

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 110**

51 Int. Cl.:

G06F 19/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2008 E 08855314 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2225689**

54 Título: **Nuevo tratamiento de enfermedades por predicción de asociación de fármacos**

30 Prioridad:

30.11.2007 EP 07301609

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

05.05.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**COHEN, DANIEL y
CHUMAKOV, ILYA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

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

ES 2 535 110 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

Nuevo tratamiento de enfermedades por predicción de asociación de fármacos

5 La presente invención se refiere a métodos para el reposicionamiento de fármacos. Más en particular, esta invención se refiere a métodos para seleccionar fármacos aprobados para usar en nuevas indicaciones terapéuticas. Este planteamiento se encuentra en un cruce entre el reposicionamiento de fármacos y el tratamiento de enfermedades por combinaciones de fármacos con acción aditiva o sinérgica. La invención también permite definir fármacos o combinaciones de fármacos para tratar una necesidad médica insatisfecha en enfermedades desatendidas por la mayoría de las empresas farmacéuticas, tales como las enfermedades huérfanas.

10 Se han implementado muchas estrategias en las empresas farmacéuticas para identificar nuevos fármacos. Estos incluyen el cribado de bibliotecas combinatorias de farmacóforos químicos y cribado de alta capacidad de bibliotecas combinatorias de moléculas para determinar su actividad para una diana validada seleccionada o criterio de valoración fenotípico relevante de una enfermedad. Sin embargo, estos planteamientos no han permitido hasta ahora la identificación con suficiente grado de éxito de fármacos seguros y eficaces.

15 Michelson et al. (*Curr Opin Biotech* 17 (2006) 666) se refieren a un método de desarrollo de nuevas moléculas terapéuticas para enfermedades seleccionadas. Según este método, se produce un modelo farmacocinético de un fármaco para identificar una subpoblación que responde.

20 Otros procedimientos se basan en el reposicionamiento de fármacos, que se ha usado para encontrar nuevas indicaciones terapéuticas para fármacos aprobados (Ashburn y Thor, 2004). El reposicionamiento de fármacos es particularmente atractivo para las enfermedades huérfanas para las que los recursos son limitados (Rustin et al. 1999, De Leersnyder et al. 2003, Mercuri et al. 2004).

25 En relación con esto Bisson et al. (*PNAS* 104 (2007) 11927) se refieren a un método de "replanteamiento de fármacos" para el desarrollo de nuevos antagonistas no esteroideos del receptor de andrógenos humano. En este método, se identifican fármacos que se sabe que tienen como diana secundaria el receptor de andrógenos humano, se modifican para evitar cualquier acción en su diana principal, y se ensayan. Este planteamiento requiere la identificación de fármacos que tienen varias dianas. Este método también se basa en el fármaco, no en el modelo de enfermedad.

30 Por lo tanto, parece que las estrategias existentes usadas en el reposicionamiento de fármacos contienen varios inconvenientes que limitan su eficacia y capacidad de generar fármacos o combinaciones de fármacos eficaces. Estos inconvenientes están principalmente relacionados con el hecho de que el reposicionamiento de fármacos se ha orientado al fármaco (para encontrar un nuevo campo terapéutico para el fármaco antiguo) en lugar de orientado a la enfermedad (encontrar nuevas terapias basadas en fármacos antiguos aprobados).

35 La presente invención ahora describe un nuevo método de reposicionamiento de fármacos, que permite la identificación de combinaciones sinérgicas de fármacos clínicamente validados para tratar enfermedades objetivo. Siguiendo el presente método, los autores de la invención han tenido éxito en la identificación rápida de fármacos aprobados para tratar diferentes enfermedades seleccionadas, mostrando la eficacia e importancia biológica del cribado de fármacos propuesto.

Más específicamente, la presente invención se refiere a la materia objeto definida en las reivindicaciones adjuntas.

1. Un método de identificación de tratamientos combinatorios sinérgicos de una enfermedad seleccionada, comprendiendo el método las etapas de:

- 40 a) seleccionar una enfermedad que se va a tratar;
- b) construir un modelo dinámico de la enfermedad que comprende:
- (i) usar análisis estadístico genético, proteómico y metabolómico multivariado de grupos de genes y establecer rutas asociadas con la enfermedad implicadas en la génesis y evolución de la enfermedad, siendo dichas rutas asociadas con la enfermedad dianas para el desarrollo de fármacos;
- 45 (ii) ensayar los datos de (i) en la asociación integral de las rutas y validar los resultados en otro conjunto de datos; y
- (iii) organizar las rutas emergentes en un modelo jerárquico y definir los mecanismos o las dianas celulares más relevantes mediante los cuales se puede corregir la enfermedad;
- 50 c) cribado orientado a la enfermedad in silico de fármacos aprobados para otras enfermedades que se dirigen a las rutas más relevantes implicadas en el modelo de b);
- d) ensayar los fármacos seleccionados en c) solos o en combinación(es), en un molde biológico de la

enfermedad, para identificar combinaciones de fármacos aprobados biológicamente activos como candidatos para el tratamiento de dicha enfermedad seleccionada; y

5 e) seleccionar fármacos biológicamente activos identificados en d) según sus respectivas dianas en el modelo dinámico de la enfermedad definida en b), para definir tratamientos combinatorios sinérgicos que comprenden dichos fármacos.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el tratamiento combinatorio definido en e) comprende dosis bajas de fármacos seleccionados.

10 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad se selecciona de trastornos neurológicos, trastornos psiquiátricos, cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades cardiovasculares y enfermedades del metabolismo de lípidos, preferiblemente de enfermedades neurodegenerativas tales como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, neuropatías y cánceres.

4. El método de la reivindicación 3, en donde la enfermedad es la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

15 5. El método de la reivindicación 1 o 4, en donde el modelo dinámico de la enfermedad se construye mediante compilación de datos experimentales publicados que describen el fenotipo de la enfermedad a niveles genómico, bioquímico, celular y/o de organismo.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el modelo se obtiene combinando la información disponible en una ruta lógicamente respaldada implicada en la génesis y evolución de la enfermedad.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde a la etapa b) le sigue una etapa adicional de identificar rutas del modelo de la enfermedad que se podrían modular usando fármacos.

20 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la etapa c) comprende la selección de fármacos aprobados que se sabe que interactúan con una diana o ruta contenida en el modelo dinámico de la enfermedad.

25 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde los fármacos seleccionados en la etapa c) se ensayan, solos y en combinación(es), en un modelo in vitro y/o in vivo de la enfermedad, en donde los fármacos que afectan a la expresión de una diana o la evolución de la enfermedad en el modelo se seleccionan como combinación(es) de fármacos candidato(s).

30 Una ventaja importante de la invención, es que es un cribado de fármacos orientado a la enfermedad. Realmente, el método comprende primero una etapa de construcción de un modelo dinámico específico de la enfermedad seleccionada, que después permite un cribado preciso y relevante de fármacos aprobados para el tratamiento de esta enfermedad.

Selección de la enfermedad

35 La invención se puede usar para definir el tratamiento con fármacos adecuados para cualquier tipo de enfermedad, tal como trastornos neurológicos, trastornos psiquiátricos, cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del metabolismo de lípidos, etc. Los ejemplos específicos de dichas enfermedades incluyen trastornos neurodegenerativos, neuropatías y cánceres.

40 En una realización particular, la invención se usa para definir combinaciones de fármacos sinérgicas adecuadas, para tratar enfermedades huérfanas raras, y enfermedades comunes que no tienen satisfecha la necesidad terapéutica, tales como neuropatías, neuropatías diabéticas e inducidas por fármacos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y otras demencias, esquizofrenia, enfermedad bipolar, depresión mayor, etc.

En una realización más particular, la invención se usa para definir el tratamiento con fármacos adecuados para la enfermedad de CMT que es una polineuropatía periférica genética huérfana.

45 Enfermedad huérfana significa bien una enfermedad rara que tiene una prevalencia muy baja en la población (aproximadamente 5 por 10.000 o menos de 200.000 para un país como EE.UU.) o una enfermedad común que se ha ignorado (tal como la tuberculosis, cólera, fiebre tifoidea y malaria) porque es mucho más prevalente en países en desarrollo que en el mundo desarrollado. Estas enfermedades son desatendidas en gran medida por la mayoría de las compañías farmacéuticas.

50 La presente invención es particularmente adecuada para definir el tratamiento con fármacos de enfermedades multifactoriales o enfermedades que manifiestan heterogeneidad clínica debido a diferentes genes moduladores que actúan en rutas implicadas, incluso si la enfermedad tiene origen monogénico. Realmente, la modulación de la actividad de solo una proteína de estas rutas solo puede tener un efecto marginal debido a múltiples sucesos reguladores naturales. Por lo tanto, incluso si se sabe que una enfermedad es monofactorial, debe considerarse

como multifactorial desde un punto de vista terapéutico. En este caso, la combinación de varios fármacos será entonces más eficaz, en particular si se puede observar fenómeno sinérgico.

Construcción de un modelo dinámico de la enfermedad

5 El propósito de construir un modelo dinámico de la enfermedad es definir los mecanismos o dianas celulares más relevantes, por los cuales se puede influir o corregir la enfermedad. Este planteamiento experto representa una etapa esencial del método, proporcionando como resultado una lista de varios fármacos, incluyendo genéricos, aprobados para otras enfermedades, que se pueden ensayar, solos o en combinaciones, en modelos biológicos.

10 El fundamento de la minería de datos de los autores de la invención se basa en el supuesto de que incluso para el tratamiento de una enfermedad producida por mutaciones en un solo gen, se debería dirigir y restablecer la función de rutas subyacentes en lugar de intentar restablecer el propio gen causal. Este planteamiento consiste en usar tratamientos compensadores racionales que se dirigen a rutas celulares afectadas por el gen o genes mutantes, y que podrían ralentizar la evolución de las afecciones patológicas. Según este paradigma, la ruta asociada con la enfermedad o un grupo de rutas, en lugar del gen o genes aislados, son reconocidas como dianas para el desarrollo de fármacos. Ese planteamiento permite:

15 - Definir nuevas indicaciones terapéuticas para fármacos conocidos, cuando pueden modular la actividad de rutas relevantes para la enfermedad, y por lo tanto, encontrar una forma de modular la actividad de genes clave relacionados con la enfermedad para la cual no existen fármacos;

- Tratar varias rutas diferentes simultáneamente con el objetivo de conseguir un efecto aditivo por combinación de varios fármacos;

20 - Llevar a cabo este tratamiento combinatorio con dosis menores de los fármacos seleccionados disminuyendo así los riesgos de efectos secundarios.

25 La primera etapa para construir un modelo dinámico de la enfermedad comprende compilar datos experimentales publicados disponibles que describen el fenotipo de la enfermedad a niveles genómico, bioquímico, celular y de organismo. Los datos de asociación con el genoma completo disponibles ahora para muchas enfermedades representan el recurso más valioso para dicho análisis. La minería de estos datos se puede complementar después con información relevante extraída de bases de datos públicas o privadas tales como Thomson Pharma, FDA, DrugBank o Ingenuity.

30 Basándose en estos datos públicamente disponibles que describen mecanismos moleculares y manifestaciones patológicas de la enfermedad, toda la información disponible se vincula con rutas respaldadas lógicamente implicadas en la génesis y evolución de la enfermedad.

35 Con ayuda de la genética de poblaciones se pueden identificar las rutas alteradas mediante un análisis estadístico global de todos los SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) de una ruta implicada en el modelo de la enfermedad. Primero de todo se calculan las pruebas estadísticas no para los marcadores de SNP individuales, sino para grupos de marcadores situados en las regiones de los genes y sus flancos. Este planteamiento permitía controlar eficazmente el número de resultados falsos positivos. Se usó la variación de las diferencias alélicas de los SNP de todos los genes de una sola ruta dada que representa la combinación acumulada de múltiples cambios que raramente son significativos cuando se consideran solos, con el fin de demostrar la asociación de rutas con el fenotipo de la enfermedad. Realmente, la diferencia estadística global entre una ruta "normal" y una ruta "patológica" se hace significativa cuando se considera la combinación de todas las diferencias de frecuencia de SNP poco significativas. Como ejemplo para ilustrar el fundamento para considerar la combinación de variables vinculadas en una ruta íntegra, una proteína podría tener un nivel de expresión normal (es decir, el mismo en el paciente y controles) pero, en el contexto de la ruta alterada íntegra, su cantidad eficaz "relativa" podría ser de hecho anormal y este nivel de expresión aparentemente normal podría contribuir a la patología.

45 Después se determinan las rutas pertinentes para la acción terapéutica comparando las estadísticas de combinación de SNP de diferentes genes implicados en cada una de ellas. Por el mismo planteamiento, se deducen las rutas patológicas a partir del análisis de expresión diferencial del ARN usando muestras de enfermedad y de control citológicamente correspondientes y llevando a cabo análisis estadístico en rutas consideradas en lugar de genes expresados solos. Estos datos se comparan cruzándolos con estadísticas de asociación genética y se usan para validar después las rutas patógenas emergentes. Otros métodos de identificación de productos génicos tales como proteómica, metabolómica etc. son igualmente adecuados para identificar rutas de enfermedades y usar para combinar en una puntuación estadística final para establecer prioridades para etapas posteriores.

55 Para este objetivo, se usan métodos estadísticos multivariados tales como análisis de haplotipos complejos, modelos de regresión, análisis por grupos, reconocimiento de patrones, etc. El planteamiento de los autores de la invención consiste en ensayar todos los datos disponibles sobre asociación de rutas íntegras en lugar de la asociación de un solo marcador molecular (considerando la frecuencia alélica o genotípica para genes o diferencias de cantidad para ARN, proteínas o metabolitos).

5 Mediante la construcción de hipótesis biológicas iniciales que describen las funciones de rutas de señalización celulares particulares en el establecimiento del fenotipo de la enfermedad, después se pueden remarcar unos pocos módulos celulares funcionales como dianas para intervenciones terapéuticas relevantes. Estos módulos pueden ser, por ejemplo, la regulación de la expresión de genes, la maduración/degradación de una proteína o el control de una proliferación de tipo celular específico. Por lo tanto, basándose en este modelo dinámico de la enfermedad, se puede formular una propuesta de tratamientos combinatorios dirigidos a invertir este estado de la enfermedad.

10 Esquemáticamente, el planteamiento de los autores de la invención no consiste en el tratamiento de marcadores individuales, sino en el análisis estadístico de grupos de genes en las rutas, validación de estos resultados en otro conjunto de datos (p. ej., datos de transcriptoma) y organización de rutas emergentes en un modelo jerárquico para el cribado in silico de potenciales moléculas pequeñas reguladoras.

Cribado in silico de fármacos que se dirigen al modelo dinámico

15 Una vez que se ha establecido un modelo de la enfermedad, se puede llevar a cabo un cribado de fármacos, virtual, es decir, in silico, típicamente asistido por ordenador, que afectan al modelo. En una realización preferida, el cribado se hace a partir de una biblioteca de fármacos aprobados, incluyendo genéricos. Realmente, la pleiotropía de proteínas, que significa que una sola proteína puede tener varias funciones diferentes, podría explicar en parte la toxicidad de fármacos incluso para moléculas muy específicas, pero también podría conducir a la posibilidad de reusar la misma molécula para múltiples indicaciones diferentes.

20 Dichas bibliotecas están disponibles, tales como LOPAC1280™ (Sigma Aldrich, http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Intercst/Chemistry/Drug_Discovery/Validation_Libraries/Lopac1280home.html), la UWCCC Small Molecule Screening Facility de la Universidad de Wisconsin (<http://hts.wisc.edu/Libraries.htm>), la Spectrum Collection, la US Drug Collection o la NINDS Collection de MicroSource Discovery Systems, Inc. (<http://www.msdiscovery.com/>).

Típicamente, el cribado comprende la selección de fármacos que se sabe que interactúan con una diana o ruta contenida en el modelo dinámico de la enfermedad.

25 En una realización preferida, el cribado se hace de fármacos que se dirigen a módulos celulares funcionales identificados como relevantes para intervenciones terapéuticas durante la etapa precedente.

Con el fin de definir posibles combinaciones y acciones, se presuponen hipótesis sobre el uso y el efecto de dichos fármacos seleccionados basándose en sus actividades conocidas, y en los posibles efectos sinérgicos según las respectivas dianas de estos fármacos.

30 La realización de estas etapas produjo fácilmente una primera lista de fármacos genéricos y combinaciones de los mismos, para ensayar en modelos biológicos de la enfermedad.

Ensayo en modelos biológicos

35 El ensayo típicamente se lleva a cabo en un modelo de la enfermedad in vitro (p. ej. celular) y/o in vivo (p. ej., animal transgénico). El ensayo in vitro se usa para la evaluación inicial de la potencial eficacia de fármacos aprobados seleccionados, p. ej., para modular los niveles de expresión de una diana relevante del modelo de enfermedad. Esto se puede ensayar mediante una serie de planteamientos conocidos en la técnica, usando cultivo celular y sistemas de lectura adecuados.

40 Se ensayan fármacos, que muestran actividad individualmente, como combinaciones, en diferentes concentraciones, con el fin de encontrar efectos sinérgicos. La combinación de los fármacos produce una matriz de múltiples mezclas, que contienen fármacos tanto en una variedad de concentraciones como de proporciones. El análisis de los resultados obtenidos con las combinaciones y de forma individual se lleva a cabo por programas de ordenador tales como el software CalcuSyn. Este programa permite discriminar entre las combinaciones que proporcionan efecto equivalente (aditivo), peor (antagonismo) o más que aditivo (sinergia).

45 En una realización, cada compuesto de ensayo se pone en contacto, solo o en combinación, con un cultivo celular que expresa la diana de interés, y se mide el efecto de dicho contacto.

En una realización, el estudio de compuestos de ensayo valiosos se complementa por experimentos con micromatrices (Vigo 2005; Shworer 2003). Estos experimentos también pueden ayudar a poner de manifiesto nuevas rutas moleculares a las que se pueden dirigir los fármacos.

50 El método de la invención también puede comprender una etapa adicional para confirmar el estudio in vitro que consiste en volver a ensayar los fármacos y combinaciones con éxito en un "entorno patológico" específico, tal como células aisladas de un modelo animal transgénico de la enfermedad seleccionada. Esta etapa asegura que los fármacos activos en células normales todavía son operativos en células del modelo de enfermedad.

Los compuestos o combinaciones de compuestos que modulan en más de 10%, 20% o preferiblemente 50% la

expresión de la diana, se seleccionan y se pueden usar para ensayos adicionales in vivo usando modelos animales de la enfermedad.

5 En una realización particular, los estudios in vivo adicionales de confirmación se pueden llevar a cabo para ensayar la eficacia del fármaco o combinación de fármacos a nivel del organismo, para determinar el mejor modo de administración, y si es necesario, llevar a cabo análisis farmacocinéticos iniciales para las mezclas de fármacos resultantes. Todas estas etapas se realizan con el fin de obtener fármacos o combinaciones de reposición validados.

El modelo animal para los estudios in vivo puede estar ya disponible o puede crearse para este ensayo de acuerdo con técnicas bien conocidas por un experto en la técnica.

10 En una realización, cada compuesto de ensayo seleccionado se administra, solo o en combinación, a un modelo de animal transgénico de la enfermedad seleccionada y se mide el efecto biológico.

En una realización preferida, el efecto biológico es la modulación de la expresión de un gen diana.

15 Dependiendo del tipo de tratamiento se aplican diferentes ensayos estadísticos para el análisis de datos. Los datos obtenidos con los fármacos individuales se someten a ANOVA seguido de ensayos de comparación múltiples. Para los datos obtenidos con fármacos administrados en combinaciones, se evalúa sistemáticamente una búsqueda de actividad aditiva o supraaditiva, usando uno de los planteamientos más usados en el campo: el método del índice de combinación (Chou et al. 1984, con el software CalcuSyn de Biosoft, Ferguson, MO) o análisis SSI (Lopez-Munoz, 1994) o el método isoblográfico (Tallarida et al. 1989, 1997).

20 Se seleccionan compuestos o combinaciones de compuestos que modulan más de 10%, 20% o preferiblemente 50% de la expresión de la diana o que producen un efecto terapéutico estadísticamente significativo en el modelo animal.

Como se ha descrito antes, la invención permite el reposicionamiento de fármacos aprobados para usar en nuevas indicaciones terapéuticas. Este método eficaz y biológicamente relevante se puede usar para el reposicionamiento de fármacos para cualquier tipo de enfermedad y se cree que la presente solicitud proporciona una nueva estrategia para abordar necesidades médicas no satisfechas.

25 Los siguientes ejemplos se dan con fines ilustrativos y no a modo de limitación.

Ejemplo 1. Reposicionamiento de fármacos en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT)

1.1: Selección de la enfermedad: La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT)

30 La enfermedad de CMT es una polineuropatía periférica genética huérfana. Afecta a aproximadamente 1 de 2.500 individuos, siendo esta enfermedad el trastorno hereditario más común del sistema nervioso periférico. Su inicio típicamente se produce durante la primera o segunda década de vida, aunque se puede detectar en la infancia. La evolución de la enfermedad es crónica con degeneración neuromuscular gradual. La enfermedad es incapacitante con casos que van acompañados de dolor neurológico e incapacidad muscular extrema. La CMT es una de las patologías genéticas mejor estudiadas con aproximadamente 30.000 casos en Francia. Se han implicado dos docenas de genes en diferentes formas de esta enfermedad, pero la mayoría de los pacientes (forma CMT1A) albergan una duplicación de un fragmento del cromosoma 17 que contiene un gen de la mielina importante: PMP22. Aunque es de origen monogénico, esta patología manifiesta heterogeneidad clínica debido a posibles genes moduladores.

40 Existen varios modelos animales para esta enfermedad. En uno de ellos (ratón con exceso de expresión de PMP22 condicional), la enfermedad se invierte una vez que se ha normalizado la expresión de PMP22. Los genes mutados en los pacientes con CMT se agrupan alrededor de rutas moleculares estrechamente conectadas que afectan a la diferenciación de células de Schwann o neuronas o que cambian la interacción de estas células en los nervios periféricos. Se mostró que bloqueadores del receptor de progesterona y el ácido ascórbico mejoran las características clínicas en los modelos animales de CMT.

45 Están en marcha al menos tres ensayos clínicos humanos para terapia con dosis grandes de vitamina C. Todavía es difícil esperar que esta molécula sola pudiera ser muy eficaz y universal en el tratamiento de esta neuropatía. Encontrar moléculas que regulen por disminución PMP22 o moléculas que compensen el efecto del exceso de expresión de PMP22 requerirá la acción en diferentes rutas.

1.2: Construcción de un modelo dinámico de la enfermedad de CMT

50 La CMT1A se podría definir como una enfermedad de dosis de genes provocada por el exceso de expresión más bien modesto, de 1,5 veces de una proteína PMP22 normal en células de Schwann heterocigotas para la duplicación (en algunos casos raros, el fenotipo de tipo CMT1A también puede conectarse con mutaciones estructurales en la proteína PMP22) (Lupski et al., 1992; Suter et al., 1992; Roa et al., 1993; Thomas et al., 1997; Suter y Scherer, 2003; Nave y Sereda, 2007). Esta conclusión está apoyada por una serie de observaciones clínicas y

- experimentales. Primero, la duplicación genómica homocigótica conduce a una forma más agravada de la enfermedad, mientras que individuos con una eliminación del gen PMP22 (haploinsuficiencia) desarrollan una forma de la enfermedad más leve (HNPP) (Lupski et al., 1991; Chance et al., 1993; Li et al., 2004). La prueba directa de que la administración del gen PMP22 anormal es suficiente para causar un fenotipo similar a CMT1A se proporcionó mediante experimentos transgénicos en modelos de roedores con exceso de expresión de la proteína PMP22 (Niemann et al., 1999; Perea et al., 2001; Robaglia-Schlupp et al., 2002; Meyer et al., 2006; Sereda y Nave, 2006). Por consiguiente, las intervenciones terapéuticas que disminuyen esta expresión en los animales transgénicos mejoraban o ralentizaban el avance del fenotipo de la enfermedad (Sereda et al., 2003; Passage et al., 2004; Meyer zu Horste et al., 2007).
- Los datos experimentales existentes indican que la proteína PMP22 no es solo componente estructural de las vainas de mielina, sino que tiene también una función reguladora en las células de Schwann. El mecanismo exacto que conecta el nivel anómalo de la proteína con una modificación de sus funciones en una célula glial de CMT1A mutante no se entiende del todo, pero están empezando a surgir algunos mecanismos celulares que explican sus efectos perjudiciales en la biología de las células de Schwann.
- Así pues, la proteína PMP22 interacciona con otra proteína estructural de la mielina P0, y por lo tanto, la relación de proteínas PMP22/P0 alterada puede influir en la compactación de las vainas de mielina (Vallat et al., 1996; D'Urso et al., 1999). Como se demostró mediante estudios *in vitro*, la proteína PMP22 también está implicada en la regulación de la expansión de células en una forma dependiente de Rho y por lo tanto podría afectar a la formación de vainas de los axones (Brancolini et al., 1999). Además, PMP22 forma complejos con integrinas $\alpha 6 \beta 4$ y podría mediar la interacción de las células de Schwann con la matriz extracelular (Amici et al., 2006; Amici et al., 2007). Puesto que la señalización de integrinas es crucial para el desarrollo adecuados de los axones mielinizados, la modificación de los complejos de integrina por la proteína PMP22 en las células de Schwann en la forma CMT1A podría ser otro mecanismo celular que contribuye a sus acciones patológicas (Feltri et al., 2002; Berti et al., 2006). Es interesante que los nervios desmielinizados en los pacientes con CMT1A tienen una composición anormal de la matriz extracelular, señalando que las interacciones de las células de Schwann-matriz extracelular anormales pueden estar estrechamente relacionadas con un desarrollo del fenotipo de la enfermedad (Palumbo et al., 2002). Además, el nivel aumentado de la proteína PMP22 puede alterar la ruta de reciclado de endosomas de la membrana plasmática regulada por Arf6 y conducir a la acumulación de PMP22 en los endosomas tardíos (Chies et al., 2003). También se demostró, tanto en células cultivadas como *in vivo* en ratones transgénicos, que la proteína PMP22 expresada en exceso forma agregados de proteína ubiquitinada intracelular. Estos descubrimientos indican que la proteína PMP22 expresada en exceso está mal plegada, altera la clasificación de proteínas intracelulares y sobrecarga la maquinaria de degradación de proteínas en las células de Schwann (Notterpek et al., 1997; Tobler et al., 2002; Fortun et al., 2003; Fortun et al., 2006; Fortun et al., 2007; Khajavi et al., 2007).
- En todos los roedores con PMP22 mutante, con dosis del gen PMP22 aumentadas o disminuidas o mutaciones puntuales que afectan al gen PMP22, se detectaron una mayor proliferación y apoptosis de células de Schwann que demostraba que la señalización por la proteína PMP22 alterada está directamente implicada en el control de la proliferación celular y muerte celular programada (Sancho et al., 2001; Atanasoski et al., 2002). Finalmente, se mostró que la proteína PMP22 mutante provoca una reorganización profunda y la expresión aberrante de los canales iónicos axonales (Ulzheimer et al., 2004; Devaux y Scherer, 2005).
- La hipótesis de trabajo de los autores de la invención postula que una amplia variedad de defectos subcelulares inducidos por la proteína PMP22 expresada en exceso (o mutante) en células de Schwann, incluyendo, pero no limitado a la mielinización anómala, podría alterar la interacción axón-glia necesaria para la función y supervivencia de axones. Esto finalmente conduce a la pérdida de axones, la característica patológica clínicamente más relevante compartida por todas las subformas de la enfermedad de CMT.
- Es interesante que además de la biología de las células de Schwann e interacciones axón-glia alteradas, recientemente se ha demostrado la posibilidad de la implicación del sistema inmunitario en la patología de la CMT1. En concreto, se confirmó una función patológica de los linfocitos CD8+ y macrófagos que infiltran nervios desmielinizados en modelos de ratones, donde manipulaciones genéticas que eliminaban linfocitos T funcionales o disminuían la activación de macrófagos, reducían sustancialmente la patología de la mielina (Mäurer et al., 2002; Kobsar et al., 2005). Aunque la posibilidad de la implicación del sistema inmunitario en la desmielinización en seres humanos no se ha evaluado sistemáticamente, estos datos proporcionan directrices útiles para futuros estudios clínicos en pacientes de CMT.
- La minería de datos públicamente disponibles, que describen mecanismos moleculares y manifestaciones patológicas de la enfermedad de CMT1A, permite priorizar unos pocos módulos celulares funcionales, regulación transcripcional del gen PMP22, plegado/degradación de la proteína PMP22, proliferación y apoptosis de células de Schwann, deposición y remodelado de la ECM, respuesta inmunitaria, como dianas para intervenciones terapéuticas relevantes para la CMT. Por ejemplo, la regulación transcripcional por disminución del gen PMP22 representa una estrategia razonable para el tratamiento terapéutico de pacientes con CMT1A (Sereda et al., 2003; Passage et al., 2004). Datos experimentales apoyan la prueba de que la expresión de la proteína PMP22 es regulada por la progesterona nuclear y receptores glucocorticoides y por los receptores de GABA A y GABA B en células de

Schwann de ratas (Robert et al., 2001; Schumacher et al., 2001; Melcangi et al., 2005). Experimentos de prueba de concepto con el antagonista del receptor de progesterona onapristona en un modelo de rata de CMT1A transgénica para PMP22 mostró que el tratamiento con antiprogesterina disminuía la expresión de la proteína PMP22 en roedores transgénicos y mejoraba significativamente síntomas clínicos en animales tratados con fármacos comparado con controles tratados con placebo (Meyer zu Horste et al., 2007).

1.3: Cribado virtual de fármacos aprobados que se dirigen al modelo dinámico de la enfermedad de CMT

En el caso de la CMT, se ha seguido la construcción inicial del modelo dinámico de patología de CMT por una selección de fármacos genéricos comercializados dirigidos a la regulación funcional de rutas celulares relevantes para la enfermedad de CMT1A.

En este contexto, se seleccionaron varios fármacos genéricos, antagonistas/agonistas que regulan directamente la actividad de receptores de progesterona, fármacos que modulan la síntesis de esteroides, ligandos naturales para receptores nucleares y de GABA A o fármacos que afectan al estado conformacional de complejos de receptores nucleares y su interacción con ligandos, como candidatos prometedoros para el ensayo experimental (Le Bihan et al., 1998; Magnaghi et al., 2006).

Otro modo factible de controlar la transcripción del gen PMP22 es la modulación del conjunto de cAMP intracelular en las células de Schwann. Se demostró *in vitro* que la exposición de las células de Schwann a la forskolina aumenta la expresión de la proteína PMP22; además, se identificó un elemento silenciador, que inhibe la actividad transcripcional en ausencia de la estimulación del cAMP, en la región promotora del gen PMP22 (Sabéran-Djoneidi et al., 2000). El modelo de los autores de la invención también sugería que se puede explorar la modulación farmacéutica de los receptores expresados en células de Schwann y que se sabe que regulan el nivel intracelular de cAMP (p. ej., receptores adrenérgicos o receptores muscarínicos), para la regulación transcripcional de la proteína PMP22 (Yasuda et al., 1988; Loreti et al., 2006; Kaya et al., 2007). En el siguiente nivel, la quinasa GSK-3 β tiene una función principal en el control transcripcional de la proteína PMP22 a través de la regulación de la β -catenina, que sirve como un coactivador para el receptor de glucocorticoides que sustituye la CBP en células de Schwann (Fonte et al., 2005). El estado de fosforilación y, respectivamente, la actividad de la GSK-3 β quinasa se podrían modificar por varias rutas de señalización incluyendo los receptores adrenérgicos, serotoninérgicos y muscarínicos y proteína quinasa activada por AMP, para todos los cuales existen fármacos genéricos moduladores.

También se llevó a cabo la minería de datos similar para seleccionar fármacos genéricos que afectan otros procesos celulares alterados por la expresión aumentada de la proteína PMP22. Estos procedimientos están situados en rutas corriente abajo de la función de la proteína PMP22 y se podrían ensayar experimentalmente directamente en modelos animales de neuropatía.

El cribado general dio 46 fármacos para ensayar en la siguiente etapa.

1.4: Ensayo en modelos biológicos

En el ejemplo específico de la CMT, se han llevado a cabo estudios *in vitro* para ensayar fármacos aprobados por su eficacia potencial para modular los niveles de expresión de PMP22. Como criterio de valoración principal para estos experimentos, se estaba buscando la expresión del gen PMP22 y varios otros marcadores de mielinización después de tratamiento de cultivos de células de Schwann con fármacos elegidos.

Este estudio se llevó a cabo en un cultivo de células de Schwann (SC) de ratas sin manipulación genética primarias. El modelo de cultivo de SC se ha usado para estudiar la modulación de la expresión de proteínas de mielina durante procesos de proliferación y diferenciación de SC (Morgan 1991; Clive 1998; Ogata 2004), las rutas moleculares que controlan la expresión de PMP22 (Magnaghi 2001, 2004) o las regulaciones transcripcionales y postranscripcionales de PMP22 y capacidad de formación de agregomas (Bosse 1999; Ryan 2002; Fortun 2007; Nobbio 2004; Notterpeck 1999; Felitsyn 2007). Todos juntos, estos resultados impulsan a los autores de la invención a elegir el modelo sencillo con el fin de cribar la influencia de los fármacos seleccionados en la expresión de PMP22.

Se ensayaron 37 fármacos seleccionados en el modelo de cultivo celular de los autores de la invención. Se cultivaron células de Schwann en un medio definido para promover la diferenciación, que es esencial para la expresión de la proteína mielina (Morgan 1991).

Después de incubar las SC con fármacos, se extrajo el ARN total y se cuantificaron los niveles de ARNm de PMP22 usando sondas fluorescentes específicas Roche LightCycler® (sistema FRET). La modulación de los niveles de ARNm de PMP22 se normaliza en relación con la expresión del marcador del gen de "mantenimiento". Todas las condiciones de cultivo celular así como las cuantificaciones se hacen por triplicado.

En los casos en los que los fármacos ensayados individualmente no disminuyen los niveles de ARNm de PMP22, se combinan y ensayan como combinaciones suponiendo que todavía podrían actuar de forma sinérgica.

En conclusión, de los 37 fármacos ensayados, 11 eran positivos y disminuyeron eficazmente la expresión de

PMP22, 4 fármacos han mostrado una tendencia a la regulación por disminución estadísticamente significativa de la expresión de PMP22 y 5 fármacos eran capaces de regular por aumento la expresión de PMP22. Estos resultados (tabla 1) muestran que la estrategia propuesta es particularmente eficaz y relevante, puesto que aproximadamente 30% de los fármacos que resultan del cribado virtual resultó que realmente expresaban la actividad biológica relevante.

5

| | |
|--|----|
| Fármacos totales | 46 |
| Ensayados in vitro | 37 |
| Regulados por disminución in vitro | 11 |
| Tendencia a la regulación por disminución in vitro | 4 |
| Regulados por aumento in vitro | 5 |

Tabla 1. Resumen de los ensayos de fármacos

En la siguiente etapa, se ensayaron algunos de los compuestos en un modelo in vivo de rata de neuropatía CMT1A (Sereda et al., 1996). En el ensayo de comportamiento de la barra, los compuestos seleccionados demostraron una mejora significativa comparado con animales transgénicos con placebo.

10 Ejemplo 2. Reposicionamiento de fármacos en la enfermedad de Alzheimer (EA)

En otro ejemplo de modelo, se ha llevado a cabo la construcción de un análisis integral de la patología de la enfermedad de Alzheimer. Se han identificado cuatro rutas diferentes. El cribado in silico dio 85 moléculas candidatas distintas, de las cuales 11 se habían estudiado en el modelo celular de muerte de axones inducida por el péptido amiloide Abeta, conduciendo a la selección de fármacos candidato. En este procedimiento, más de 25% de los fármacos ensayados eran positivos.

15

Bibliografia

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

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

Ashburn TT, Thor KB. Drug repurposing: identify, develop and commercialize new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3(8):673-683.

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.

Bosse F, Brodbeck J, Müller HW. Post-transcriptional regulation of the peripheral myelin protein gene PMP22/gas3. *J Neurosci Res.* 1999; 55 (2): 164-177.

Berti C, Nodari A, Wrabetz L, Feltri ML. Role of integrins in peripheral nerves and hereditary neuropathies. *Neuromolecular Med.* 2006; 8(1-2):191-204.

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.

Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, Swanson PD, Odelberg SJ, Distèche CM, Bird TD. DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* 1993; 72(1):143-151.

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.

Chou T-C, Talalay P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends Pharmacol Sci* 1983; 4:450–454.

Clive DR, Lopez TJ, DeVries GH. Quantitation of changes in P0 mRNA by polymerase chain reaction in primary cultured Schwann cells stimulated by axolemma-enriched fraction. *J Neurosci Methods.* 1998; 81 (1-2): 25-34.

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.

De Leersnyder H, Bresson JL, de Blois MC, Souberbielle JC, Mogenet A, Delhotal-Landes B, Salefranque F, Munnich A. Beta 1-adrenergic antagonists and melatonin reset the clock and restore sleep in a circadian disorder, Smith-Magenis syndrome. 2003. *J Med Genet.* 40(1):74-78.

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.

Felitsyn N, Stacpoole PW, Notterpek L. Dichloroacetate causes reversible demyelination in vitro: potential mechanism for its neuropathic effect. *J Neurochem.* 2007; 100 (2): 429-436.

Feltri ML, Graus Porta D, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Cassetti A, Littlewood-Evans A, Reichardt LF, Messing A, Quattrini A, Mueller U, Wrabetz L. Conditional disruption of $\beta 1$ integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J. Cell Biol.* 2002; 156: 199–209.

Fonte C, Grenier J, Trousson A, Chauchereau A, Lahuna O, Baulieu EE, Schumacher M, Massaad C. Involvement of {beta}-catenin and unusual behavior of CBP and p300 in glucocorticosteroid signaling in Schwann cells. *PNAS U S A.* 2005; 102(40): 14260-14265.

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, 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.

ILAR Journal (ISSN 1084-2020) 2002 special issue Experimental Design and Statistics in Biomedical Research Volume 43, Number 4

Kaya F, Belin S, Bourgeois P, Micallef J, Blin O, Fontes M. Ascorbic acid inhibits PMP22 expression by reducing cAMP levels. *Neuromuscul Disord.* 2007; 17(3): 248-253.

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(6): 857-864.

Le Bihan S, Marsaud V, Mercier-Bodard C, Baulieu EE, Mader S, White JH, Renoir JM. Calcium/calmodulin kinase inhibitors and immunosuppressant macrolides rapamycin and FK506 inhibit progestin- and glucocorticosteroid receptor-mediated transcription in human breast cancer T47D cells. *Mol Endocrinol.* 1998; 12(7): 986-1001.

Li J, Krajewski K, Lewis RA, Shy ME. Loss-of-function phenotype of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Muscle Nerve.* 2004; 29(2): 205-210.

Lopez-Munoz FJ, Villalon CM, Terron JA, Salazar LA. Analgesic interactions produced by combinations of dipyron and morphine in the rat. *Proc West Pharmacol Soc.* 1994; 37: 17-19.

Loreti S, Vilaró MT, Visentin S, Rees H, Levey AI, Tata AM. Rat Schwann cells express M1-M4 muscarinic receptor subtypes. *J Neurosci Res.* 2006; 84(1): 97-105.

Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, Chakravarti A, Patel PI. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell.* 1991; 66(2):219-232.

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.

Magnaghi V, Ballabio M, Cavarretta IT, Froestl W, Lambert JJ, Zucchi I, Melcangi RC. GABAB receptors in Schwann cells influence proliferation and myelin protein expression. *Eur J Neurosci.* 2004; 19 (10): 2641-2649.

Magnaghi V, Ballabio M, Consoli A, Lambert JJ, Roglio I, Melcangi RC. GABA receptor-mediated effects in the peripheral nervous system: A cross-interaction with neuroactive steroids. *J Mol Neurosci.* 2006; 28(1):89-102.

Magnaghi V, Cavarretta I, Galbiati M, Martini L, Melcangi RC. Neuroactive steroids and peripheral myelin proteins. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001; 37 (1-3): 360-371.

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.

Mercuri E, Bertini E, Messina S, Pelliccioni M, D'Amico A, Colitto F, Mirabella M, Tiziano FD, Vitali T, Angelozzi C, Kinali M, Main M, Brahe C. Pilot trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord.* 2004; 14(2):130-135.

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.

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

Morgan L, Jessen KR, Mirsky R. The effects of cAMP on differentiation of cultured Schwann cells: progression from an early phenotype (P0+) to a myelin phenotype (P0+, GFAP-, N-CAM-, NGF-receptor-) depends on growth inhibition. *J Cell Biol.* 1991; 112 (3): 457-467.

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.

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.

Nobbio L, Vigo T, Abbruzzese M, Levi G, Brancolini C, Mantero S, Grandis M, Benedetti L, Mancardi G, Schenone A. Impairment of PMP22 transgenic Schwann cells differentiation in culture: implications for Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Neurobiol Dis.* 2004; 16 (1): 263-273.

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

Notterpek L, Snipes GJ, Shooter EM. Temporal expression pattern of peripheral myelin protein 22 during in vivo and in vitro myelination. *Glia* 1999; 25 (4): 358-369.

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.

Palumbo C, Massa R, Panico MB, Di Muzio A, Sinibaldi P, Bernardi G, Modesti A. Peripheral nerve extracellular matrix remodeling in Charcot-Marie-Tooth type I disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 2002; 104(3): 287-296.

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.

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.

Robaglia-Schlupp A, Pizant J, Norreel JC, Passage E, Saberán-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.

Rustin P, von Kleist-Retzow JC, Chantrel-Groussard K, Sidi D, Munnich A, Rötig A. Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet* 1999; 354 (9177): 477-479.

Ryan MC, Shooter EM, Notterpek L. Aggresome formation in neuropathy models based on peripheral myelin protein 22 mutations. *Neurobiol Dis.* 2002; 10 (2): 109-118.

Sabéran-Djoneidi D, Sanguedolce V, Assouline Z, Lévy N, Passage E, Fontés M. Molecular dissection of the Schwann cell specific promoter of the PMP22 gene. *Gene* 2000; 248(1-2): 223-231.

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.

Schumacher M, Guennoun R, Mercier G, Désarnaud F, Lacor P, Bénévides J, Ferzaz B, Robert F, Baulieu EE. Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. *Brain Res Rev.* 2001; 37(1-3): 343-359.

Schworer CM, Masker KK, Wood GC, Carey DJ. Microarray analysis of gene expression in proliferating Schwann cells: synergistic response of a specific subset of genes to the mitogenic action of heregulin plus forskolin. *J Neurosci Res.* 2003; 13 (4): 456-464.

Sereda MW, Griffiths I, Puhlhofer A, et al. A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 1996; 16: 1049–1060.

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.

Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease: an update. *Curr Opin Neurol.* 2004; 17 (5): 579-585.

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.

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

Tallarida RJ, Porreca F, Cowan A. Statistical analysis of drug-drug and site-site interactions with isobolograms. *Life Sci* 1989; 45: 947-961.

Tallarida RJ, Stone DJ, Raffa BB. Efficient designs for studying synergistic drug combinations. *Life Sci* 1997; 61: 417-425.

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

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

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

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

Vigo T, Nobbio L, Hummelen PV, Abbruzzese M, Mancardi G, Verpoorten N, Verhoeven K, Sereda MW, Nave KA, Timmerman V, Schenone A. Experimental Charcot-Marie-Tooth type 1A: a cDNA microarrays analysis. *Mol Cell Neurosci.* 2005; 28 (4):703-714.

Yasuda T, Sobuc G, Mitsuma T, Takahashi A. Peptidergic and adrenergic regulation of the intracellular 3',5'-cyclic adenosine monophosphate content in cultured rat Schwann cells. *J Neurol Sci.* 1988; 88(1-3): 315-325.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de identificación de tratamientos combinatorios sinérgicos de una enfermedad seleccionada, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 a) seleccionar una enfermedad que se va a tratar;
- b) construir un modelo dinámico de la enfermedad que comprende:
- (i) usar análisis estadístico genético, proteómico y metabolómico multivariado de grupos de genes y establecer rutas asociadas con la enfermedad implicadas en la génesis y evolución de la enfermedad, siendo dichas rutas asociadas con la enfermedad dianas para el desarrollo de fármacos;
- 10 (ii) ensayar los datos de (i) en la asociación integral de las rutas y validar los resultados en otro conjunto de datos; y
- (iii) organizar las rutas emergentes en un modelo jerárquico y definir los mecanismos o las dianas celulares más relevantes mediante los cuales se puede corregir la enfermedad;
- c) cribado orientado a la enfermedad in silico de fármacos aprobados para otras enfermedades que se dirigen a las rutas más relevantes implicadas en el modelo de b);
- 15 d) ensayar los fármacos seleccionados en c) solo o en combinación(es), en un moldeo biológico de la enfermedad, para identificar combinaciones de fármacos aprobados biológicamente activos como candidatos para el tratamiento de dicha enfermedad seleccionada; y
- e) seleccionar fármacos biológicamente activos identificados en d) según sus respectivas dianas en el modelo dinámico de la enfermedad definida en b), para definir tratamientos combinatorios sinérgicos que comprenden dichos fármacos.
- 20 2.- El método de la reivindicación 1, en donde el tratamiento combinatorio definido en e) comprende dosis bajas de los fármacos seleccionados.
- 3.- El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad se selecciona de trastornos neurológicos, trastornos psiquiátricos, cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades cardiovasculares y enfermedades del metabolismo de lípidos, preferiblemente de enfermedades neurodegenerativas tales como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, neuropatías y cánceres.
- 25 4.- El método de la reivindicación 3, en donde la enfermedad es la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.
- 5.- El método de la reivindicación 1 o 4, en donde el modelo dinámico de la enfermedad se construye compilando datos experimentales publicados que describen el fenotipo de la enfermedad a niveles genómico, bioquímico, celular y/o de organismo.
- 30 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el modelo se obtiene combinando la información disponible en una ruta lógicamente respaldada implicada en la génesis y evolución de la enfermedad.
- 7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde a la etapa b) le sigue una etapa adicional de identificar rutas del modelo de la enfermedad que se podrían modular usando fármacos.
- 35 8.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la etapa c) comprende la selección de fármacos aprobados que se sabe que interactúan con una diana o ruta contenida en el modelo dinámico de la enfermedad.
- 9.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde los fármacos seleccionados en la etapa c) se ensayan, solos y en combinación(es), en un modelo in vitro y/o in vivo de la enfermedad, en donde los fármacos que afectan a la expresión de una diana o la evolución de la enfermedad en el modelo se seleccionan como combinación(es) de fármacos candidato(s).
- 40