cualquier sujeto mamífero, particularmente sujetos humanos, más preferiblemente CMT1A.

#### Leyenda de las figuras de los dibujos

35 **Figura 1.** Efecto sinérgico de la combinación de fármacos, dosis 1: efecto de **A)** Mezcla 7 (dosis 1, día 10), **B)** D-sorbitol (SRB, 500  $\mu$ M, día 10), **C)** (R/S)-baclofeno (BCL, 5  $\mu$ M, día 10) y **D)** naltrexona (NTX, 5  $\mu$ M, día 10) sobre la expresión de MBP. \*:  $p < 0,05$ : significativamente diferente del control (=ácido ascórbico) (ensayo ANOVA de una vía seguido de ensayo de Fisher a posteriori); ns: estadísticamente no diferente.

40 **Figura 2.** Efecto sinérgico de la combinación de fármacos, dosis 6: **A)** Mezcla 7 (dosis 6, día 10), **B)** SRB (160 nM, día 10), **C)** BCL (1,6 nM, día 10) y **D)** NTX (1,6 nM, día 10) sobre la expresión de MBP. \*:  $p < 0,05$ : significativamente diferente del control (=ácido ascórbico) (ensayo ANOVA de una vía seguido de ensayo de Fisher a posteriori); ns: estadísticamente no diferente.

**Figura 3.** Efecto positivo de la Mezcla 7 (7 dosis) **A)** en el día 10 y **B)** en el día 11, en co-incubación con ácido ascórbico en co-cultivos de PMP22 TG sobre la expresión de MBP en porcentaje de control (= ácido ascórbico). Ensayo ANOVA de una vía seguido de ensayo de Fisher a posteriori.

45 **Figura 4.** Efecto positivo sobre ratas macho del tratamiento de 3 y 6 semanas con la Mezcla 1 medido usando la prueba de la barra. Las latencias se midieron como la media de los dos primeros ensayos de las pruebas (las barras blancas representan ratas de control tratadas con placebo; las barras negras representan ratas transgénicas tratadas con placebo; las barras grises representan ratas transgénicas tratadas con la Mezcla 1. \*\*:  $p < 0,01$ . Las estadísticas se realizan con la prueba de Student bilateral).

50 **Figura 5.** Efecto positivo sobre el modo de andar de ratas macho del tratamiento de 3 y 6 semanas (respectivamente la gráfica izquierda y derecha) con la composición de la Mezcla 1 (las barras blancas representan el modo de andar fluido; las barras grises representan el modo de andar no fluido; las barras negras representan ratas con una grave

incapacidad para andar. Las estadísticas se realizan con la prueba de Student bilateral).

**Figura 6.** Efecto positivo sobre ratas macho de la composición de la Mezcla 1 en ratas usando la prueba del plano inclinado (25°). Las ratas se examinaron después de 3, 6, 9 y 12 semanas de tratamiento (las barras blancas representan ratas de control tratadas con placebo; las barras negras representan ratas transgénicas tratadas con placebo; las barras grises representan ratas transgénicas tratadas con la Mezcla 1. \*:  $p < 0,05$ . Las estadísticas se realizan con la prueba de Student bilateral).

**Figura 7.** Efecto positivo sobre ratas hembra del tratamiento de 3 semanas con la composición de la Mezcla 2 en ratas usando una prueba del plano inclinado (las barras blancas representan ratas de control tratadas con placebo; las barras negras representan ratas transgénicas tratadas con placebo; las barras grises representan ratas transgénicas tratadas con la Mezcla 2. \*\*:  $p < 0,01$ . Las estadísticas se realizan con la prueba de Student bilateral).

**Figura 8.** Efecto protector sobre ratas macho de la Mezcla 1 sobre neuropatía inducida por oxaliplatino (las barras blancas representan ratas de tipo natural (abreviadamente WT por la expresión inglesa *Wild Type*) tratadas con placebo; las barras negras representan ratas de tipo natural tratadas con el producto de referencia gabapentina; las barras grises representan ratas de tipo natural tratadas con la mezcla 1. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ . Las estadísticas se realizan con la prueba de Student bilateral).

**Figura 9.** Disminución significativa de la expresión de RNA de PMP22 en animales transgénicos tratados en comparación con ratas transgénicas PMP22, observada después de 9 semanas de tratamiento con la dosis 3 de la Mezcla 7 (MPZ como gen de referencia, Sereda et al., 1996) ( $p = 0,0015$ ). También se han confirmado la integración transgénica y la sobre-expresión del gen PMP22; el RNA de PMP22 en ratas PMP22 transgénicas se sobre-expresó 1,8 veces en comparación con sus controles de compañeros de camada de tipo natural ( $p < 1.10^{-4}$ ). La extracción de RNA de PMP22 se realizó en nervios ciáticos de ratas macho de 16 semanas ( $n=18$  para el tipo natural,  $n=20$  para las ratas transgénicas y  $n=18$  para ratas transgénicas (TG) tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7). El análisis estadístico se realizó usando la prueba de la t de Welch.

**Figura 10.** Se realizó un análisis de agrupación en la puntuación de la prueba del plano inclinado a 35° (para distribuir en las clases de rendimiento malo, intermedio y bueno) en todos los puntos de tiempo de la evaluación (se analizaron juntas 3, 6 y 9 semanas de tratamiento). Se observó una diferencia significativa entre ratas WT y TG con placebo: 68 % de las WT pertenecían al grupo de rendimiento bueno y sólo el 5 % de las TG con placebo pertenecían a este grupo ( $p=0,0003$ ). La dosis 2 y la dosis 3 de la Mezcla 7 mejoraron los rendimientos de ratas TG. Los análisis estadísticos se realizaron aplicando una prueba de tendencia al 5% de nivel de significancia ( $n=18$  para ratas WT con placebo,  $n=20$  para ratas TG con placebo,  $n=17$  para ratas TG tratadas con la dosis 2 de la Mezcla 7,  $n=18$  para ratas TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7).

**Figura 11.** Las latencias de caída de ratas TG en la prueba de la barra después de 9 semanas de tratamiento con la dosis 3 de la Mezcla 7 se analizaron usando un modelo de Cox con un estimador de la varianza de tipo sándwich y se compararon con las de las ratas TG con placebo de referencia aplicando una prueba del orden logarítmico al 5 % de nivel de significancia. La dosis 3 de la Mezcla 7 aumentó significativamente la latencia de caída de ratas TG después de 9 semanas de tratamiento.

**Figura 12.** La fuerza de agarre de grupos de animales de tipo natural, transgénicos con placebo y transgénicos tratados con la dosis 3 de la Mezcla 7 diariamente durante 9 semanas se modelizó usando un modelo de Cox con un estimador de la varianza de tipo sándwich con respecto a todos los tiempos después de tratamiento (3, 6 y 9 semanas) y se compararon con la de las ratas TG con placebo de referencia aplicando una prueba del orden logarítmico al 5% de nivel de significancia. Los valores de p correspondientes estaban presentes en curvas de Kaplan-Meier. Se observó una disminución significativa de la fuerza de agarre de las patas delanteras de ratas transgénicas con placebo (línea continua negra,  $n=21$ ) en comparación con la de las ratas WT (línea continua gris,  $p=1,45.10^{-5}$ ,  $n=19$ ). El tratamiento con la dosis 3 de la Mezcla 7 aumentó significativamente la fuerza de las patas delanteras (línea de puntos negra;  $p=0,03$ ,  $n=18$ ).

**Figura 13.** Una prueba de correlación de Pearson mostró una correlación significativa entre el tiempo de latencia de caída en la prueba de la barra (después de 9 semanas de tratamiento) y el nivel de expresión de RNA de PMP22:  $p=1,6.10^{-4}$  (ratas WT, TG con placebo y TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7 analizadas juntas);  $p=0,07$  (ratas TG con placebo y TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7 analizadas juntas). Cuanto menor era la expresión de RNA de PMP22, mejores fueron los rendimientos de la prueba de la barra. Las ratas macho tenían 16 semanas ( $n=18$  para ratas WT, círculos blancos;  $n=20$  para ratas TG con placebo, círculos negros y  $n=18$  para ratas TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7, triángulos blancos).

**Figura 14.** Una prueba de correlación de Pearson mostró una correlación significativa entre el tiempo de latencia de caída en la prueba de la barra (después de 9 semanas de tratamiento) y la velocidad de conducción del nervio sensible (NCV):  $p=1,34.10^{-6}$  (ratas WT, TG con placebo y TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7 analizadas juntas) y  $p=0,04$  (ratas TG con placebo y TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7 analizadas juntas). Cuanto mayor era la velocidad de conducción, mejores fueron los rendimientos en la prueba de la barra. Las ratas macho tenían 16 semanas ( $n=18$  para ratas WT, círculos blancos;  $n=20$  para ratas TG con placebo, círculos negros y  $n=18$  para ratas

TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7, triángulos blancos).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos enfoques terapéuticos para tratar la CMT o trastornos relacionados. La invención describe nuevas combinaciones de fármacos que permiten una corrección eficaz de tales enfermedades y pueden usarse en cualquier sujeto mamífero.

Dentro del contexto de la presente invención, la CMT incluye CMT1A, CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1X, CMT2A, CMT2B, CMT2D, CMT2E, CMT2-P0, CMT4A, CMT4B1, CMT4B2, CMT4D, CMT4F, CMT4 o AR-CMT2A, más preferiblemente CMT1A.

Dentro del contexto de la presente invención, el término “trastorno relacionado con la CMT” designa otras enfermedades asociadas con la expresión anómala del gen PMP22 que conduce a la mielinización anómala y pérdida de neuronas. El término “trastorno relacionado con la CMT” incluye más particularmente enfermedad de Alzheimer (EA), demencia senil de tipo EA (DSTA), enfermedad de Parkinson, demencia de cuerpos de Lewis, demencia vascular, autismo, deterioro cognitivo leve (DCL), deterioro de la memoria asociado a la edad (DMAE) y problemas asociados con el envejecimiento, parkinsonismo postencefálico, esquizofrenia, depresión, enfermedad bipolar y otros trastornos del humor, enfermedad de Huntington, enfermedades de las neuronas motoras, incluyendo esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, neuropatías idiopáticas, neuropatía diabética, neuropatía tóxica, incluyendo neuropatía inducida por tratamientos con fármacos, neuropatías provocadas por VIH, radiación, metales pesados y estados de deficiencia de vitaminas, neurodegeneración basada en priones, incluyendo enfermedad de Creutzfeld-Jakob (ECJ), encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), insomnio familiar fatal (IFF) y síndrome de Kuru y Alper.

En una realización preferida, “trastorno relacionado con la CMT” designa una neuropatía tóxica, particularmente neuropatías inducidas por fármacos, o ELA.

Como se usa en la presente memoria, “tratamiento” de un trastorno incluye la terapia, prevención, profilaxis, retraso o reducción del dolor provocado por el trastorno. El término tratamiento incluye en particular el control de la progresión de la enfermedad y síntomas asociados.

También el término “compuesto” designa los compuestos químicos que se mencionan específicamente en la solicitud, así como cualquier composición farmacéuticamente aceptable con sus sales, hidratos, ésteres, éteres, isómeros, racematos, conjugados y profármacos. Los compuestos enumerados en la presente solicitud también pueden identificarse con su número CAS correspondiente.

Por tanto, los compuestos preferidos usados en la invención son baclofeno (CAS 1134-47-0) y sus posibles sales, enantiómeros, racematos, profármacos y derivados; sorbitol (CAS 50-70-4) y sus posibles sales, enantiómeros, racematos, profármacos y derivados; naltrexona (CAS 16590-41-3) y sus posibles sales, enantiómeros, racematos, profármacos y derivados; mifepristona (CAS 84371-65-3) y sus posibles sales, enantiómeros, racematos, profármacos y derivados; pilocarpina (CAS 54-71-7) y sus posibles sales, enantiómeros, racematos, profármacos y derivados; metimazol (CAS 60-56-0) y sus posibles sales, enantiómeros, racematos, profármacos y derivados; ketoprofeno (CAS 22071-15-4) y sus posibles sales, enantiómeros, racematos, profármacos y derivados; flurbiprofeno (CAS 5104-49-4) y sus posibles sales, enantiómeros, racematos, profármacos y derivados; y rapamicina (CAS 53123-88-9) y sus posibles sales, enantiómeros, racematos, profármacos y derivados.

Otros compuestos usados en la invención son acetazolamida (CAS 59-66-5) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; albuterol (CAS 18559-94-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; amilorida (CAS 2016-88-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; aminoglutetimida (CAS 125-84-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; amiodarona (CAS 1951-25-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; aztreonam (CAS 78110-38-0) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; baclofeno (CAS 1134-47-0) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; balsalazida (CAS 80573-04-2) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; betaína (CAS 107-43-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; betanecol (CAS 674-38-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; bicalutamida (CAS 90357-06-5) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; bromocriptina (CAS 25614-03-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; bumetanida (CAS 28395-03-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; buspirona (CAS 36505-84-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; carbacol (CAS 51-83-2) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; carbamazepina (CAS 298-46-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; carbimazol (CAS 22232-54-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; cevimefina (CAS 107233-08-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; ciprofloxacina (CAS 85721-33-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; clonidina (CAS 4205-90-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; curcumina (CAS 458-37-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; ciclosporina A (CAS 59865-13-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; diazepam (CAS 439-14-5) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; diclofenaco (CAS 15307-86-5) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados;

5 dinoprostona (CAS 363-24-6) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; disulfiram (CAS 97-77-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; D-sorbitol (CAS 50-70-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; dutasterida (CAS 164656-23-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; estradiol (CAS 50-28-2) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; exemestano (CAS 107868-30-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; felbamato (CAS 25451-15-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; fenofibrato (CAS 49562-28-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; finasterida (CAS 98319-26-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; flumazenilo (CAS 78755-81-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; flunitrazepam (CAS 1622-62-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; flurbiprofeno (CAS 5104-49-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; furosemida (CAS 54-31-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; gabapentina (CAS 60142-96-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; galantamina (CAS 357-70-0) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; haloperidol (CAS 52-86-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; ibuprofeno (CAS 15687-27-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; isoproterenol (CAS 7683-59-2) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; ketoconazol (CAS 65277-42-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; ketoprofeno (CAS 22071-15-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; L-carnitina (CAS 541-15-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; liotironina (T3) (CAS 6893-02-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; litio (CAS 7439-93-2) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; losartán (CAS 114798-26-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; loxapina (CAS 1977-10-2) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; meloxicam (CAS 71125-38-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metaproterenol (CAS 586-06-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metaraminol (CAS 54-49-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metformina (CAS 657-24-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metacolina (CAS 55-92-5) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metimazol (CAS 60-56-0) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metilergonovina (CAS 113-42-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metoprolol (CAS 37350-58-6) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metirapona (CAS 54-36-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; miconazol (CAS 22916-47-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; mifepristona (CAS 84371-65-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; nadolol (CAS 42200-33-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; naloxona (CAS 465-65-6) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; naltrexona (CAS 16590-41-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; norfloxacin (CAS 70458-96-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; pentazocina (CAS 359-83-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; fenoxibenzamina (CAS 59-96-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; fenilbutirato (CAS 1821-12-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; pilocarpina (CAS 54-71-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; pioglitazona (CAS 111025-46-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; prazosina (CAS 19216-56-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; propiltiouracilo (CAS 51-52-5) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; raloxifeno (CAS 84449-90-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; rapamicina (CAS 53123-88-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; rifampina (CAS 13292-46-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; simvastatina (CAS 79902-63-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; espirolactona (CAS 52-01-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; tacrolimus (CAS 104987-11-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; tamoxifeno (CAS 10540-29-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; trehalosa (CAS 99-20-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; trilostano (CAS 13647-35-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; ácido valproico (CAS 99-66-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados.

50 El término "combinación" designa un tratamiento en el que varios fármacos se co-administran a un sujeto para producir un efecto biológico. En una terapia combinada, los fármacos pueden ser administrados juntos o por separado, al mismo tiempo o secuencialmente. Por tanto, los fármacos pueden ser administrados por diferentes vías y protocolos.

La invención describe ahora la identificación y actividades de combinaciones de fármacos particulares que proporcionan un tratamiento eficaz para la CMT. Más específicamente, la invención describe nuevas combinaciones ternarias que proporcionan un efecto significativo *in vitro* e *in vivo* sobre la CMT o trastornos relacionados.

55 A este respecto, la invención describe una composición que comprende baclofeno, sorbitol y un compuesto seleccionado de pilocarpina, metimazol, mifepristona, naltrexona, rapamicina, flurbiprofeno y ketoprofeno, sus sales, enantiómeros, racematos o profármacos. En particular, la invención describe una composición que comprende baclofeno, sorbitol y un compuesto seleccionado de pilocarpina, metimazol, mifepristona, naltrexona y ketoprofeno.

60 En la realización más preferida, la presente invención se refiere a una composición que comprende naltrexona, baclofeno y D-sorbitol para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto mamífero.

Preferiblemente, en las composiciones anteriores, el sorbitol es D-sorbitol y el baclofeno es RS-baclofeno o S-

baclofeno, más preferiblemente RS-baclofeno.

La invención describe también una composición que comprende:

- 5 (a) rapamicina,  
(b) mifepristona o naltrexona, y  
(c) un modulador de PMP22,

para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto mamífero.

Esta invención describe también una composición que comprende:

- 10 (a) rapamicina,  
(b) mifepristona, y  
(c) un modulador de PMP22,

para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto mamífero.

15 El modulador de PMP22 puede ser cualquier compuesto que module la vía de PMP22 en una célula y produzca o contribuya esencialmente a la normalización de la organización de mielina y/o la inhibición de la pérdida de neuronas. El modulador de PMP22 puede seleccionarse de acetazolamida, albuterol, amilorida, aminoglutetimida, amiodarona, aztreonam, baclofeno, balsalazida, betaína, betanecol, bicalutamida, bromocriptina, bumetanida, buspirona, carbacol, carbamazepina, carbimazol, cevimelina, ciprofloxacina, clonidina, curcumina, ciclosporina A, diazepam, diclofenaco, dinoprostona, disulfiram, D-sorbitol, dutasterida, estradiol, exemestano, felbamato, fenofibrato, finasterida, flumazenilo, flunitrazepam, flurbiprofeno, furosemida, gabapentina, galantamina, haloperidol, ibuprofeno, isoproterenol, ketoconazol, ketoprofeno, L-carnitina, liotironina (T3), litio, losartán, loxapina, meloxicam, metaproterenol, metaraminol, metformina, metacolina, metimazol, metilergonovina, metoprolol, metirapona, miconazol, mifepristona, nadolol, naloxona, naltrexona, norfloxacina, pentazocina, fenoxibenzamina, fenilbutirato, pilocarpina, pioglitazona, prazosina, propiltiouracilo, raloxifeno, rapamicina, rifampina, simvastatina, espironolactona, tacrolimus, tamoxifeno, trehalosa, trilostano, ácido valproico y sus sales o profármacos.

25 Por ejemplo, el compuesto (c) se selecciona de pilocarpina, metimazol y baclofeno. A este respecto, una composición comprende:

- (a) rapamicina,  
(b) mifepristona, y  
(c) un compuesto seleccionado de pilocarpina, metimazol y baclofeno,

para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto mamífero.

30 Ejemplos específicos de tales composiciones incluyen composiciones que comprenden:

- rapamicina; mifepristona y pilocarpina;
- rapamicina; mifepristona y baclofeno;
- rapamicina; mifepristona y metimazol; o
- rapamicina; naltrexona y metimazol.

35 El apartado experimental muestra que estas combinaciones de fármacos particulares pueden corregir eficazmente la expresión de PMP22 *in vitro* para restaurar la mielinización normal y la integridad de neuronas y, por tanto, para mejorar la CMT en animales *in vivo*. Los resultados también muestran que estas combinaciones pueden proteger animales de neuropatía inducida por quimioterapia. Como resultado, estas composiciones se pueden usar para prevenir o reducir la neuropatía inducida por quimioterapia, permitiendo así que los pacientes reciban quimioterapia durante periodos prolongados.

40 Esta invención describe también una composición que comprende naltrexona, baclofeno y otro inhibidor de PMP22 distinto, como se define anteriormente.

Otro objeto de la presente invención es una composición, como se ha descrito anteriormente, que comprende además uno o varios excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables (es decir, una composición farmacéutica).

45 Otro objeto de la presente invención se refiere a una composición, como se ha descrito anteriormente, para tratar la CMT o un trastorno relacionado.

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de una combinación de compuestos, como se ha descrito anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la CMT o un trastorno relacionado.

50 Esta invención describe también un método para tratar la CMT o un trastorno relacionado, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición como se ha definido anteriormente.

Otro objeto de la presente invención es un método de preparación de una composición farmacéutica, comprendiendo el método mezclar los compuestos anteriores con un excipiente o vehículo apropiado.

5 La presente invención describe también un método para tratar la CMT1A en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

Esta invención describe además un método para tratar neuropatía tóxica en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

10 Esta invención describe también un método para tratar ELA en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

15 La terapia de acuerdo con la invención puede realizarse como combinación de fármacos y/o conjuntamente con cualquier otra terapia. Puede proporcionarse en el hogar, el consultorio médico, una clínica, un departamento de consultas externas de un hospital o un hospital, de manera que el médico pueda observar los efectos de la terapia estrechamente y hacer cualquier ajuste que sea necesario.

La duración de la terapia depende de la fase de la enfermedad que esté tratándose, la edad y afección del paciente, y de cómo el paciente responde al tratamiento.

20 Adicionalmente, una persona que tiene un mayor riesgo de desarrollar un trastorno neuropático adicional (por ejemplo, una persona que está genéticamente predispuesta a tener o tiene, por ejemplo, diabetes, o que está en tratamiento para una afección oncológica, etc.) puede recibir tratamiento profiláctico para aliviar o para retardar la eventual respuesta neuropática.

25 La dosificación, la frecuencia y el modo de administración de cada componente de la combinación pueden controlarse independientemente. Por ejemplo, un fármaco puede ser administrado por vía oral, mientras que el segundo fármaco puede ser administrado intramuscularmente. La terapia de combinación se puede administrar en ciclos intermitentes que incluyen periodos de descanso de manera que el cuerpo del paciente tiene la oportunidad de recuperarse de cualquier efecto secundario imprevisto. Los fármacos también pueden formularse juntos de forma que una administración suministre ambos fármacos.

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

30 La administración de cada fármaco de la combinación puede ser por cualquier medio adecuado que de cómo resultado una concentración del fármaco que, combinada con el otro componente, pueda mejorar la afección del paciente (que puede ser determinada, por ejemplo, *in vitro* por un efecto sobre la expresión elevada de PMP22 tras alcanzar los nervios periféricos).

35 Aunque es posible que los ingredientes activos de la combinación se administren como agentes químicos puros es preferible presentarlos como una composición farmacéutica, también denominada en este contexto formulación farmacéutica. Composiciones posibles incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, tópica (incluyendo transdérmica, bucal y sublingual) o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa y intradérmica).

40 Más comúnmente, estas formulaciones farmacéuticas se prescriben al paciente en "envases personalizados" que contienen varias unidades de dosificación u otros medios para la administración de dosis unitarias medidas para su uso durante un periodo de tratamiento distinto en un envase individual, normalmente un envase blíster. Los envases personalizados tienen la ventaja con respecto a las prescripciones tradicionales en que el farmacéutico divide la cantidad prescrita al paciente de un producto farmacéutico desde un producto a granel, ya que el paciente siempre tiene acceso al prospecto contenido en el envase personalizado, que normalmente falta en las prescripciones tradicionales. Se ha mostrado que la inclusión de un prospecto mejora el cumplimiento del paciente con las instrucciones del médico. Por tanto, la invención incluye además una formulación farmacéutica, como se ha descrito anteriormente en esta memoria, en combinación con material de envase adecuado para dichas formulaciones. En dicho envase personalizado, el uso previsto de una formulación para el tratamiento de combinación puede deducirse por instrucciones, medios, provisiones, adaptaciones y/u otros medios para ayudar a usar la formulación lo más adecuadamente para el tratamiento. Tales medios hacen que un envase personalizado sea específicamente adecuado y adaptado para su uso para el tratamiento con la combinación de la presente invención.

50 El fármaco puede estar contenido en cualquier cantidad apropiada en cualquier sustancia de vehículo adecuada, y puede estar presente en una cantidad del 1-99% en peso del peso total de la composición. La composición puede ser proporcionada en una forma de dosificación que sea adecuada para la vía de administración oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhaladora, dérmica (parche) u ocular. Por tanto, la composición puede estar en forma de, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles que incluyen hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, apósitos, baños,

dispositivos de administración osmótica, supositorios, enemas, inyectables, implantes, pulverizaciones o aerosoles.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden formularse para liberar el principio activo sustancial e inmediatamente tras la administración o en cualquier momento predeterminado o periodo de tiempo 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 de tiempo prolongado; (ii) formulaciones que después de un tiempo de desfase predeterminado crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado; (iii) formulaciones que mantienen la acción del fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado conservando un nivel de fármaco eficaz relativamente constante en el cuerpo con minimización concomitante de efectos secundarios no deseables asociados a fluctuaciones en el nivel de plasma del principio activo; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco, por ejemplo, por colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente al tejido u órgano enfermo o dentro de ellos; y (v) formulaciones que dirigen la acción del fármaco usando vehículos o derivados químicos para administrar el fármaco a un tipo de célula diana particular.

La administración de fármacos en forma de una formulación de liberación controlada se prefiere especialmente en casos en los que el fármaco en combinación tenga: (i) un índice terapéutico estrecho (es decir, la diferencia entre la concentración en plasma que conduce a efectos secundarios perjudiciales o reacciones tóxicas y la concentración en plasma que conduce a un efecto terapéutico es pequeña; en general, el índice terapéutico, IT, se define como la relación entre la dosis letal mediana ( $DL_{50}$ ) y la dosis eficaz mediana ( $DE_{50}$ )); (ii) una estrecha ventana de absorción en el tracto gastrointestinal; o (iii) una semivida biológica muy corta de manera que se requiera la dosificación frecuente durante un día con el fin de mantener el nivel en plasma a un nivel terapéutico.

Pueden seguirse distintas estrategias con el fin de obtener la liberación controlada en la que la velocidad de liberación exceda la velocidad de metabolismo del fármaco en cuestión. La liberación controlada se puede obtener por selección apropiada de diversos parámetros e ingredientes de formulación que incluyen, por ejemplo, diversos tipos de composiciones y recubrimientos de liberación controlada. Por tanto, el fármaco se formula con excipientes apropiados en una composición farmacéutica que, tras la administración, libera el fármaco en una forma controlada (composiciones de comprimido o cápsula unitarias individuales o múltiples, soluciones en aceite, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches y liposomas).

#### *Formas de dosificación sólida para uso oral*

Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el(los) ingrediente(s) activo(s) en una mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o cargas inertes (por ejemplo, sacarosa, celulosa microcristalina, almidones incluyendo el almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro de sodio, fosfato de calcio, sulfato de calcio o fosfato de sodio); agentes de granulación y de disgregación (por ejemplo, derivados de celulosa incluyendo la celulosa microcristalina, almidones incluyendo el almidón de patata, croscarmelosa sódica, alginatos o ácido algínico); agentes aglutinantes (por ejemplo, goma arábiga, ácido algínico, alginato de sodio, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol); y agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo, ácido esteárico, sílices o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes aromatizantes, plastificantes, humectantes, agentes de tamponamiento y similares.

Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden ser recubiertos mediante técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y así proporcionar una acción mantenida durante un periodo más largo. El recubrimiento se puede adaptar para liberar el principio activo en un patrón predeterminado (por ejemplo, con el fin de lograr una formulación de liberación controlada) o se puede adaptar para no liberar el principio activo hasta después de pasar el estómago (recubrimiento entérico). El recubrimiento puede ser un recubrimiento de azúcar, un recubrimiento de película (por ejemplo, basado en hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona), o un recubrimiento entérico (por ejemplo, basado en copolímero de ácido metacrílico, acetato-ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, poli(acetato-ftalato de vinilo), goma laca y/o etilcelulosa). Puede emplearse un material de retardo del tiempo tal como, por ejemplo, monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones de comprimidos sólidos pueden incluir un recubrimiento adaptado para proteger la composición de cambios químicos no deseados (por ejemplo, degradación química antes de la liberación del principio activo). El recubrimiento puede aplicarse a la forma de dosificación sólida de un modo similar al descrito en *Encyclopedia of*

## Pharmaceutical Technology.

Los fármacos pueden estar mezclados en el comprimido, o estar repartidos. Por ejemplo, un primer fármaco está contenido dentro del comprimido y un segundo fármaco está fuera, de forma que una porción sustancial del segundo fármaco es liberada antes de la liberación del primer fármaco.

- 5 Las formulaciones para uso oral se pueden presentar también como comprimidos masticables o como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo está mezclado con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, almidón de patata, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín) o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo está mezclado con agua o un medio oleoso, por ejemplo, parafina líquida o aceite de oliva. Los polvos y granulados pueden prepararse usando los ingredientes mencionados anteriormente en comprimidos y cápsulas de un modo convencional.

10 Las composiciones de liberación controlada para uso oral pueden, por ejemplo, estar preparadas para liberar el principio activo controlando la disolución y/o la difusión del principio activo.

- 15 La disolución o difusión de liberación controlada pueden lograrse mediante el recubrimiento apropiado de una formulación de comprimido, cápsula, pelet o granulado de fármacos, o incorporando el o los fármacos en una matriz apropiada. Un recubrimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de recubrimiento mencionadas anteriormente y/o, por ejemplo, goma laca, cera de abeja, Glycowax, cera de ricino, cera de carnauba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido dl-poliláctico, acetato-butirato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acetato de vinilo), vinilpirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metacrilato de metilo, 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 puede incluir también, por ejemplo, metilcelulosa hidratada, cera de carnauba y alcohol estearílico, Carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, poli(cloruro de vinilo), polietileno y/o fluorocarburo halogenado.

- 25 Una composición de liberación controlada que contiene uno o más de los fármacos de las combinaciones reivindicadas puede estar también en forma de un comprimido o cápsula flotante (es decir, un comprimido o cápsula que, tras la administración por vía oral, flota sobre la parte superior del contenido gástrico durante un cierto periodo de tiempo). Una formulación de comprimido flotante del(de los) fármaco(s) puede prepararse granulando una mezcla del(de los) fármaco(s) con excipientes y el 20-75% en peso/peso de hidrocoloides, tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. Los gránulos obtenidos pueden entonces transformarse en comprimidos. 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 participa en el mantenimiento de una densidad inferior a uno, permitiendo así que el comprimido permanezca flotando en el jugo gástrico.

*Líquidos para administración por vía oral*

- 35 Polvos, polvos dispersables o gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante adición de agua son formas de dosificación convenientes para administración por vía oral. La formulación como una suspensión proporciona el principio activo en una mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de puesta en suspensión y uno o más conservantes. Agentes de puesta en suspensión adecuados son, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato de sodio y similares.

*Composiciones parenterales*

- 40 La composición farmacéutica se puede administrar también parenteralmente por inyección, infusión o implantación (intravenosa, intramuscular, subcutánea o similares) en formas de dosificación, formulaciones o por dispositivos de administración o implantes adecuados que contienen vehículos y adyuvantes farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. La formulación y preparación de tales composiciones son muy conocidas por los expertos en la técnica de formulación farmacéutica.
- 45 Las composiciones para uso parenteral se pueden proporcionar en formas de dosificación unitarias (por ejemplo, en ampollas de una sola dosis) o en viales que contienen varias dosis y a los que puede añadirse un conservante adecuado (véase más adelante). La composición puede estar en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión o un dispositivo de administración para implantación o se puede presentar como un polvo seco que ha de ser reconstituido con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Aparte del(de los) principio(s) activo(s), la composición puede incluir vehículos y/o excipientes parenteralmente aceptables adecuados.
- 50 El(los) principio(s) activo(s) puede(n) incorporarse en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas o similares para la liberación controlada. La composición puede incluir agentes de puesta en suspensión, solubilizantes, estabilizantes, de ajuste del pH y/o agentes dispersantes.

- 55 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden estar en la forma adecuada para inyección estéril. Para preparar dicha composición, el(los) fármaco(s) activo(s) adecuado(s) se disuelve(n) o se pone(n) en suspensión en un vehículo líquido parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se

5 pueden emplear están agua, agua ajustada a un pH adecuado por adición de una cantidad apropiada de ácido clorhídrico, hidróxido sódico o un tampón adecuado, 1,3-butanodiol, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. La formulación acuosa puede contener también uno o más conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo, etilo o n-propilo). En los casos en los que uno de los fármacos sólo sea moderada o ligeramente soluble en agua se puede añadir un agente potenciador de la disolución o solubilizante, o el disolvente puede incluir 10-60% en peso/peso de propilenglicol o similares.

10 Las composiciones parenterales de liberación controlada pueden estar en forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, soluciones oleosas, suspensiones oleosas o emulsiones. Alternativamente, el(los) fármaco(s) activo(s) se puede(n) incorporar en vehículos, liposomas, nanopartículas, implantes biocompatibles o dispositivos de infusión. Materiales para su uso en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, por ejemplo, polímeros biodegradables/bioerosionables, tales como poligalactina, poli(cianoacrilato de isobutilo), poli(2-hidroxietil-L-glutamina). Los vehículos biocompatibles que se pueden usar cuando se prepara una formulación parenteral de liberación controlada son hidratos de carbono (por ejemplo, dextranos), proteínas (por ejemplo, albúmina), lipoproteínas o anticuerpos. Los materiales para su uso en implantes pueden ser no biodegradables (por ejemplo, polidimetilsiloxano) o biodegradables (por ejemplo, poli(caprolactona), poli(ácido glicólico) o poli(orto-ésteres)).

#### *Composiciones rectales*

20 Para administración rectal, las formas de dosificación adecuadas para una composición incluyen supositorios (tipo en emulsión o suspensión) y cápsulas de gelatina rectales (soluciones o suspensiones). En una formulación de supositorio típica, el(los) fármaco(s) activo(s) se combina(n) con una base de supositorio farmacéuticamente aceptable apropiada, tal como manteca de cacao, ácidos grasos esterificados, gelatina glicerizada y diversas bases solubles o dispersables en agua como polietilenglicoles. Se pueden incorporar diversos aditivos, potenciadores o tensioactivos.

#### *Composiciones percutáneas y tópicas*

25 Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar tópicamente a la piel para absorción percutánea en formas de dosificación o formulaciones que contienen vehículos y excipientes farmacéuticos aceptables convencionalmente no tóxicos que incluyen microesferas y liposomas. Las formulaciones incluyen cremas, pomadas, lociones, linimentos, geles, hidrogeles, soluciones, suspensiones, barras, pulverizaciones, pastas, apósitos y otros tipos de sistemas de administración de fármacos transdérmicos. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir agentes emulsionantes, antioxidantes, agentes de tamponamiento, conservantes, humectantes, promotores de la penetración, agentes quelantes, agentes formadores de gel, bases de pomada, perfumes y agentes protectores de la piel.

*Los agentes emulsionantes pueden ser gomas que existen en la naturaleza (por ejemplo, goma arábica o goma tragacanto)*

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

40 Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para administración tópica a la piel se pueden usar también sobre la parte del cuerpo que se ha de tratar o próxima a ella. Las composiciones se pueden adaptar para aplicación directa o para aplicación por medio de dispositivos especiales de administración de fármacos, tales como vendajes o alternativamente apósitos, almohadillas, esponjas, tiras u otras formas de material flexible adecuado.

#### **Dosificaciones y duración del tratamiento**

45 Se apreciará que los fármacos de la combinación se pueden administrar simultáneamente, tanto en la misma formulación farmacéutica como en formulaciones farmacéuticas diferentes o secuencialmente. Si hay administración secuencial, el retraso en administrar uno de los ingredientes activos no debería ser tal como para perder 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 no debe estar prevista para uso combinado con el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. El uso previsto de una combinación puede deducirse de capacidades, provisiones, adaptaciones y/u otros medios para ayudar al uso de la combinación de acuerdo con la invención. Cantidades terapéuticamente eficaces de los fármacos que son objeto de la presente invención pueden usarse juntas para la preparación de un medicamento útil para reducir el efecto del aumento de la expresión del gen PMP22; la restauración de la mielinización normal e integridad nerviosa, la prevención o reducción del riesgo de desarrollar la enfermedad de CMT, la detención o ralentización de la progresión de la enfermedad de CMT una vez que se ha manifestado clínicamente y la prevención o reducción del riesgo de una primera o posterior recidiva de un evento neuropático.

55 Aunque los fármacos activos de la presente invención se pueden administrar en dosis divididas, por ejemplo, dos o tres veces al día, se prefiere una dosis diaria única de cada fármaco en combinación, siendo lo más preferido una

dosis diaria única de todos los fármacos en una única composición farmacéutica (forma de dosificación unitaria).

La administración puede realizarse una a varias veces al día durante varios días a varios años e incluso puede ser durante toda la vida del paciente. En la mayoría de los casos estará indicada la administración crónica o al menos a largo plazo repetida periódicamente.

- 5           • El término “forma de dosificación unitaria” se refiere a unidades físicamente discretas (tales como cápsulas, comprimidos o jeringuillas cargadas) adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material o materiales activos calculados para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

10       La cantidad de cada fármaco en la combinación preferida para una dosificación unitaria dependerá de varios factores que incluyen la vía de administración, el peso corporal y la edad del paciente, la gravedad de la lesión neuropática producida por la enfermedad de CMT o el riesgo de potenciales efectos secundarios considerando el estado de salud general de la persona que ha de tratarse.

15       Adicionalmente, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo sobre el perfil farmacocinético, farmacodinámico o de eficacia de un agente terapéutico) sobre un paciente particular puede afectar a la dosificación usada.

20       Excepto cuando se responde a casos de la enfermedad de CMT especialmente perjudiciales que pueden requerir mayores dosificaciones, o cuando se tratan niños para los que se deben elegir dosificaciones menores, la dosificación preferida de cada fármaco en la combinación se encontrará normalmente dentro del intervalo de dosis que no está por encima del normalmente prescrito para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo o que se demuestra que es seguro en los largos estudios clínicos de fase 3.

Por ejemplo,

- 25           • para rapamicina, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por día, normalmente de 1 a 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , por ejemplo, entre 5 y 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ .
- para mifepristona, de aproximadamente 1 a aproximadamente 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por día, normalmente de 10 a 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , por ejemplo, entre 10 y 80  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ .
- 30           • para naltrexona, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por día, normalmente de 1 a 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , por ejemplo, entre 1 y 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ .
- para pilocarpina, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por día, normalmente de 1 a 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , por ejemplo, entre 1 y 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ .
- para baclofeno, de aproximadamente 1 a aproximadamente 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por día, normalmente de 10 a 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , por ejemplo, entre 20 y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ .
- para metimazol, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por día, normalmente de 1 a 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , por ejemplo, entre 1 y 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ .

35       La dosificación más preferida se corresponderá con cantidades del 1% hasta el 10% de las normalmente prescritas para tratamiento de mantenimiento a largo plazo.

40       Se entenderá que la cantidad del fármaco realmente administrada será determinada por un médico, teniendo en cuenta las circunstancias relevantes que incluyen la afección o afecciones que se han de tratar, la composición exacta que se ha de administrar, la edad, peso y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y la vía de administración elegida. Por tanto, los intervalos de dosificación anteriores pretenden proporcionar orientación y soporte generales para las enseñanzas contenidas en la presente memoria, pero no pretenden limitar el alcance de la invención.

## Ejemplos

### A. Preparación de combinaciones de fármacos

Se prepararon las siguientes combinaciones de fármacos:

45

	<b>Molécula</b>	<b>Dosis</b>
<b>Mezcla 1</b>	Sorbitol	2,1 mg/kg/día
	S-Baclofeno (-)	60 µg/kg/día
	Naltrexona	7 µg/kg/día

	<b>Molécula</b>	<b>Dosis</b>
<b>Mezcla 2</b>	Rapamicina	15 µg/kg/día
	Mifepristona	40 µg/kg/día

	<b>Molécula</b>	<b>Dosis</b>
<b>Mezcla 3</b>	Rapamicina	15 µg/kg/día
	Mifepristona	40 µg/kg/día
	Pilocarpina	7 µg/kg/día

	<b>Molécula</b>	<b>Dosis</b>
<b>Mezcla 4</b>	Rapamicina	15 µg/kg/día
	Mifepristona	40 µg/kg/día
	Baclofeno	60 µg/kg/día

5

	<b>Molécula</b>	<b>Dosis</b>
<b>Mezcla 5</b>	Rapamicina	15 µg/kg/día
	Mifepristona	40 µg/kg/día
	Metimazol	4,2 µg/kg/día

	<b>Molécula</b>	<b>Dosis</b>
<b>Mezcla 6</b>	Rapamicina	15 µg/kg/día
	Naltrexona	7 µg/kg/día
	Metimazol	4,2 µg/kg/día

	<b>Molécula</b>	<b>Dosis 1</b>	<b>Dosis 2</b>	<b>Dosis 3</b>
<b>Mezcla 7</b>	Sorbitol	10,5 mg/kg/día	2,1 mg/kg/día	1,05 mg/kg/día
	(RS)-Baclofeno	0,3 mg/kg/día	60 µg/kg/día	30 µg/kg/día
	Naltrexona	35 µg/kg/día	7 µg/kg/día	3,5 µg/kg/día

## B. Experimentos *in vitro*

### 10 1. Ensayos de expresión de PMP22 en células de Schwann tratadas con las Mezclas 1-6

#### 1.1 Cultivo celular

##### 1.1.1: Células de Schwann primarias de rata comercialmente disponibles

15 Se descongelan viales de cultivo primario de células de Schwann (CS) de rata (Sciencell nº R1700) y se siembra su contenido a la densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> en "medio de células de Schwann Sciencell" (medio basal de Sciencell nº R1701) en matraces de 75 cm<sup>2</sup> previamente recubiertos con poli-L-lisina. El medio de cultivo está compuesto por medio basal, 5% de suero de bovino fetal (SBF) (3H-Biomedical AB nº 1701-0025), 1% de suplemento de crecimiento para células de Schwann (3H Biomedical AB nº 1701-1752), 1% de gentamicina (Sigma nº G1397) y 10 µM de forskolina (Sigma nº F6886) para promover su proliferación.

20 Después de alcanzar la confluencia (4 a 10 días dependiendo del lote de células), las células de Schwann se purifican por agitación suave o por inmunoprecipitación con Thy 1.1 que permite el aislamiento de las CS de los fibroblastos adherentes para producir cultivos que tienen al menos el 95% de pureza. Entonces, las CS se cuentan (método con azul de triptano) y se siembran en un matraz de 75 cm<sup>2</sup> previamente recubierto con poli-L-lisina en el mismo medio de CS. En la confluencia, las células se lavan, se tripsinizan (tripsina-EDTA diluido 1x de Invitrogen nº 1540054), se diluyen en PBS (sin calcio ni magnesio), se cuentan y se cultivan en placas de 12 pocillos (140.000 células/pocillo) en medio de células de Schwann de Sciencell con 5% de SBF, 1% de suplemento de crecimiento

25

celular (CGS), 40 µg/ml de gentamicina y 4 µM de forskolina.

### 1.1.2 Células de Schwann primarias de rata de encargo

Se establecen cultivos de células de Schwann (CS) primarias de nervios ciáticos de ratas recién nacidas Sprague-Dawley (entre P0 y P2). Todas las ratas recién nacidas se sacrifican y se aíslan en una placa de Petri. La disección se realiza bajo condiciones estériles.

La piel dorsal se elimina de la pata trasera y del torso inferior. El nervio ciático se aísla y se transfiere a una placa de cultivo que contiene medio Leibovitz enfriado con hielo (L15, Invitrogen nº 11415) complementado con 1% de solución de penicilina/estreptomicina (50 UI/mL y 50 µg/mL, respectivamente; Invitrogen nº 15070) y 1% de albúmina de suero de bovino (BSA, Sigma A6003). Ambos nervios por rata se transfieren a un tubo de 15 mL que contiene L15 enfriado con hielo. Luego, el medio L15 se elimina y se sustituye por 2,4 mL de DMEM (Invitrogen nº 21969035) con 10 mg/mL de colagenasa (Sigma nº A6003). Los nervios se incuban en este medio durante 30 minutos a 37°C. Luego, el medio se elimina y ambos nervios se disocian por tripsina (10% de tripsina-EDTA 10x, Invitrogen nº 15400054) diluida en PBS sin calcio ni magnesio (Invitrogen nº 2007-03) durante 20 min a 37°C. La reacción se detiene por adición de DMEM que contiene DNasa I de calidad II (0,1 mg/mL de Roche Diagnostic nº 104159) y suero de bovino fetal (10% de SBF, Invitrogen nº 10270). La suspensión de células se trituró con una pipeta de 10 mL y se hizo pasar a través de un filtro a un tubo de 50 mL (unidades de filtro de 13 mm Swinnex, Millipore, con filtros de malla de nailon de 20 µm, Fisher). La suspensión de células se centrifuga a 350 g durante 10 min a temperatura ambiente (TA) y los sedimentos se ponen en suspensión en DMEM con 10% de SBF y 1% de penicilina/estreptomicina. Las células se cuentan (método con azul de triptano) y se siembran en placas de cultivo de tejido primario de 100 mm Falcon a la densidad de  $5 \cdot 10^5$  a  $10^6$  células/placa.

Después de un día de cultivo, el medio se cambia con DMEM, 10% de SBF, 1% de penicilina/estreptomicina y 10 µM de citosina-b-D-arabinofuranósido (Sigma nº C1768). El medio se elimina 48 horas después y las células se lavan tres veces con DMEM. Luego, se añade el medio de crecimiento de CS, compuesto por DMEM, 10% de SBF, 1% de penicilina/estreptomicina, 2 µM de forskolina (Sigma nº F6886), 10 µg/mL de extracto de pituitaria de bovino (PEX, Invitrogen nº 13028). El medio se cambia cada 2-3 días.

Después de 8 días de cultivo (4 a 10 días dependiendo de los lotes de células), las células de Schwann alcanzan la confluencia y el cultivo, que contiene una gran cantidad de fibroblastos contaminantes, se purifica por el método de inmunoprecipitación con Thy 1.1. Después de esta purificación, las células se ponen en suspensión en medio de crecimiento a 10.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces de 75 cm<sup>2</sup> previamente recubiertos con poli-L-lisina. Una vez alcanzan la confluencia, las células se lavan, se tripsinizan (tripsina-EDTA), se cuentan y se siembran en placas de 12 pocillos (100.000 células/pocillo).

### 1.1.3 Incubación de fármacos

Después de ser sembradas las células en placas de 12 pocillos, el medio se cambia por un medio definido que consiste en una mezcla de DMEM-F12 (Invitrogen nº 21331020) complementado con 1% de suplemento N2 (Invitrogen nº 17502), 1% de L-glutamina (Invitrogen nº 25030024), 2,5% de SBF (Sciencell nº 0025), 0,02 µg/mL de corticosterona (Sigma nº C2505), 4 µM de forskolina y 50 µg/mL de gentamicina. Los factores de crecimiento no se añaden a este medio, para promover la diferenciación de CS.

24 horas después, el medio se cambia por un medio definido (DMEM-F12) complementado con 1% de insulina-transferrina-selenio-X (ITS, Invitrogen nº 51300), 16 µg/mL de putrescina (Sigma nº P5780), 0,02 µg/mL de corticosterona y 50 µg/mL de gentamicina. En esta etapa, ni progesterona ni forskolina están presentes en el medio.

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

Los fármacos se añaden a un medio definido compuesto por DMEM-F12 con 1% de insulina-transferrina-selenio-X (ITS, Invitrogen nº 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 durante la estimulación con fármacos evita la saturación de adenilato-ciclasa.

## 1.2. Purificación de células de Schwann por inmunoprecipitación con Thy 1.1

Para prevenir la contaminación del cultivo con fibroblastos, se purifican las células de Schwann usando el protocolo de inmunoprecipitación con Thy 1.1 (ATCC TIB-103<sup>TM</sup>).

Placas de Petri de 100 mm para bacterias previamente recubiertas con anticuerpo se preparan del siguiente modo: estas placas se lavan tres veces con PBS y se tratan con 20 mL de solución de Tris-HCl 50 mM, pH 9,5, con 10 µg/mL de anticuerpo IgM MU anti-ratón de cabra (Jackson ImmunoResearch nº 115-005-020) durante la noche a 4°C; luego se lavan 3 veces con PBS y se tratan con una solución de PBS con 0,02% de BSA y el líquido sobrenadante obtenido del cultivo del hibridoma T11D7e2 (ATCC nº TIB-103) que contiene el anticuerpo IgM Thy 1.1

durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavan tres veces con PBS antes de ser añadidas las suspensiones celulares.

5 Las CS se desprenden con tripsina-EDTA. Tan pronto como la mayoría de las células estén en suspensión, la tripsina se neutraliza con DMEM-10% de SBF y las células se centrifugan. El sedimento de células disociadas se vuelve a poner en suspensión en 15 mL de medio con 0,02% de BSA a la densidad de  $0,66 \times 10^6$  células por mL (máximo) y se transfieren a una placa de Petri (aproximadamente 6,6 millones de células/10 mL/placa de 100 mm).

10 La suspensión de células se incuba en la placa de Petri previamente recubierta con Thy 1.1 durante 45 minutos a 37°C con agitación suave cada 15 minutos para prevenir la unión no específica. La mayoría de las células de fibroblasto que expresan Thy 1.1 se adhieren a la placa. Al final de la incubación, la suspensión de células se recupera y se centrifuga. Esta suspensión de células contiene en teoría sólo células de Schwann. Las células se centrifugan y el sedimento de células se pone en suspensión en medio de crecimiento con 10  $\mu$ M de forskolina a 16.000 células/cm<sup>2</sup> en un matraz T de 75 cm<sup>2</sup> tratado con poli-L-lisina.

### 1.3 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (Q-RT-PCR)

15 La RT-PCR cuantitativa se usa para comparar los niveles de mRNA de PMP22 después de la estimulación con fármacos, con respecto al mRNA de L13A ribosómico constitutivo en cultivo primario de células de Schwann de rata.

Después de lavar con PBS esterilizado frío, los RNA totales de cada muestra de células se extraen y se purifican de CS usando el microkit *Qiagen RNeasy* (Qiagen nº 74004). Los ácidos nucleicos se cuantifican por el espectrofotómetro Nanodrop usando 1  $\mu$ L de muestra de RNA. La integridad del RNA se determina en un aparato BioAnalyzer (Agilent).

20 Los RNA se transcriben de forma inversa en cDNA según el protocolo convencional. Los moldes de cDNA para la amplificación por PCR se sintetizan a partir de 200 ng de RNA total usando la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen nº 18064-014) durante 60 minutos a 42°C en presencia de oligo(dT), en un volumen final de 20  $\mu$ L.

25 Los cDNA se someten a amplificación por PCR usando el sistema "LightCycler<sup>®</sup> 480" (Roche Molecular Systems Inc.). Cada cDNA se diluye cinco veces antes de ser usado para la amplificación por PCR. 2,5  $\mu$ L de estos cDNA entran en la solución de reacción de PCR (volumen final de 10  $\mu$ L). Los experimentos preliminares garantizaron que la cuantificación se hizo en la fase exponencial del proceso de amplificación para ambas secuencias y que la expresión del gen de referencia fue uniforme en las diferentes condiciones de cultivo.

30 La PCR se realiza por amplificación de 500 nM de cebador directo de PMP22 de rata (NM\_017037), 5-GGAAACGCGAATGAGGC-3 (SEQ ID NO: 1) y 500 nM de cebador inverso 5-GTTCTGTTTGGTTTGGCTT-3 (SEQ ID NO: 2) (amplificación de 148 pb). Un fragmento de 152 pb de RNA ribosómico de RPL13A (NM\_173340) se amplifica en paralelo en reacciones separadas para la normalización de los resultados usando 500 nM de cebador directo 5-CTGCCCTCAAGGTTGTG-3 (SEQ ID NO: 3) y 500 nM de cebador inverso 5-CTTCTTCTCCGGTAATGGAT-3 (SEQ ID NO: 4).

35 Los inventores usaron química de FRET para realizar el análisis por Q-RT-PCR. Las sondas de FRET están compuestas por 0,3  $\mu$ M de PMP22-FL-5-GCTCTGAGCGTGCATAGGGTAC (SEQ ID NO: 5) o RPL13A-FL-5-TCGGGTGGAAGTACCAGCC (SEQ ID NO: 6), marcados en su extremo 3' con un colorante fluoróforo donador (fluoresceína). 0,15  $\mu$ M de sondas Red640 se definen del siguiente modo: PMP22-red-5'-AGGGAGGGAGGAAGGAAACCAGAAA (SEQ ID NO: 7) o RPL13A-red-5'-TGACAGCTACTCTGGAGGAGAAACGGAA (SEQ ID NO: 8), marcadas en su extremo 5' con un colorante fluoróforo aceptor (Rojo Rodamina 640).

40 Cada PCR contenía 2,5  $\mu$ L de molde de cDNA en un volumen final de 10  $\mu$ L de kit de mezcla madre (Roche nº 04-887301001).

45 Se usan las siguientes condiciones de PCR: 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 63°C y 12 segundos a 72 °C y 30 segundos a 40°C (cuarenta ciclos de amplificación). Los niveles relativos de expresión del gen PMP22 se miden determinando la relación entre los productos generados a partir del gen PMP22 diana y el patrón interno endógeno RPL13A.

### 1.4 Análisis de expresión de proteínas de PMP22 por citometría de flujo (FACS)

50 8 horas, 24 horas y 48 horas después de la incubación de los fármacos, los líquidos sobrenadantes se recuperan, centrifugan y congelan. Las CS se desprenden con tripsina-EDTA. Tan pronto como la mayoría de las células estén en suspensión, la tripsina se neutraliza usando DMEM con 10% de SBF.

Los líquidos sobrenadantes con células se recuperan y se centrifugan. Los sedimentos de células se transfieren a microtubos, se lavan una vez con PBS y se fijan con una solución específica (AbCys nº de Reactivo A BUF09B). 10 minutos después, las células se lavan una vez con PBS y se mantienen a 4°C.

Cinco días después de la fijación de las células, se marcan todas las preparaciones de células con diferentes tiempos de incubación usando el siguiente protocolo.

- 5 Las células se centrifugan a 7000 rpm durante 5 minutos y los sedimentos se ponen en suspensión en una solución de permeabilización (AbCys nº de Reactivo B BUF09B) y se marcan con anticuerpo PMP22 primario (Abcam nº ab61220, 1/50) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, las células se centrifugan a 7000 rpm durante 5 minutos y los sedimentos de células se lavan una vez con PBS. Se añade un anticuerpo secundario, acoplado a Alexa Fluor 488 (IgG anti-conejo de cabra, Molecular Probes nº A11008, 1/100), durante una hora a temperatura ambiente. Luego, las células se centrifugan a 7000 rpm durante 5 minutos y los sedimentos de células se lavan una vez con PBS. El marcaje se aumenta añadiendo un anticuerpo terciario acoplado a Alexa Fluor 488 (IgG anti-cabra de pollo, Molecular Probes nº A21467, 1/100) durante una hora de incubación, a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavan una vez con PBS. Se realiza un control sin ningún anticuerpo (células sin marcar) para determinar el nivel de autofluorescencia y se adapta la sensibilidad de los fotomultiplicadores. Se realiza un control con anticuerpos tanto secundarios como terciarios, pero sin anticuerpo primario, para determinar la unión no específica de anticuerpos.
- 10
- 15 La adquisición y el análisis de datos se realizan con un citómetro FACS Array y el programa informático para FACS Array (Becton Dickinson) en 5000 células. Se analizan la dispersión frontal (FSC por sus iniciales en inglés) que guarda relación con el volumen de células (tamaño) y la dispersión lateral (SSC por sus iniciales en inglés) que depende de la complejidad interna de las células (granularidad). Para la expresión de PMP22, el análisis se realiza dentro de las células totales y se calcula el porcentaje de células positivas. Las células positivas son células con intensidad de fluorescencia superior a las del control con anticuerpo secundario.
- 20

Con el fin de cuantificar el número de CS, las células en el medio de control se analizan usando anticuerpos anti-proteína S100.

- 25 Las células se preparan según el siguiente protocolo: las células de Schwann se tiñen con anticuerpo anti-proteína S100 (Dako nº S0311, 1/100) durante 1 hora a temperatura ambiente. Este anticuerpo se marca según el protocolo descrito anteriormente para la inmunotinción de PMP22, pero sin incubación con anticuerpo terciario.

### 1.5. Incubación y actividad de fármacos

- 30 Los fármacos se incuban durante 24 horas o 48 horas en el mismo medio definido que se ha descrito antes (3 pocillos/afección) en ausencia de forskolina para prevenir la saturación de la estimulación por adenilato-ciclase, pero en presencia de 10 nM de progesterona. Después de la incubación de los fármacos, se recuperan los líquidos sobrenadantes y las células de Schwann se congelan para el análisis por Q-RT-PCR.

Estos experimentos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

Combinación	Expresión de PMP22
Mezcla 1	Sub-regulación
Mezcla 2	Sub-regulación
Mezcla 3	Sub-regulación
Mezcla 4	Sub-regulación
Mezcla 5	Sub-regulación
Mezcla 6	Sub-regulación

## 2. Determinación del efecto sinérgico de compuestos en la Mezcla 7 en un modelo de co-cultivo para CMT

- 35 Se usó un modelo de co-cultivo como modelo *in vitro* de CMT1A. Este modelo de mielinización consiste en co-cultivar neuronas sensitivas y células de Schwann de ganglios de la raíz dorsal (GRD) disociados transgénicos (TG) de PMP22, de un varón.

- 40 El objetivo de este estudio es determinar el efecto de 3 compuestos de ensayo (+/-baclófeno, naltrexona y sorbitol) y la Mezcla 7 (una mezcla de estos 3 fármacos) sobre el proceso de mielinización. El efecto de los 3 compuestos de ensayo y su mezcla sobre la mielinización, se determinan evaluando la expresión de la proteína básica de mielina (abreviadamente en lo sucesivo MBP, por la expresión inglesa *Myelin Basic Protein*) en presencia de ácido ascórbico.

### 2.1 Materiales y métodos

- 45 Ratas hembra preñadas de 15 días de gestación se sacrifican por dislocación cervical. Los embriones se retiran del útero y están en una fase de desarrollo fetal similar.

#### 2.1.1 Genotipado

Un trozo de cada cabeza de embrión (3 mm<sup>3</sup>) se coloca en un tubo de 2 mL libre de DNasa. El DNA se extrae con el kit de PCR de tejido SYBR Green Extract-N-Amp (Sigma, ref XNATG-1KT). Sobre cada trozo de cabeza de embrión se colocaron 120 µL de solución de extracción (Kit Sigma, ref XNATG-1KT). Las cabezas se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al final de esta incubación, las cabezas se incuban durante 5 minutos a 95°C en la solución de extracción. Inmediatamente después de esta última incubación se añaden 100 µL de solución neutralizante, cada extracto de DNA se diluye a 1/40 con agua ultrapura estéril (Biosolve, ref: 91589) y se conserva a +4°C hasta su uso. El genotipado de embriones hembra (H) y macho (M) se realiza durante la disección del GRD, con el kit Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem, 4385612). El sexo de cada embrión se determina usando el gen SRY macho. Los cebadores de SRY son suministrados por Pharnext (SRY-F (SEQ ID NO: 9): 5'-GAGAGAGGCACAAGTTGGC-3'; SRY-R (SEQ ID NO: 10): 5'-GCCTCCTGGAAAAAGGGCC-3'). Los cebadores de SRY se diluyen a 3 µM en agua ultrapura estéril (Biosolve, ref: 91589). Se prepara una mezcla para PCR con agua ultrapura (4 µL por muestra), cebador a 3 µM (2 µL por muestra) y mezcla maestra (10 µL por muestra). En una placa de 96 pocillos de PCR, se depositan en cada pocillo 16 µL de mezcla de PCR. Se añaden 4 µL de cada DNA diluido según un depósito plano. La PCR se ejecuta usando el sistema de PCR 7500 fast RT-PCR (Applied Biosystem), con el siguiente programa:

Comienzo: 95°C - 20 segundos

45 ciclos: 95°C - 10 segundos, 65°C - 10 segundos, 72°C - 30 segundos (adquisición de datos).

Curva de fusión: 95°C - 15 segundos, 64°C - 1 minuto, 90°C - 30 segundos (adquisición continua de datos), 60°C - 15 segundos. Las gráficas de la amplificación y las curvas de fusión se analizan con el programa informático 7500 (Applied Biosystems).

Los resultados para cada muestra se comparan con un control negativo (agua ultrapura) y con un control positivo (TG/macho y WT/hembra) para conseguir el genotipo de cada embrión.

### 2.1.2 Co-cultivos de neuronas sensitivas y de células de Schwann

Ganglios de la raíz dorsal de rata se cultivan como han descrito previamente Cosgaya et al., 2002 y Rangaraju et al., 2008.

Cada embrión se acondiciona en placas de Petri numeradas (35 mm de diámetro). La cabeza de embrión se corta, se coloca en un tubo de 1,5 mL libre de DNasa; el DNA se extrae con el kit de tejido Extract-N-Amp (Sigma Aldrich). El genotipado (macho (M) y hembra (H), de tipo natural y PMP22 transgénico) se realiza con el kit Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem). Este genotipado se realiza en paralelo de la disección de los ganglios de la raíz dorsal (GRD), de manera que al final de la disección sólo se hace un tipo de cultivo (GRD de macho transgénico). El GRD de cada embrión se recoge, se coloca en medio de Leibovitz enfriado con hielo (L15, Invitrogen). Al final de la disección, los GRD de TGM se reúnen y se disocian por tripsinización (tripsina-EDTA, 0,05%; Invitrogen) durante 20 minutos a 37°C. La reacción se detiene mediante la adición de DMEM que contiene 10% de suero de bovino fetal (SBF) en presencia de DNasa I (Roche). La suspensión se tritura con una pipeta de 10 mL. Luego, las células se centrifugan a 350 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de células disociadas se vuelve a poner en suspensión en medio neurobasal (Invitrogen) que contiene 2% de B27 (Invitrogen), 1% de penicilina-estreptomicina (Invitrogen), 1% de L-glutamina y 50 ng/mL de Factor de crecimiento nervioso (FCN) (Sigma). Este medio es el medio neuronal. Se cuentan las células viables en un citómetro Neubauer usando el ensayo de exclusión con azul de tripano (Sigma) y se siembran sobre la base de 10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos (Greiner) tratadas con poli-L-lisina. Las placas se mantienen a 37°C en un incubador humidificado, en una atmósfera de aire (95%)-CO<sub>2</sub> (5%). La mitad del medio de cultivo neuronal estándar se cambia cada dos días. Los cultivos se mantienen en medio neurobasal estándar durante 7 días para permitir que las células de Schwann pueblen las neuritas de las neuronas sensitivas. El día 7, los cultivos se alimentan con medio neuronal estándar complementado o no con 50 µg/mL de ácido ascórbico con el fin de iniciar la formación y mielinización de la lámina basal.

### 2.1.3. Incubación de fármacos

El día 7, los siguientes compuestos de ensayo (solos o en combinación) se añaden al medio con 50 µg/mL de ácido ascórbico:

- (RS)-Baclofeno
- Naltrexona
- D-Sorbitol
- Mezcla 7 = la combinación de los 3 compuestos individuales.

Estos compuestos o combinación de compuestos se ensayan a las siguientes concentraciones (Tabla 2):

**Tabla 2:** Concentración de fármacos individuales o en combinación usados para estudios *in vitro* de la expresión de MBP en co-cultivos de GRD TG/CS.

		Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	Dosis 4	Dosis 5	Dosis 6	Dosis 7
Fármacos individuales	<b>Naltrexona</b>	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	200 nM	40 nM	8 nM	1,6 nM	320 pM
	<b>D-Sorbitol</b>	500 $\mu$ M	100 $\mu$ M	20 $\mu$ M	4 $\mu$ M	800 nM	160 nM	32 nM
	<b>(RS)-Baclofeno</b>	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	200 nM	40 nM	8 nM	1,6 nM	320 pM
Mezcla 7	<b>Naltrexona</b>	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	200 nM	40 nM	8 nM	1,6 nM	320 pM
	<b>D-Sorbitol</b>	500 $\mu$ M	100 $\mu$ M	20 $\mu$ M	4 $\mu$ M	800 nM	160 nM	32 nM
	<b>(RS)-Baclofeno</b>	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	200 nM	40 nM	8 nM	1,6 nM	320 pM

- 5 Los compuestos de ensayo se incuban durante 5 tiempos diferentes: 5, 9, 10, 11 y 13 días. Se hacen tres cultivos de GRD (de embriones TG de ratas macho) separados e independientes. Estas condiciones se determinan en presencia de ácido ascórbico, 6 pocillos por afección. La solución lista para uso de todos los compuestos de ensayo se prepara extemporáneamente a partir de una disolución madre, se conserva a -20 °C. Esta solución se prepara una vez a la semana. La mitad del medio neuronal estándar complementado con compuestos de ensayo y ácido ascórbico (cada uno a la concentración 1X) se cambia cada dos días.

#### 2.1.4 Protocolo de tinción

- Después de 5, 9, 10, 11 y 13 días de incubación, las células se fijan por una solución fría de etanol (95%) y ácido acético (5%) durante 10 minutos. Las células se permeabilizan y se bloquean con PBS que contiene 0,1% de saponina y 10% de suero de cabra durante 15 minutos. Luego, las células se incuban con un marcador específico de mielina: el anticuerpo policlonal anti-proteína básica de mielina (MBP) (Sigma 118K0431).

Este anticuerpo se revela con Alexa Fluor 568- IgG anti-conejo de cabra y Alexa Fluor 488- IgG anti-ratón de cabra (Molecular Probe 687621, 623962). Los núcleos de neuronas se marcan con un marcador fluorescente (solución de Hoechst, SIGMA ref B1155).

#### 2.1.5. Procesamiento de datos

- 20 Por pocillo se toman 20 fotografías usando InCell Analyzer™ 1000 (GE Healthcare) con 20 aumentos. Todas las imágenes se toman en las mismas condiciones. El análisis de la longitud total de axones mielinizados se hizo automáticamente (longitud y área alrededor de los axones) usando el programa informático Developer (GE Healthcare). Todos los valores se expresarán como media +/- error estándar de la media (eem). Los análisis estadísticos se hacen en diferentes condiciones (ensayo ANOVA seguido de ensayo PLSD de Fisher cuando se permita).

## 2.2. Resultados

### Efecto sinérgico de fármacos en la eficacia de la Mezcla 7

- Un efecto sinérgico importante de los fármacos que componen la combinación de la Mezcla 7 se observa sobre la expresión de MBP. De hecho, el día 10 (= 17 días de cultivo), la combinación de (RS)-baclofeno, naltrexona y D-sorbitol aumenta significativamente la expresión de MBP a la dosis 1 y 6 como se muestra en las Figuras 1A y 2A. En contraste, los fármacos anteriormente usados individualmente no tienen efecto sustancial en comparación con el control (Figuras 1B-D y 2B-D).

También se registra un efecto significativo sobre la expresión de MBP después de 10 días de incubación a las dosis 2, 3, 4, 5 y 7 de la Mezcla 7 (Figura 3A).

- 35 Este efecto se observa todavía el día 11 con las dosis 2-7 (Figura 3B) como una curva claramente en forma de campana.

## C. Experimentos *in vivo* en el modelo animal de CMT

Los inventores ensayaron los compuestos para el efecto terapéutico en un modelo de rata.

- 40 Los grupos experimentales se forman con ratas jóvenes de ambos sexos por separado. Las ratas se asignan a los grupos tras el programa de aleatorización basado en el peso corporal. En algunos experimentos, la aleatorización se basa en los rendimientos de las ratas en el ensayo de la barra. Ambos sexos se representan por grupos de control separados que son numéricamente iguales o mayores que los grupos de tratamiento.

Las ratas se tratan crónicamente con fármacos - alimentación forzada o se inyectan por la bomba subcutánea

osmótica Alzet (DURECT Corporation Cupertino, CA), dependiendo de cada biodisponibilidad de fármaco durante 3 ó 6 semanas. En todos los experimentos *in vivo* realizados, la Mezcla 7 se administra por sonda nasogástrica.

5 Los animales se pesan dos veces a la semana con el fin de ajustar las dosis al peso corporal en aumento. Si se elige la bomba osmótica para la administración del tratamiento, las dosis del fármaco se calculan basándose en el peso corporal medio estimado de los animales que se espera para su edad con respecto al periodo de duración del bombeo (6 semanas). Las bombas se reimplantan si fuera necesario, con el protocolo de anestesia apropiado.

### Ensayos de comportamiento

10 Cada tres o cuatro semanas los animales se someten a un ensayo de comportamiento. Cada ensayo es realizado por el mismo investigador en la misma sala y a la misma hora del día; esta homogeneidad se mantiene durante todo el experimento. Todos los tratamientos y la determinación del genotipo son ciegos para el investigador. El “ensayo de la barra” y la “fuerza de agarre” se han usado principalmente para acceder al rendimiento durante todo el estudio. El programa del ensayo de la barra puede cambiar a medida que crece el animal (con el fin de prevenir el sesgo debido, por ejemplo, al aprendizaje).

15 El ensayo de la fuerza de agarre permite la detección de ligeras diferencias en el rendimiento del agarre que parecen estar compuestas por la fuerza muscular, estado de sensibilidad (por ejemplo, sensaciones táctiles dolorosas pueden cambiar los valores medidos de la fuerza), componente de comportamiento (“motivación”). Los valores difieren entre las extremidades delanteras y traseras y dependen enormemente de la edad de los animales.

20 El ensayo de la fuerza de agarre mide la fuerza con la que un animal se sujeta a un agarrador con sus patas delanteras o sus patas traseras por separado. Se coloca un dinamómetro con un agarrador para medir la fuerza (Force Gauge FG-5000A). La rata es sujeta por el experimentador de forma tal que sujete el agarrador con sus patas delanteras o con sus patas traseras y tira suavemente de la rata hacia atrás hasta que suelte el agarrador. Se registra la fuerza medida cuando el animal suelta el agarrador.

25 Por animal se realizan 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 registra la puntuación máxima (una para las patas delanteras y otra para las patas traseras) (en N).

### El ensayo de la barra

30 El ensayo de la barra determina la capacidad de la rata para sujetarse en una barra fija. Ratas con PMP22 que muestran debilidad muscular presentan un déficit de rendimiento en este ensayo (Sereda et al., 1996). La rata se coloca sobre su cuatros patas en el centro de la barra (diámetro: 2,5 cm; longitud: 50 cm; 30 cm por encima de la mesa). Los ensayos se realizan consecutivamente; el número y la duración de los ensayos en los experimentos de los inventores dependía de los lotes de los animales. Se ha introducido esta variabilidad en el ensayo con el fin de determinar el programa apropiado para la mejor detección de la deficiencia motora de las ratas con CMT en el transcurso de los experimentos.

Los índices de rendimiento se registran en cada sesión:

- 35 - El número de ensayos necesario para mantenerse durante 60 segundos (o 30 segundos para el lote 1, sesión 1 y 2) sobre la barra.
- 40 - El tiempo pasado sobre la barra (es decir, la latencia de caída) en cada ensayo y el valor medio en la sesión. En los métodos experimentales en los que la sesión termina después de que la rata haya permanecido durante un tiempo de corte, es decir, 30 ó 60 segundos, sobre la barra, se asigna un rendimiento del tiempo de corte (30 segundos o 60 segundos) a ensayos no completados (por ejemplo: para el lote 8, para un animal que permanece sobre la barra menos de 10 segundos en los ensayos 1, 2 y 3, luego durante 60 segundos en los ensayos 4 y 5, 60 segundos se asigna a los ensayos 6 a 10).
- El número de caídas.

### Determinación de la salud general

45 Durante todo el experimento se monitorizan los pesos corporales, signos evidentes (aspecto del pelaje, postura del cuerpo, modo de andar, temblor, etc.) de los animales. La escala de puntuación se usa para registrar: 0 = normal, 1 = anormal.

### El modo de andar

50 Cada rata se observa en una nueva jaula para ratas (dimensiones 55 x 33 x 18 cm) sin lecho durante cinco minutos. El modo de andar de las ratas se evalúa con 4 parámetros:

- Puntuación 0: modo de andar normal (fluido)

- Puntuación 1: modo de andar anormal (no fluido o la rata tiene una ligera cojera)
- Puntuación 2: incapacidad moderada (la rata arrastra una pata y puede ponerla recta y caminar)
- Puntuación 3: incapacidad grave (la rata arrastra una o ambas patas traseras pero no puede ponerla(s) recta(s)).

## 5 Ensayo del plano inclinado

El aparato de deslizamiento tenía un plano de Plexiglás de 30 x 50 cm que podría inclinarse a un ángulo desde 0° (horizontal) hasta 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 hacia arriba); se realizan dos ensayos separados durante 1 minuto. Después de 30 minutos, se realiza el mismo experimento en un plano inclinado con un ángulo de 35°, luego en un plano inclinado 40°. Durante este tiempo, la rata se devolvió a su jaula. El plano se limpia después de cada ensayo.

Los rendimientos de las ratas se evalúan con 4 puntuaciones diferentes:

- Puntuación 0: sin deslizamiento
- Puntuación 1: un poco de deslizamiento (una o dos patas)
- Puntuación 2: un deslizamiento moderado (4 patas), pero no hasta el final del plano
- Puntuación 3: la rata se desliza hasta muy al final del plano.

## Ensayos adicionales

Cuando convenga, las ratas se someten a evaluación electrofisiológica, medición histológica y se cuantifica el nivel de expresión del RNA de PMP22 en el nervio ciático.

### Cuantificación del RNA de PMP22 en el nervio ciático por RT-PCR cuantitativa

Se aisló RNA total de nervios ciáticos izquierdos usando Qiazol (ref N° 79306, Qiagen GmbH, Alemania) seguido del método de purificación de una sola etapa con el RNeasy Mini Kit (ref N° 74106, Qiagen GmbH, Alemania) descrito por el protocolo del fabricante (Qiagen-RNeasy Fibrous tissue Handbook). La contaminación de DNA se eliminó por digestión con DNasa I libre de RNasa usando el kit libre de DNA (Qiagen-RNase-free Dnase set 1500 Kunits, ref N° 1023460).

Las concentraciones de RNA se estiman por NanoDrop ND-1000 y se hizo un ensayo de control de calidad por nanochips Agilent RNA 6000 en el bioanalizador Agilent 2100. Transcripción inversa y PCR en tiempo real: se realizó RT-PCR cuantitativa (Q-RT-PCR) del siguiente modo: 80 ng de RNA total se transcribieron de forma inversa usando la transcriptasa inversa SuperScript™ II (Invitrogen, Carlsbad, CA) con Oligo(dT)12-18 (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen de reacción de 20 µL.

La PCR en tiempo real se realizó con un sistema de ciclador térmico rápido (LightCycler® 480 II, 384-Well, Roche, Suiza). Las amplificaciones se realizan en un volumen total de 10 µL con concentración de cebadores optimizada entre 130 nM y 1 µM. Los cebadores y el molde se complementan con LightCycler® 480 SYBR Green I Master (2x conc. Roche, Cat. Ref N° 04 887 352 001). Los nucleótidos, MgCl<sub>2</sub>, DNA-polimerasa de Taq y el tampón están incluidos en la mezcla. Un protocolo de amplificación incorporó una incubación inicial a 95°C durante 10 minutos para la activación de la DNA-polimerasa de Taq seguido de 45 ciclos, con una desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, reasociación a 60°C durante 40 segundos y extensión hasta 72°C durante 10 segundos (la detección del producto fluorescente se realizó al final del periodo de extensión a 72°C por un modo de adquisición sencillo) y terminó por un ciclo de curva de fusión con desnaturalización a 95°C durante 5 segundos, reasociación a 63°C durante 60 segundos y 95°C (desde 63°C hasta 95°C la tasa de la rampa es 0,11°C/segundo y la detección del producto fluorescente fue continua). Para confirmar la especificidad de la amplificación, el producto de PCR de cada par de cebadores se sometió a un análisis de curvas de fusión. La cuantificación relativa se realizó basándose en el punto de cruce (valor Cp) para cada una de las muestras de la PCR. El punto al que la fluorescencia de una muestra sube por encima de la fluorescencia de referencia se llama el "punto de cruce (Cp)" de la muestra. Se usó el gen de la proteína cero de la mielina (MPZ) de *Rattus norvegicus* para la normalización (Sereda et al., 2006). Las secuencias de los cebadores (sintetizadas por Eurofins MWG Operon, Alemania) usadas para el análisis por Q-RT-PCR son:

PMP22 - directo: 5'-TGTACCACATCCGCCTTGG-3' (SEQ ID NO: 11) y  
 PMP22 - inverso: 5'-GAGCTGGCAGAAGAAGCAAGAAC-3' (SEQ ID NO: 12).  
 MPZ - directo: 5'-TGTTGCTGCTGTTGCTCTTC-3' (SEQ ID NO: 13) y  
 MPZ - inverso: 5'-TTGTGAAATTTCCCCTTCTCC-3' (SEQ ID NO: 14).

## Resultados

La composición de la Mezcla 1 mejora los rendimientos del ensayo de la barra durante el método de tratamiento (Fig. 4).

La Mezcla 1 mejora la puntuación del modo de andar de ratas transgénicas después de 3 y 6 semanas de tratamiento, como se muestra en la Figura 5.

La Mezcla 1 aumenta los rendimientos de ratas transgénicas después de 3, 6, 9 y 12 semanas de tratamiento en el ensayo del plano inclinado 25° descrito en la Figura 6.

- 5 La Figura 7 ilustra el efecto positivo de la Mezcla 2 sobre la puntuación del modo de andar de ratas transgénicas a 25, 35 y 40° en el ensayo del plano inclinado.

La Mezcla 7 (dosis 3) disminuye significativamente la expresión de RNA del gen PMP22 en el nervio ciático de ratas transgénicas con PMP22 (Figura 9).

- 10 Los rendimientos de ratas con PMP22 tratadas con la Mezcla 7 (dosis 2 y dosis 3) están mejorados en el ensayo del plano inclinado 35° (Figura 10). Más específicamente, el 29 y el 33% de ratas pertenecen al grupo de buen rendimiento en comparación con el 5% para el grupo TG con placebo y el 29 y el 11% de las ratas pertenecen al grupo de escaso rendimiento en comparación con el 60% para el grupo TG con placebo. El valor de p (frente al TG con placebo) es igual a 0,0152 para las ratas TG tratadas con la dosis 2 de la Mezcla 7 y el valor de p es igual a 0,002 para las ratas TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7 (frente al TG con placebo).

- 15 La dosis 3 de la Mezcla 7 aumenta significativamente el tiempo de latencia de caída de ratas con PMP22 en el ensayo de la barra después de 9 semanas de tratamiento (Figura 11): línea de rayas negra,  $p=4,56.10^{-2}$ ,  $n=18$ . También se observan diferencias significativas entre ratas TG con placebo (línea continua negra,  $n=20$ ) y ratas WT con placebo (línea continua gris,  $p=3,82.10^{-7}$ ,  $n=18$ ).

La Figura 12 ilustra la mejora de la fuerza de agarre de las ratas con PMP22 tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7.

- 20 La Figura 13 muestra la correlación significativa entre el tiempo de latencia en el ensayo de la barra (después de 9 semanas de tratamiento con la dosis 3 de la Mezcla 7) y el nivel de expresión de RNA de PMP22.

La Figura 14 muestra la correlación significativa entre el tiempo de latencia en el ensayo de la barra después de 9 semanas de tratamiento con la dosis 3 de la Mezcla 7 y la velocidad de conducción del nervio sensible (cola).

Se obtienen resultados similares para otras combinaciones (véase la Tabla 3).

- 25 Tabla 3

Combinación	Fenotipo de la enfermedad de rata con PMP22
Mezcla 1	Mejora
Mezcla 2	Mejora
Mezcla 3	Mejora
Mezcla 4	Mejora
Mezcla 5	Mejora
Mezcla 6	Mejora

Estos datos muestran que, *in vivo*, las combinaciones y regímenes de la presente invención permiten un tratamiento eficaz de la CMT.

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

- 30 Los tratamientos o regímenes con fármacos se administran por vía oral a partir del día anterior a la primera inyección intraperitoneal de 3 mg/kg de oxaliplatino (D -1) hasta el día anterior al último día de ensayo (D 16). A los animales que pertenecen al grupo tratado con oxaliplatino se les administra diariamente agua destilada (10 mL/kg). A los animales se les administra el tratamiento de ensayo y agua destilada diariamente durante la mañana, mientras que el oxaliplatino se administra por la tarde.

- 35 Durante los días de ensayo (es decir, D1, D4, D10), el tratamiento y el agua destilada se administran después del ensayo. Con respecto al día de ensayo (D4), que incluye administraciones de compuestos y vehículos e inyección de oxaliplatino, el tratamiento y el agua destilada se administran antes de la inyección de oxaliplatino después del ensayo. A los animales del grupo tratado de referencia sólo se les administra durante los días de ensayo (es decir, D1, D4, D10 y D17).

- 40 Se determina la alodinia al frío midiendo las respuestas a estimulación no nociceptiva térmica (ensayo de la acetona) el D1 (alrededor de 24 horas después de la primera inyección de 3 mg/kg de oxaliplatino (efecto agudo de oxaliplatino), el D4, D10 (efecto crónico de oxaliplatino) y el D17 (efecto residual de oxaliplatino una semana después de completarse el tratamiento).

El análisis se realiza usando el ensayo de la acetona 2 horas después de la administración de la referencia. La

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

#### Ensayo de la acetona

5 Se determina la alodinia al frío usando el ensayo de la acetona. En este ensayo, se mide la latencia de la retirada de las patas traseras después de la aplicación de una gota de acetona a la superficie plantar de ambas patas traseras (tiempo de reacción) y se puntúa la intensidad de la respuesta (puntuación de frío).

El tiempo de reacción al efecto del frío de la acetona se mide dentro de 20 segundos (corte) después de la aplicación de acetona. Las respuestas a la acetona también se clasifican en la siguiente escala de 4 puntos: 0 (sin respuesta); 1 (rápida retirada, sacudida de la pata); 2 (retirada prolongada o sacudida marcada de la pata); 3 (sacudida repetida de la pata con lametazos o mordiscos).

10 Se realizan seis ensayos por rata. Para cada grupo experimental, los resultados se expresan como la puntuación de frío acumulada definida como la suma de las 6 puntuaciones para cada rata juntas  $\pm$  EEM. Siendo la puntuación mínima 0 (sin respuesta a cualquiera de los 6 ensayos) y siendo la puntuación máxima posible 18 (sacudidas y lametazos o mordiscos repetidos de las patas en cada uno de los seis ensayos).

Fuente de gabapentina: Zhejiang Chiral Medicine Chemicals, China

15 Fuente de oxaliplatino: Sigma, Francia

Los resultados se representan en la Figura 8. Muestran claramente un efecto protector de la composición de la presente invención sobre la neuropatía inducida por oxaliplatino.

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

#### Modelo animal

20 Los inventores han elegido el modelo de rata SOD1<sup>G93A</sup> (generado por Howland et al.) para imitar la patología de la esclerosis lateral amiotrófica. Este modelo sobre-expresa el gen SOD1 mutado en la médula espinal, en muchas regiones cerebrales, así como en tejidos periféricos. La aparición de la enfermedad de las neuronas motoras en este modelo es aproximadamente a los 115 días; aparece como un modo de andar anormal de las extremidades traseras. En pocos días se produce la parálisis de la extremidad trasera.

25 Métodos experimentales

Los inventores obtuvieron colonias cruzando ratas SOD1<sup>G93A</sup> reproductoras con ratas hembra Sprague Dawley. Las ratas SOD1<sup>G93A</sup> heterocigóticas se identifican por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del DNA de la cola con cebadores específicos para hSOD1 [1]. Los animales se mantienen en una sala con iluminación (luces encendidas desde 05:00 hasta 19:00 horas) y temperatura (23 $\pm$ 1°C) controladas y tienen libre acceso a alimento y agua. Todos los métodos en animales en el presente estudio se llevan a cabo según las directrices estándares del cuidado animal. La medición del peso corporal se realizó cada semana y los ensayos de comportamiento empezaron a una edad de 60 días y continuaron hasta el punto final. Los tratamientos se administran cada día por vía oral o subcutánea a partir de la edad de 5 semanas.

1. Ensayo de observación: caracterización del aspecto general  
35 Cada rata se observó en una nueva jaula para ratas (dimensiones 55 x 33 x 18 cm) sin lecho durante cinco minutos. Se registran 5 parámetros diferentes:

#### El modo de andar

- Puntuación 0: modo de andar normal (fluido)
- Puntuación 1: modo de andar anormal (no fluido o la rata tiene una ligera cojera)
- 40 - Puntuación 2: incapacidad moderada (la rata arrastra una pata y puede ponerla recta y caminar)
- Puntuación 3: incapacidad grave (la rata arrastra una o ambas patas traseras pero no puede ponerla(s) recta(s))

#### El aspecto del pelaje

- Puntuación 0: pelaje limpio y sedoso
- 45 - Puntuación 1: piloerección o pelaje sucio

#### El temblor

- Puntuación 0: sin temblor
- Puntuación 1: temblor

**La posición del cuerpo**

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

**La posición de las patas traseras**

- 5
- Puntuación 0: normal
  - Puntuación 1: patas traseras extendidas

2. El ensayo de puntuación motora: caracterización del déficit motor

Este ensayo evalúa la capacidad de las ratas para enderezarse por sí mismas en el plazo de 30 segundos después de haberse tumbado sobre cualquier lado (reflejo de enderezamiento) (Gale et al.).

- 10 Se usó un sistema de puntuación no paramétrico siguiendo estos criterios (Matsumoto et al., Thonhoff et al.):
- Puntuación 0: la rata no puede enderezarse por sí misma desde cualquier lado en el plazo de 30 segundos
  - Puntuación 1: la rata no puede enderezarse por sí misma desde sólo un lado en el plazo de 30 segundos
  - Puntuación 2: la rata puede enderezarse por sí misma desde ambos lados en el plazo de 30 segundos, pero no puede mantenerse de pie en la jaula; siempre está arrastrando algunas partes de su cuerpo
  - 15 - Puntuación 3: la rata puede enderezarse por sí misma desde ambos lados en el plazo de 30 segundos, no puede mantenerse de pie en la jaula, pero no está arrastrando ninguna parte del cuerpo
  - Puntuación 4: la rata puede enderezarse por sí misma desde ambos lados en el plazo de 30 segundos, puede mantenerse de pie en la jaula, pero tienen déficits funcionales visibles
  - Puntuación 5: la rata puede enderezarse por sí misma desde ambos lados en el plazo de 30 segundos, puede mantenerse de pie en la jaula y no tiene déficits funcionales visibles.
- 20

El punto final de la enfermedad se fija en la puntuación 0; entonces la rata se sacrifica.

3. Ensayo del plano inclinado: caracterización del déficit motor

- 25 El aparato de deslizamiento tenía un plano de Plexiglás de 30 x 50 cm que podía estar inclinado un ángulo desde 0° (horizontal) hasta 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 hacia arriba); se realizan dos ensayos separados por 1 minuto. Después de 30 minutos, el mismo experimento se realiza en un plano inclinado 35°, luego en un plano inclinado 40°. Durante este tiempo, la rata se devolvió a su jaula. El plano se limpia después de cada ensayo.

Los rendimientos de ratas se evalúan con 4 puntuaciones diferentes:

- 30
- Puntuación 0: sin deslizamiento
  - Puntuación 1: un poco de deslizamiento (una o dos patas)
  - Puntuación 2: un deslizamiento moderado (4 patas), pero no hasta el final del plano
  - Puntuación 3: la rata se desliza hasta muy al final del plano.

4. El ensayo de la malla de alambre: caracterización de la capacidad motora en situación difícil

- 35 Se colocó una malla de alambre en contacto con una caja en la parte superior (a un ángulo de 70°) y el borde de una mesa en la parte inferior. Cada rata se colocó en la parte inferior de la malla de alambre y se motivó para que ascendiera colocando a sus compañeros de camada en la caja en la parte superior. Cada rata se entrenó una vez a la semana (3 ensayos). El parámetro registrado fue el tiempo de latencia para alcanzar la parte superior de la malla de alambre.

5. El ensayo de campo abierto: caracterización de la actividad locomotora

- 40 La actividad locomotora se midió en una caja de Plexiglás (45 x 45 x 30 cm, Acti-Track de BIOSEB, Lyon, Francia) con 16 rayos de células fotoeléctricas siguiendo 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 registran 4 parámetros (la distancia desplazada total, el número de posturas erguidas, el porcentaje de distancia desplazada y de tiempo pasado en el centro del campo abierto).

45

**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.
- 5 Amici SA, Dunn WA Jr, Notterpek L. Developmental abnormalities in the nerves of peripheral myelin protein 22-deficient mice. *J Neurosci Res.* 2007; 85(2): 238-249.
- 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.
- 10 Basta-Kaim A, Budziszewska B, Jaworska-Feil L, Tetich M, Leśkiewicz M, Kubera M, Lasoń W. Chlorpromazine inhibits the glucocorticoid receptor-mediated gene transcription in a calcium-dependent manner. *Neuropharmacology.* 2002;43(6):1035-1043
- 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.
- 15 Bogoyevitch MA, Ketterman AJ, Sugden PH. Cellular stresses differentially activate c-Jun N-terminal protein kinases and extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem.* 1995;270(50):29710-29717.
- 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.
- 20 Castellone MD, Teramoto H, Gutkind JS. Cyclooxygenase-2 and Colorectal Cancer Chemoprevention: The  $\beta$ -Catenin Connection. *Cancer Res.* 2006; 66(23):11085-11088.
- Chen XR, Besson VC, Palmier B, Garcia Y, Plotkine M, Marchand-Leroux C. Neurological recovery-promoting, anti-inflammatory, and anti-oxidative effects afforded by fenofibrate, a PPAR alpha agonist, in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007; 24 (7): 1119-1131.
- 25 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.
- Constable AL, Armati PJ. DMSO induction of the leukotriene LTC4 by Lewis rat Schwann cells. *J Neurol Sci* 1999; 162(2): 120-126.
- 30 Cosgaya J. M., Chan J. R., Shooter E. M. The Neurotrophin Receptor p75NTR as a Positive Modulator of Myelination. *Science.* 2002; 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.
- Diep QN, Benkirane K, Amiri F, Cohn JS, Endemann D, Schiffrin EL. PPAR alpha activator fenofibrate inhibits myocardial inflammation and fibrosis in angiotensin II-infused rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 36 (2): 295-304.
- 35 Dracheva S, Davis KL, Chin B, Woo DA, Schmeidler J, Haroutunian V. Myelin-associated mRNA and protein expression deficits in the anterior cingulate cortex and hippocampus in elderly schizophrenia patients. *Neurobiol Dis.* 2006 Mar;21(3):531-540.
- D'Urso D, Ehrhardt P, Müller HW. Peripheral myelin protein 22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. *J Neurosci.* 1999; 19(9):3396-3403.
- 40 Fortun J, Dunn WA Jr, Joy S, Li J, Notterpek L. Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. *J Neurosci.* 2003; 23(33): 10672-10680.
- Fortun J, Li J, Go J, Fenstermaker A, Fletcher BS, Notterpek L. Impaired proteasome activity and accumulation of ubiquitinated substrates in a hereditary neuropathy model. *J Neurochem* 2005; 92:1531-1541.
- 45 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. *Neurobiol Dis.* 2007; 25(2): 252-265.

- Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol*. 1985 Apr; 88(1):123-34.
- Galvez AS, Ulloa JA, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros LF, Lavandero S. Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis: differential effects of sorbitol and mannitol. *J Biol Chem*. 2003; 278(40):38484-38494.
- Groyer G, Eycheenne B, Girard C, Rajkowski K, Schumacher M, Cadepond F. Expression and functional state of the corticosteroid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in Schwann cells. *Endocrinology*. 2006; 147(9):4339-4350.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 5; 99(3):1604-9. Epub 2002 Jan 29.
- Kantamneni S, Corrêa SA, Hodgkinson GK, Meyer G, Vinh NN, Henley JM, Nishimune A. GISP: a novel brain-specific protein that promotes surface expression and function of GABA(B) receptors. *J Neurochem*. 2007;100(4):1003-17.
- 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.
- Kobsar I, Hasenpusch-Theil K, Wessig C, Müller HW, Martini R. Evidence for Macrophage-Mediated Myelin Disruption in an Animal Model for Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 1A. *J. Neurosci Res* 2005; 81:857-864.
- Lange CA, Shen T et al. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *PNAS USA*. 2000; 97: 1032-1037.
- Le-Niculescu H, Kurian SM, Yehyaw N, Dike C, Patel SD, Edenberg HJ, Tsuang MT, Salomon DR, Nurnberger JI Jr, Niculescu AB. Identifying blood biomarkers for mood disorders using convergent functional genomics. *Mol Psychiatry*. 2008 Feb 26. [Epub ahead of print].
- Li WW, Le Goascogne C, Ramaugé M, Schumacher M, Pierre M, Courtin F. Induction of type 3 iodothyronine deiodinase by nerve injury in the rat peripheral nervous system. *Endocrinology*. 2001; 142(12):5190-5197.
- 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 1A. *Nat Genet*. 1992 ;1(1): 29-33.
- Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Okano H. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats.. *J Neurosci Res*. 2006 Jan; 83(1):119-33.
- Mäurer M, Kobsar I, Berghoff M, Schmid CD, Carenini S, Martini R. Role of immune cells in animal models for inherited neuropathies: facts and visions. *J Anat*. 2002; 200(4): 405-414.
- Melcangi RC, Cavarretta IT, Ballabio M, Leonelli E, Schenone A, Azcoitia I, Miguel Garcia-Segura L, Magnaghi V. Peripheral nerves: a target for the action of neuroactive steroids. *Brain Res Rev*. 2005; 48(2): 328-338.
- Mercier G, Turque N, Schumacher M. Rapid effects of triiodothyronine on immediate-early gene expression in Schwann cells. *Glia*. 2001; 35(2):81-89.
- 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.
- Miller AL, Garza AS, Johnson BH, Thompson EB. Pathway interactions between MAPKs, mTOR, PKA, and the glucocorticoid receptor in lymphoid cells. *Cancer Cell Int*. 2007; 28:7:3
- Muja N, Blackman SC, Le Breton GC, DeVries GH. Identification and functional characterization of thromboxane A2 receptors in Schwann cells. *J Neurochem*. 2001; 78(3):446-456.
- Muller DL, Unterwald EM. In Vivo Regulation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase (ERK) and Protein Kinase B (Akt) Phosphorylation by Acute and Chronic Morphine. *JPET* 2004; 310:774-782.
- Nambu H, Kubo E, Takamura Y, Tsuzuki S, Tamura M, Akagi Y. Attenuation of aldose reductase gene suppresses high-glucose-induced apoptosis and oxidative stress in rat lens epithelial cells. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008; 82(1):18-24.

- Nave KA, Sereda MW, Ehrenreich H. Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies--from basic to clinical research. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007; 3(8): 453-464.
- 5 Niemann S., Sereda M.W., Rossner M., Stewart H., Suter U., Meinck H.M., 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.
- Obrietan K, van den Pol AN. GABAB receptor-mediated inhibition of GABAA receptor calcium elevations in developing hypothalamic neurons. *J Neurophysiol.* 1998; 79(3):1360-1370.
- 10 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.
- Ohsawa Y, Murakami T, Miyazaki Y, Shirabe T, Sunada Y. Peripheral myelin protein 22 is expressed in human central nervous system. *J Neurol Sci.* 2006; 247(1):11-15.
- 15 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 Charcot-Marie-Tooth 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.
- 20 Rangaraju S, Madorsky I, Pileggi JG, Kamal A, Notterpek L. Pharmacological induction of the heat shock response improves myelination in a neuropathic model. *Neurobiology of Disease.* 2008; 32(105-115).
- Roa BB, Garcia CA, Suter U, Kulpa DA, Wise CA, Mueller J, Welcher AA, Snipes GJ, Shooter EM, Patel PI, Lupski JR. 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.
- 25 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.
- Robert F, Guennoun R, Désarnaud F, Do-Thi A, Benmessahel Y, Baulieu EE, Schumacher M. Synthesis of progesterone in Schwann cells: regulation by sensory neurons. *Eur J Neurosci.* 2001; 13(5): 916-924.
- 30 Roux KJ, Amici SA, Notterpek L. The temporospatial expression of peripheral myelin protein 22 at the developing blood-nerve and blood-brain barriers. *J Comp Neurol.* 2004; 474(4):578-588.
- 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.
- 35 Schumacher M, Guennoun R, Mercier G, Désarnaud F, Lacor P, Bénavides J, Ferzaz B, Robert F, Baulieu EE. Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. *Brain Res Rev.* 2001; 37(1-3): 343-359.
- 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.
- 40 Stirnweiss J, Valkova C, Ziesché E, Drube S, Liebmann C. Muscarinic M2 receptors mediate transactivation of EGF receptor through Fyn kinase and without matrix metalloproteases. *Cell Signal.* 2006; 18(8):1338-1349.
- 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.
- 45 Thonhoff JR, Jordan PM, Karam JR, Bassett BL, Wu P. Identification of early disease progression in an ALS rat model. *Neurosci Lett.* 2007 Mar 30; 415(3):264-8. Epub 2007 Jan 14.
- 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.
- Tu H, Rondard P, Xu C, Bertaso F, Cao F, Zhang X, Pin JP, Liu J. Dominant role of GABAB2 and Gbetagamma for GABAB receptor-mediated-ERK1/2/CREB pathway in cerebellar neurons. *Cell Signal*. 2007; 19(9):1996-2002.
- 5 Uht RM, Anderson CM, Webb P, Kushner PJ. Transcriptional activities of estrogen and glucocorticoid receptors are functionally integrated at the AP-1 response element. *Endocrinology*. 1997 Jul;18(7):2900-2908.
- 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.
- 10 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.
- Walter IB. Nuclear triiodothyronine receptor expression is regulated by axon-Schwann cell contact. *Neuroreport*. 1993; 5(2):137-140.
- Walter IB, Deruaz JP, de Tribolet N. Differential expression of triiodothyronine receptors in schwannoma and neurofibroma: role of Schwann cell-axon interaction. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1995; 90(2):142-149.
- 15 Welch WJ, Brown CR. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones*. 1996;1(2):109-115.
- Woodhams PL, MacDonald RE, Collins SD, Chessell IP, Day NC. Localisation and modulation of prostanoid receptors EP1 and EP4 in the rat chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pain*. 2007; 11 (6):605-613.
- 20

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> PHARNEXT	
5	<120> Nuevas composiciones para tratar la CMT y trastornos relacionados	
	<130> B888PC00	
	<140> EP 09 305506.9	
10	<141> 02-06-2009	
	<160> 14	
	<170> PatentIn versión 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> cebador directo_PMP22 de rata	
	<400> 1	
25	ggaaacgcga atgaggc	17
	<210> 2	
	<211> 19	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso_PMP22 de rata	
35	<400> 2	
	gttctgttg gtttgctt	19
40	<210> 3	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador directo_RPL13A	
	<400> 3	
50	ctgccctcaa ggtgtg	17
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> DNA	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso_RPL13A	
60	<400> 4	
	cttctcttc cggtaatga t	21
	<210> 5	

<211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> cebador directo\_Pmp22-FL  
 <400> 5

10 gctctgagcg tgcataagggt ac 22  
 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo\_ Rpl13A-FL

20 <400> 6  
 tcgggtggaa gtaccagcc 19  
 <210> 7  
 <211> 25  
 25 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso\_Pmp22-rojo

30 <400> 7  
 agggaggag gaaggaaacc agaaa 25  
 <210> 8  
 <211> 28  
 35 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> cebador inverso-Rpl13A-rojo  
 <400> 8

45 tgacagctac tctggaggag aaacggaa 28  
 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> SRY - Directo  
 <400> 9

55 gagagaggca caagttggc 19  
 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> SRY - inverso

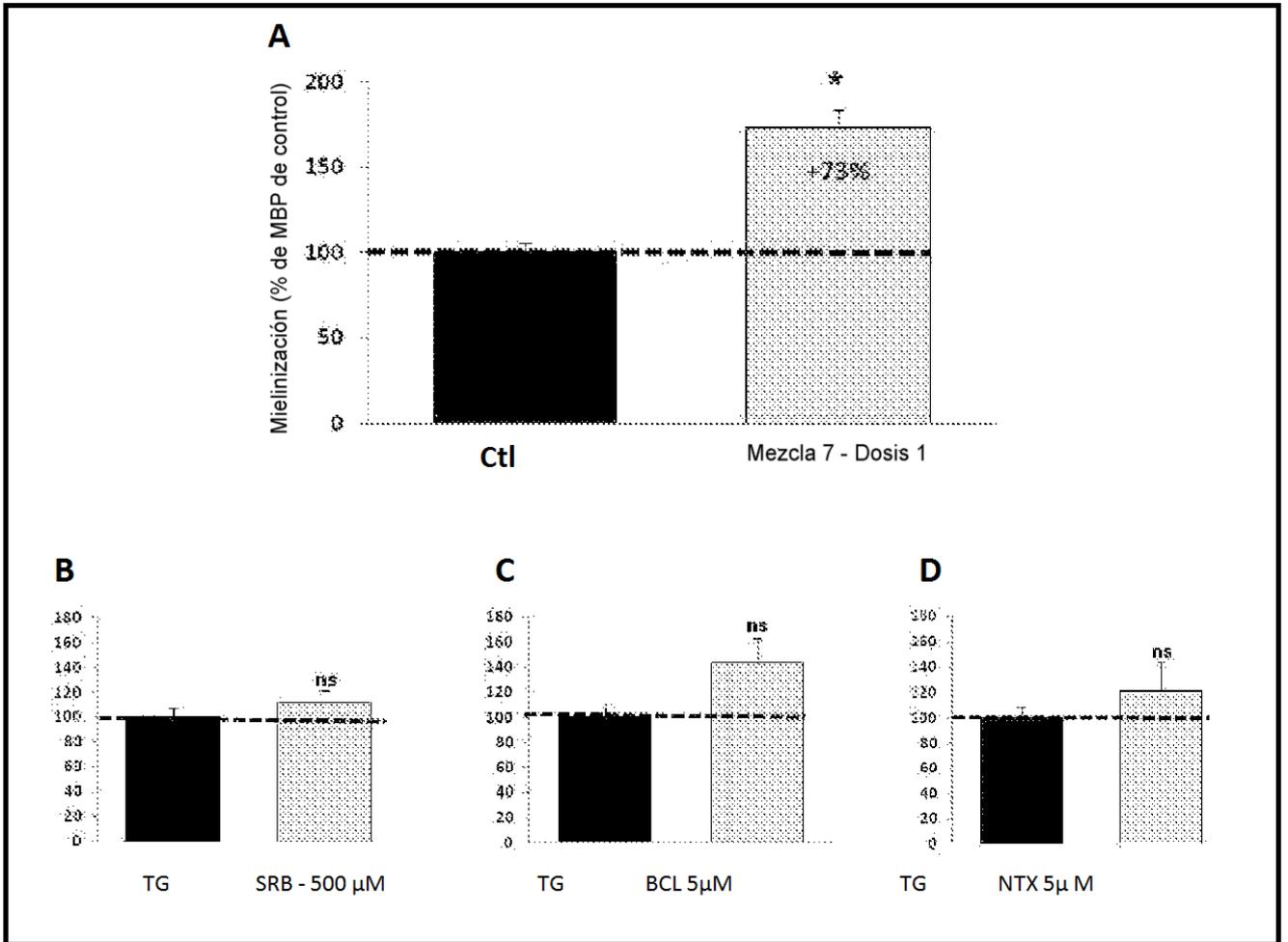
65 <400> 10

# ES 2 523 268 T3

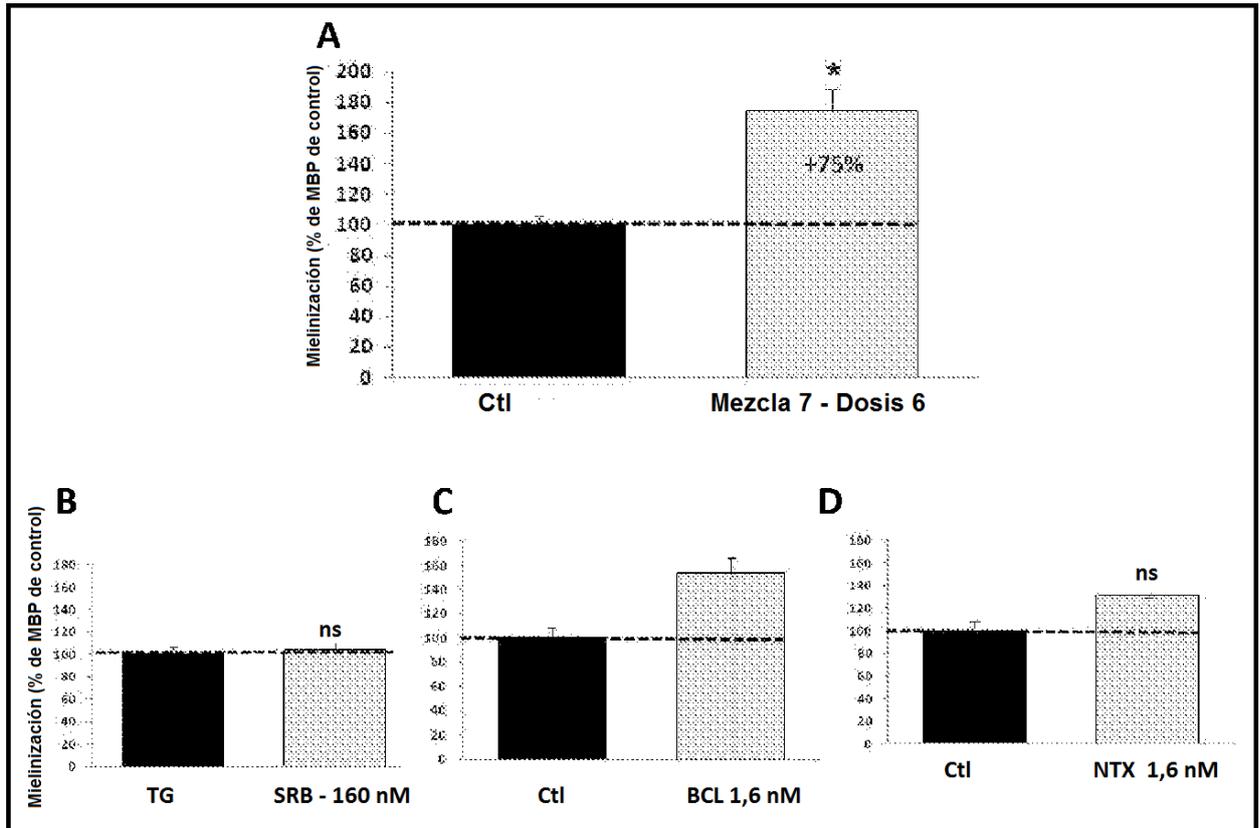
gcctcctgga aaaagggcc 19  
 <210> 11  
 <211> 19  
 5 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> PMP22- directo  
 10 <400> 11  
 tgtaccacat cgccttgg 19  
 15 <210> 12  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> PMP22 - inverso  
 <400> 12  
 25 gagctggcag aagaacagga ac 22  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> MPZ - directo  
 35 <400> 13  
 tgttgctgct gttgcttcc 20  
 <210> 14  
 40 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <223> MPZ - inverso  
 <400> 14  
 50 ttgtgaaatt tccccttctc c 21

**REIVINDICACIONES**

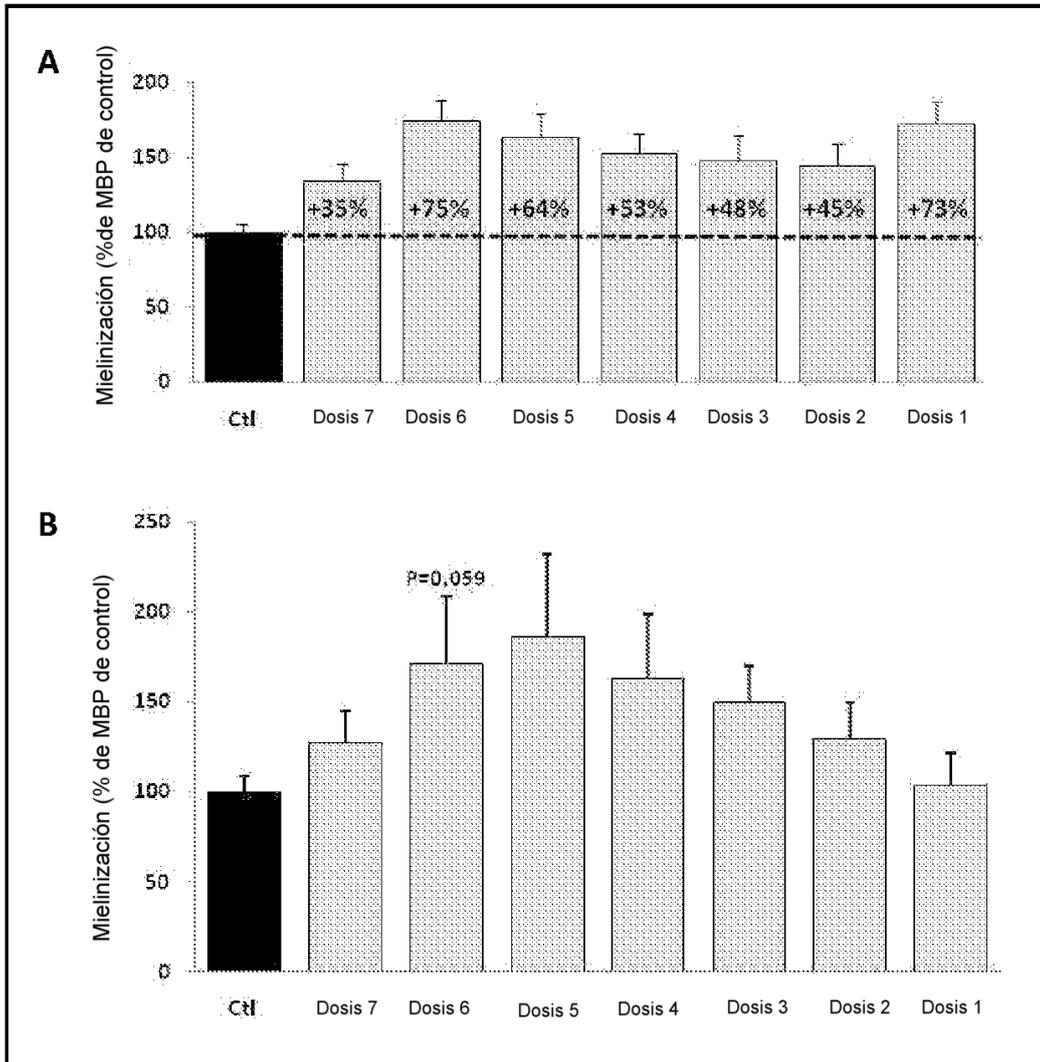
1. Una composición que comprende baclofeno, D-sorbitol y naltrexona, sus sales, enantiómeros o racematos, para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto mamífero.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un excipiente o vehículo farmacéuticamente adecuado.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dichos compuestos se formulan con una biomolécula, lípidos formadores de micelas o liposomas o emulsiones de aceite en agua o nanopartículas o micropartículas pegiladas o sólidas para la administración oral o parenteral o intratecal.
- 10 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una formulación líquida adecuada para la administración oral.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ("CMT"), una neuropatía tóxica o esclerosis lateral amiotrófica ("ELA") en un sujeto mamífero.
6. La composición de la reivindicación 5, para uso en el tratamiento de CMT1A en un sujeto mamífero.
- 15 7. La composición para uso de la reivindicación 5 o 6, en donde el sujeto mamífero es un sujeto humano.
8. Baclofeno, D-sorbitol y naltrexona, sus sales, enantiómeros o racematos, para la administración simultánea, separada o secuencial para uso en el tratamiento de una enfermedad de CMT, una neuropatía tóxica o ELA, a un sujeto mamífero.



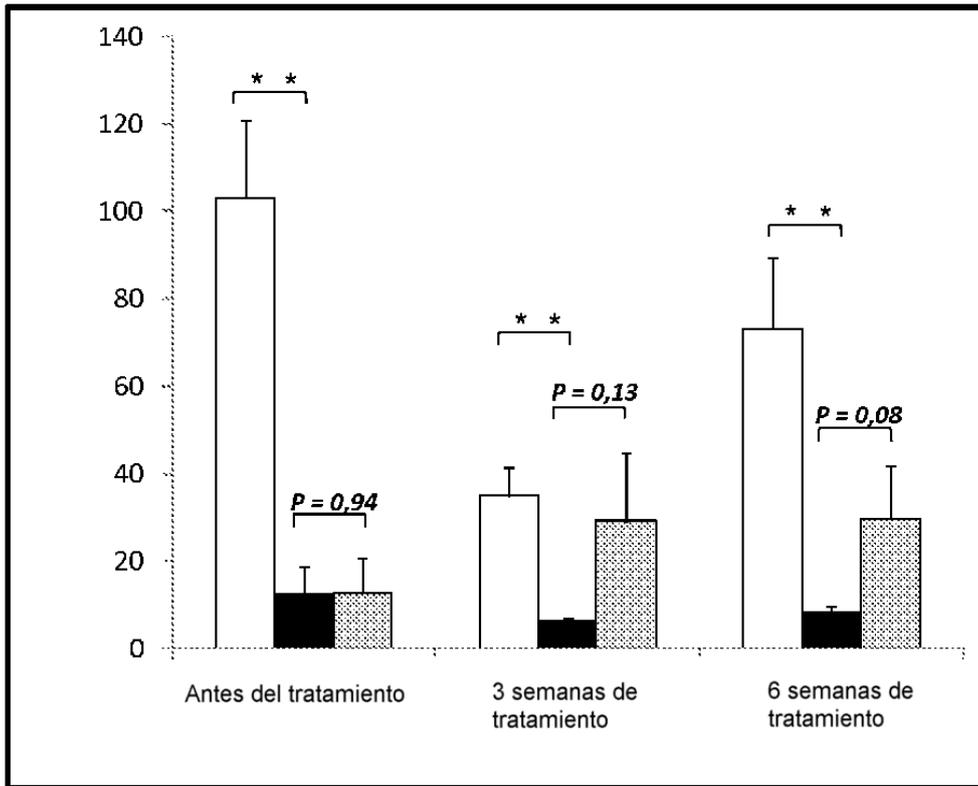
**Figura 1**



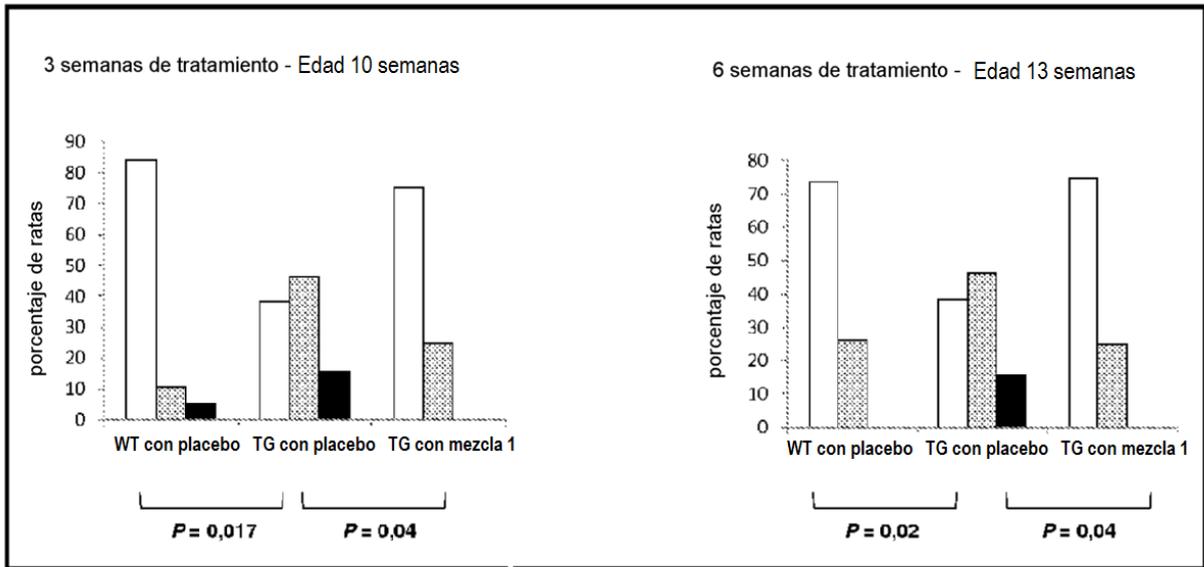
**Figura 2**



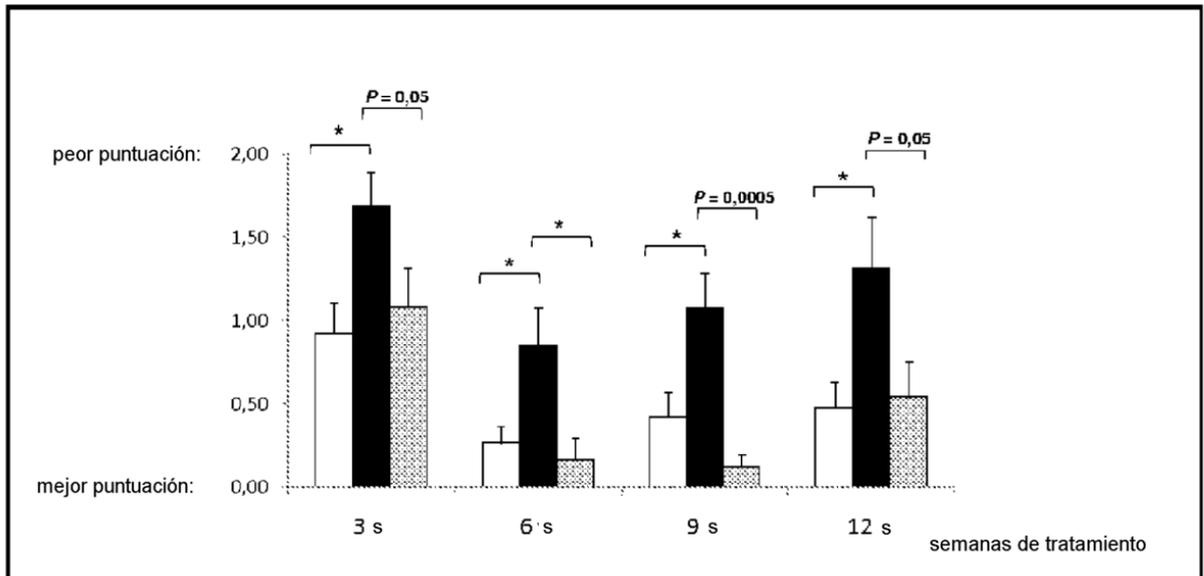
**FIGURA 3**



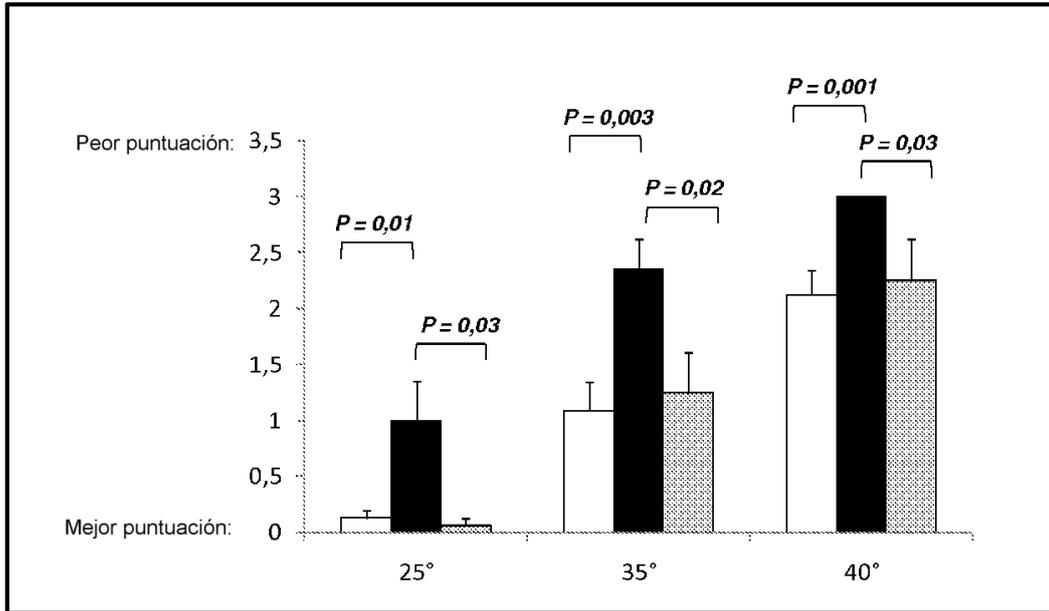
**Figura 4**



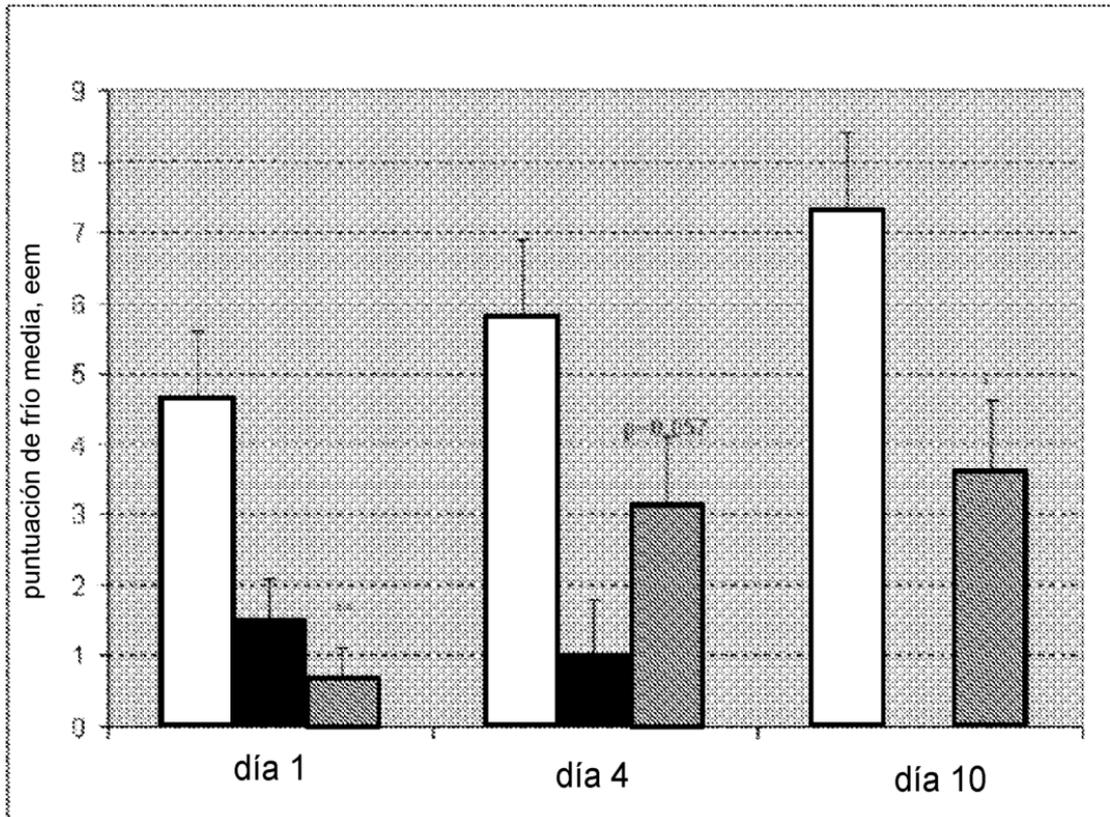
**Figura 5**



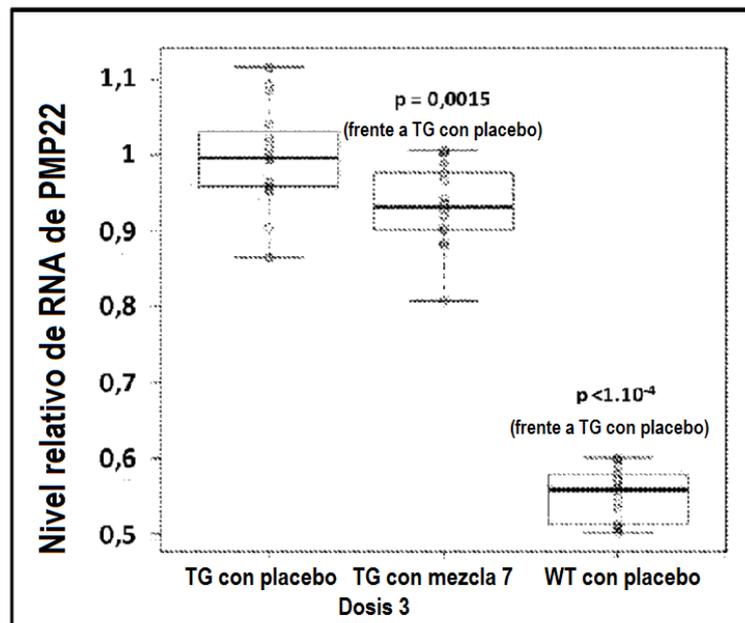
**Figura 6**



**Figura 7**



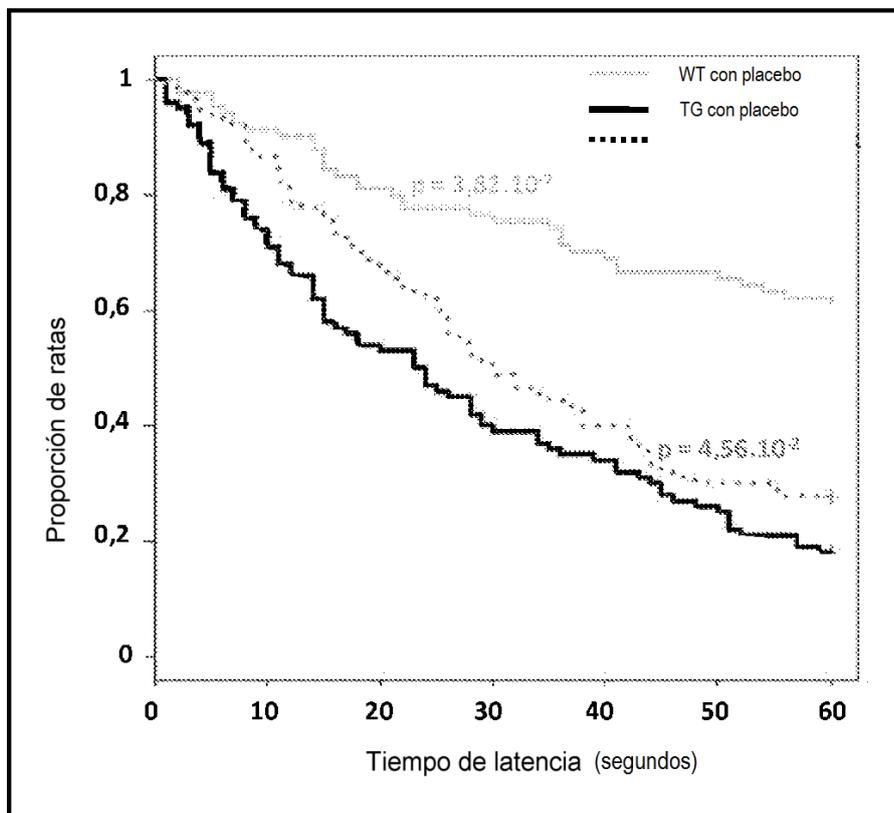
**Figura 8**



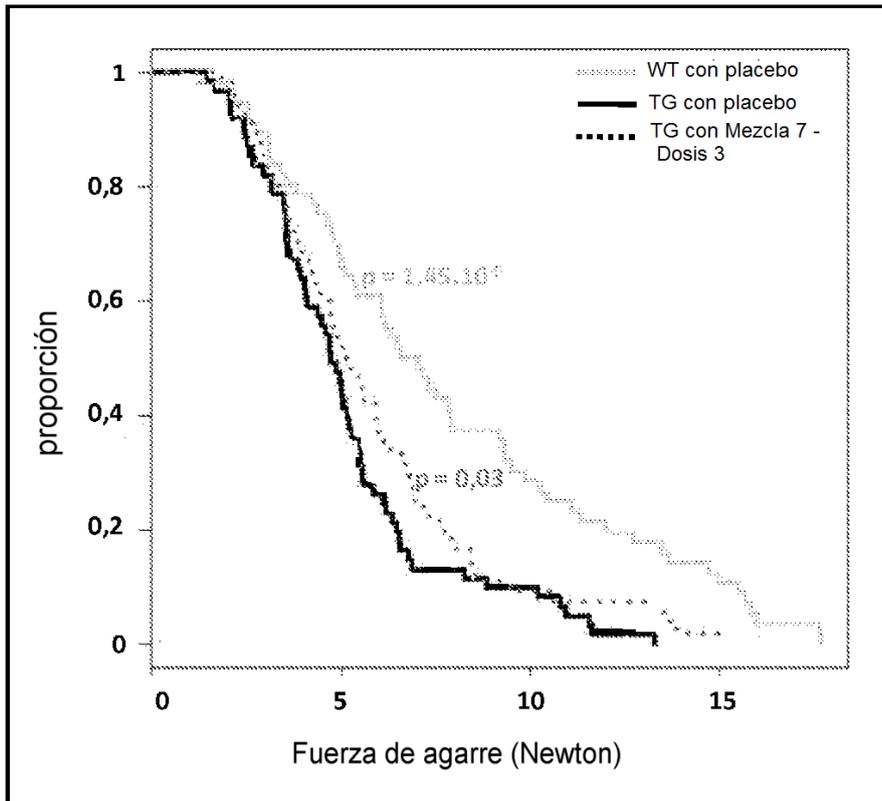
**Figura 9**

<b>Grupos de rendimientos en el ensayo del plano inclinado</b>				
	Puntuación baja	Puntuación intermedia	Puntuación buena	Valor de p (frente a TG con placebo)
WT con placebo	11 %	21 %	68 %	0,0003
TG con placebo	60 %	35 %	5 %	-
Mezcla 7 - dosis 2	29 %	41 %	29 %	0,0152
Mezcla 7 - dosis 3	11 %	56 %	33 %	0,0020

**Figura 10**



**Figura 11**



**Figura 12**

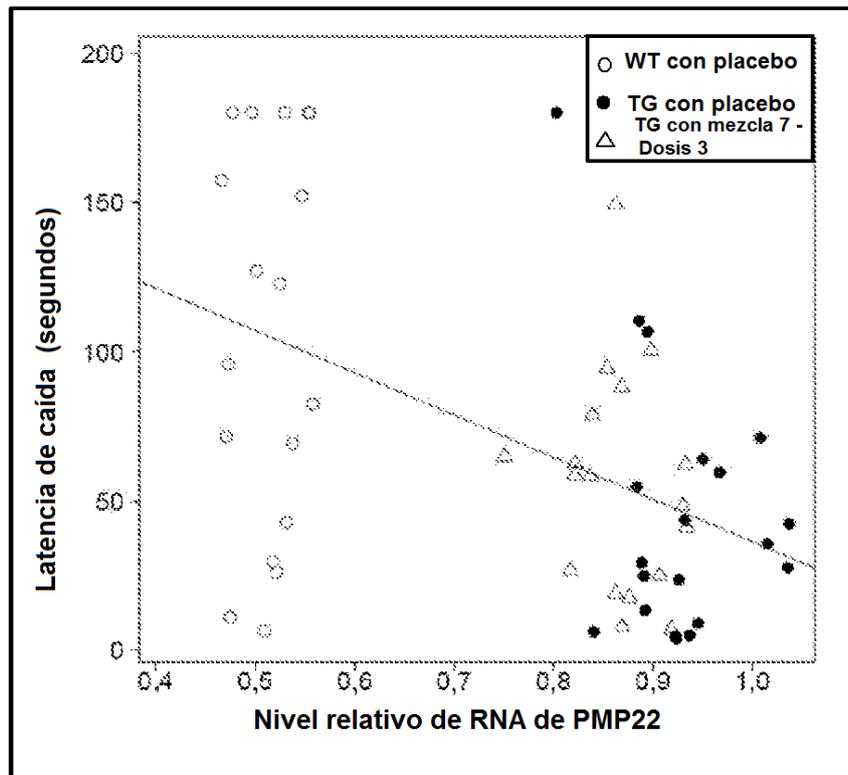
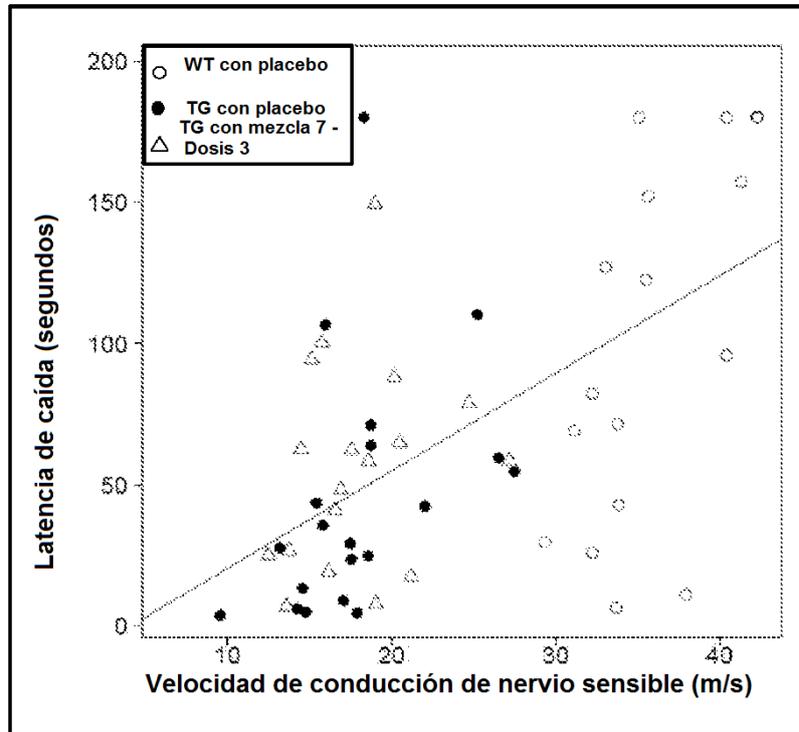


Figura 13



**Figura 14**