

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 368**

51 Int. Cl.:

A61K 31/422 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2011 PCT/EP2011/067438**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2012 WO12045804**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2011 E 11767988 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2624832**

54 Título: **Inhibidores de HDAC para tratar la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth**

30 Prioridad:

08.10.2010 US 404796 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2017

73 Titular/es:

**VIB VZW (50.0%)
Rijvisschestraat 120
9052 Gent, BE y
LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**VAN DEN BOSCH, LUDO;
VAN OUTRYVE D'YDEWALLE, CONSTANTIN y
ROBBERECHT, WIM**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 647 368 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

Inhibidores de HDAC para tratar la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

Campo de la invención

5 La presente solicitud se refiere a enfermedades en el sistema nervioso periférico, particularmente neuropatías hereditarias, más particularmente, a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT). Se demuestra que esta enfermedad está asociada con niveles reducidos de tubulina acetilada, que pueden superarse mediante la inhibición de histona desacetilasas (HDAC). Utilizando inhibidores de HDAC, se demuestra en esta memoria que los síntomas del fenotipo CMT se pueden superar tanto *in vitro* como *in vivo*. También se proporcionan en esta memoria dos modelos de ratón diferentes de la enfermedad CMT.

10 **Antecedentes**

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) afecta aproximadamente a 1 de cada 2500 individuos y es el trastorno hereditario más común del sistema nervioso periférico^{1,2}. Clínicamente, los pacientes con CMT muestran debilidad y atrofia del músculo distal lentamente progresiva, deformidades del pie, marcha en estepaje, pérdida sensorial distal y reflejos tendinosos profundos disminuidos o ausentes^{1,2}. Electrofisiológicamente, la CMT se divide en tres grupos: CMT desmielinizante (tipo 1), CMT caracterizada por pérdida axonal (tipo 2) y formas intermedias que muestran signos tanto de desmielinización como de pérdida axonal. En caso de que la enfermedad afecte exclusivamente a los axones motores y no exista afectación sensorial tanto clínica como electrofisiológicamente, la afección se denomina Neuropatía Motora Hereditaria distal (HMN distal). Hasta ahora, la CMT y la HMN distal se han asociado con aproximadamente 40 genes causantes (para una descripción general, <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations>) y el patrón de herencia puede ser autosómico dominante, autosómico recesivo o X enlazado^{1,2}. El mecanismo patológico subyacente para la mayoría de los genes mutados permanece siendo desconocido. Un cierto número de mutaciones que pueden provocar la CMT afectan al gen neurofilamento de cadena ligera (NFL). Perez-Olle et al (2005, Journal of Neurochemistry 93: 861-874) demostraron que estas mutaciones del neurofilamento de cadena ligera afectan, entre otros, al transporte axonal de neurofilamentos mutantes, el transporte de mitocondrias y provocan la fragmentación del aparato de Golgi.

Anteriormente, los autores de la invención identificaron mutaciones en el gen que codifica la pequeña proteína de choque térmico de 27 kDa (HSPB1, también denominada HSP27) en el cromosoma 7q11.23 como una causa de CMT2 y/o HMN2^{3,4} distal. HSPB1 es un miembro de las pequeñas proteínas de choque térmico que contienen un dominio α -cristalino altamente conservado. HSPB1 muestra actividad de chaperona uniéndose a proteínas mal plegadas y/o parcialmente desnaturalizadas y evitando que formen agregados tóxicos^{5,6}. Además, HSPB1 también juega un papel crucial en diversos procesos celulares tales como la modulación del estado redox intracelular, el ensamblaje de estructuras citoesqueléticas, la diferenciación celular y la inhibición de la apoptosis interactuando con las proteínas de señalización pro-apoptóticas⁵⁻⁷.

Hasta ahora, se han identificado 11 mutaciones de sentido erróneo en HSPB1 que están todas asociadas con CMT2 y/o HMN distal. Siete de estas mutaciones se encuentran en el dominio α -cristalino (incluido S135F), dos en la parte N-terminal y dos dirigidas al mismo aminoácido (P182L/S) en la cola C-terminal corta de la proteína^{3,8-11}. Todas estas mutaciones se heredan de forma autosómica dominante, excepto una (L99M) que muestra un patrón de herencia recesivo autosómico^{3,8-11}. Dependiendo de la mutación, los pacientes muestran CMT2 o síntomas distales de HMN. La mutación S135F es la única que provoca tanto CMT2 como HMN distal³. Hasta el momento, no existe cura para la enfermedad CMT, y cualquier terapia posible sería bienvenida.

Sumario

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es el trastorno hereditario más común del sistema nervioso periférico. Mutaciones en la pequeña proteína de choque térmico (HSPB1) de 27 kDa provocan la CMT axonal o neuropatía motora hereditaria distal (HMN distal). Los autores de la invención desarrollaron y caracterizaron ratones transgénicos que expresan dos mutaciones diferentes de HSPB1 (S135F y P182L) sólo en neuronas. Estos ratones muestran todas las características de CMT o HMN distal dependientes de la mutación expresada. La expresión de HSPB1 mutante disminuyó los niveles de α -tubulina acetilada e indujo déficits de transporte axonal severos. La inhibición farmacológica de la desacetilación de α -tubulina inducida por histona deacetilasa 6 (HDAC6) corrigió los defectos de transporte axonal inducidos por mutaciones de HSPB1 y rescató el fenotipo de CMT de ratones HSPB1 mutantes sintomáticos. Los hallazgos de los autores de la invención demostraron el papel patogénico de la desacetilación de α -tubulina en neuropatías inducidas por HSPB1 mutante y ofrece perspectivas para inhibidores de HDAC6 como una estrategia terapéutica contra axonopatías hereditarias (véase también d'Ydewalle et al., Nat Med. 2011; 17(8):968-74; REF. 47), pero también contra neuropatías periféricas inducidas tales como neuropatía periférica inducida por quimioterapia.

Por consiguiente, es un objeto de la solicitud proporcionar métodos para tratar neuropatías en las que los niveles de α -tubulina acetilada disminuyen, aumentando los niveles de α -tubulina acetilada, rescatando con ello los defectos de transporte axonal. Una forma de aumentar los niveles de α -tubulina acetilada es inhibiendo la histona desacetilasa 6 (HDAC6), ya que se sabe que esta enzima desacetila α -tubulina. Esto puede lograrse utilizando un inhibidor selectivo de HDAC6 tal como tubacina o tubastatina A, un inhibidor selectivo de HDAC tipo II, un inhibidor de HDAC menos específico o incluso un inhibidor de pan-HDAC. (Obsérvese que una forma equivalente de decir que se proporcionan métodos en esta memoria para tratar neuropatías administrando un inhibidor de HDAC a un sujeto que lo necesita es decir que los inhibidores de HDAC - particularmente los inhibidores de HDAC6 - se proporcionan para el uso en el tratamiento de neuropatías. Ha de entenderse que esto se aplica asimismo a los otros métodos descritos en esta memoria y, por lo tanto, no siempre se repite la frase equivalente).

El uso de inhibidores de HDAC ha sido sugerido para el tratamiento de una plétora de trastornos. Por ejemplo, (a) el documento WO2007/130419 enseña el uso de inhibidores de HDAC8 para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos; (b) el documento WO2007/061939 describe derivados de FK228, un inhibidores de HDAC clase I, para uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con HDAC, particularmente tumores; (c) el documento US2004/072735 se refiere a métodos, incluyendo el uso del inhibidor de HDAC SAHA, de inducir selectivamente la diferenciación terminal, la detención del crecimiento celular y/o la apoptosis de células neoplásicas; (d) Vasilescu et al (1984, Journal of Neurological Sciences, 63: 11-25) describe el uso de ácido valproico para la enfermedad de CMT (aunque al ácido valproico se le aludió incorrectamente como inhibidor de HDAC6 por Catalano et al (2007 Endocrine related Cancer 14: 839-845), el ácido valproico es un inhibidor de HDAC de clase I); (e) Butler et al (2010, Journal of the American Chemical Society 132: 10842-10846) menciona que los inhibidores selectivos de HDAC6 tubacina y tubastatina A se aplican potencialmente para afecciones neurodegenerativas, más particularmente trastornos del sistema nervioso central, y (f) el documento US2008/312175 se refiere a métodos y composiciones para regular la actividad de HDAC4, particularmente en trastornos musculares. También se ha realizado una gran investigación de inhibidores de HDAC6. Por ejemplo, Chen et al (2010, PLoS One 5: e10848) demostraron que el inhibidor de HDAC6 tubacina, entre otros, modifica el transporte mitocondrial en neuronas del hipocampo. Sin embargo, a nuestro mejor entender, la técnica es completamente silenciosa sobre el uso de inhibidores selectivos de HDAC6 para tratar la enfermedad de CMT.

Aunque los hallazgos presentados en esta memoria son aplicables a todo tipo de enfermedades que implican niveles disminuidos de α -tubulina acetilada, se prevé particularmente el tratamiento de axonopatías o neuropatías, lo más particularmente neuropatías periféricas tales como las que implican HSPB1 mutadas. Una de las neuropatías previstas es la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, particularmente CMT tipo 2 (también conocida como CMT axonal) o HMN distal. Sorprendentemente, se demuestra aquí que se invierte el fenotipo de CMT provocado por pérdida axonal y denervación muscular. Sin estar ligados a un mecanismo particular, podría demostrarse que la inhibición de HDAC dio como resultado el rebrote de neuronas funcionales, dando como resultado un rendimiento motor mejorado.

Por lo tanto, en una realización, se proporciona un inhibidor de HDAC6 selectivo para uso en el tratamiento de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. De acuerdo con realizaciones particulares, dicha enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es CMT axonal o neuropatía motora hereditaria distal. De acuerdo con otra realización particular, se proporciona un inhibidor selectivo de HDAC6 para uso en el tratamiento de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, caracterizada por al menos una mutación en el gen o proteína HSPB1. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, la mutación en el gen o proteína HSPB1 es una mutación en el dominio alfa-cristalino de HSPB1, particularmente del residuo S135, lo más particularmente una mutación puntual S135F. De acuerdo con realizaciones alternativas, la mutación en el gen o proteína HSPB1 es una mutación en la cola C-terminal de HSPB1, particularmente del residuo P182, más particularmente una mutación puntual P182L.

De acuerdo con realizaciones específicas, el inhibidor selectivo de HDAC6 se selecciona de tubacina y tubastatina A.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1. La expresión neuronal de HSPB1 mutante humana en ratones conduce a defectos motores progresivos y disminución de la fuerza muscular, (a) Borrnes Western de nervio ciático, DRG, médula espinal y homogeneizados de cerebro aislados de ratones no transgénicos (Nontg) de 2 meses de edad o ratones que expresan HSPB1 WT o mutante (S135F o P182L) sondeados con un anticuerpo contra la etiqueta HA de la HSPB1 humana de 27 kDa. La tinción con gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (Gapdh) confirmó una carga igual. MW, peso molecular. (b) Ratones de seis meses de edad que expresan HSPB1 WT o mutante levantados por la cola que muestran la diseminación normal de las extremidades (WT) o el comportamiento de bloqueo de las extremidades (S135F y P182L). (c) Prueba mensual del comportamiento general motor de los diferentes ratones transgénicos HSPB1 utilizando un rotarod acelerador. $n = 25$ ratones por genotipo. Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para mediciones repetidas. $***P < 0.0001$. (d,e) Mediciones dependientes de la edad de la fuerza de prensión normalizadas al peso corporal de todas las patas combinadas (d) o patas delanteras solamente (e) utilizando un

dinamómetro con una rejilla o una barra triangular, respectivamente. AU, unidades arbitrarias. $n = 25$ ratones por genotipo. ANOVA de dos vías para mediciones repetidas. Los asteriscos azules indican diferencias entre P182 L y WT; los asteriscos rojos indican diferencias entre S135F y WT. La línea representa el lapso en el que los puntos de datos son significativamente diferentes en comparación con WT. La prueba HSD de Tukey se utilizó para el análisis *post hoc*. * $P < 0.05$; *** $P < 0.0001$. Los datos se presentan como medias \pm e.m.t..

Figura 2. Sin efecto sobre la supervivencia y el fenotipo motor más severo en el mutante HSPB1^{P182L}

(a) Curva de Kaplan-Meier de ratones HSPB1 transgénicos WT (negro), S135F (rojo) y P182L (azul), $n = 5$ ratones en cada grupo. Prueba de rango logarítmico. $P > 0.05$. (b) Ajuste de curva lineal de los puntos de datos promediados de la prueba de rotarod a lo largo del tiempo de ratones HSPB1 mutantes (S135F en rojo; P182L en azul). Regresión lineal. $R^2_{S135F} = 0,95$; $R^2_{P182L} = 0,94$; $P = 0.02$. (c) Ajuste lineal de los puntos de datos promediados de la fuerza muscular de las cuatro patas juntas en función de la edad para ambos ratones HSPB1 mutantes (S135F en rojo; P182L en azul). Regresión lineal. $R^2_{S135F} = 0,86$; $R^2_{P182L} = 0,97$; $P = <0.0001$. (d) Ajuste lineal de puntos de datos promediados a lo largo del tiempo de la fuerza muscular de las patas delanteras sólo para ambos ratones HSPB1 mutantes (S135F en rojo; P182L en azul). Regresión lineal. $R^2_{S135F} = 0,90$; $R^2_{P182L} = 0,82$; $P = 0.005$.

Figura 3. Ratones que expresan HSPB1 mutante muestran marcha en estepaje y patas traseras con garras. (a)

Patrones de marcha en estepaje típicos de ratones transgénicos de 8 meses monitoreados con el sistema Catwalk semiautomatizado. Las barras de colores representan el momento en que una pata hace contacto con la placa del piso. LH, pata trasera izquierda; LF, pata delantera izquierda; RH, pata trasera derecha; RF, pata delantera derecha. Los asteriscos marcan dudas en el patrón de marcha en estepaje observado para ambas líneas de ratones HSPB1 mutantes. Barra de escala, 10 cm. (b-f) Cuantificación de diversos parámetros obtenidos del análisis de la marcha en estepaje con el Catwalk. La longitud de la zancada (b), el ángulo de la pata delantera (c), el ángulo de la pata trasera (d), el área de impresión de la pata delantera (e) y el área de impresión de la pata trasera (f) se midieron en función de la edad en ratones que expresan HSPB1^{WT}, HSPB1^{S135F} o HSPB1^{P182L}. $n = 15$ ratones por genotipo. ANOVA de dos vías para mediciones repetidas. ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$. Los asteriscos azules indican diferencias entre P182L y WT. Los asteriscos rojos indican diferencias entre S135F y WT. Las líneas representan el lapso en el que los puntos de datos son significativamente diferentes. La prueba HSD de Tukey se utilizó para el análisis *post hoc*. Los datos se presentan como medias \pm e.m.t. (g). Ejemplo típico de un ratón mutante que expresa HSPB1^{P182L} mostrando las patas traseras con garras.

Figura 4. Pérdida axonal motora o sensoriomotora pura dependiente de la mutación y denervación de las uniones

neuromusculares en ratones que expresan HSPB1 mutante. (a) Diferencia relativa en las latencias de respuesta en una placa caliente entre ratones que expresan HSPB1^{WT}, HSPB1^{S135F} y HSPB1^{P182L}. (b-d) Determinación de la amplitud y la latencia de las CMAPs en ratones que expresan HSPB1^{WT}, HSPB1^{S135F} o HSPB1^{P182L}. (b) amplitudes CMAP como una función de la edad. (c) Ajuste de curva lineal de los puntos de datos CMAP ($R^2_{S135F} = 0,99$ y $R^2_{P182L} = 0,94$). (d) Latencias CMAP en función de la edad. (e, f) Mediciones dependientes de la edad de amplitudes (e) y latencias (f) de SNAPs. Los asteriscos azules indican la diferencia entre P182L y WT. Los asteriscos rojos indican la diferencia entre S135F y WT. La línea representa el lapso en el que los puntos de datos son significativamente diferentes en comparación con WT. La prueba HSD de Tukey se utilizó para analizar *post hoc*. (g) Tinción con azul toluidina de secciones del nervio ciático distal semi-delgado de ratones que expresan HSPB1^{WT}, de 10 meses de edad (izquierda) y ratones que expresan HSPB1 mutantes (centro y derecha), que muestran pérdida axonal en las líneas mutantes. No se observaron signos de desmielinización. Barras de escala, 40 μ m. (h) Correlación entre el espesor de mielina y el diámetro axonal que confirman la ausencia de desmielinización en ratones que expresan HSPB1^{WT} (izquierda) y ratones que expresan HSPB1 mutantes (centro y derecha). (i) Cuantificación del número de axones en las partes distales del nervio ciático. (j) Izquierda, ejemplo de una unión neuromuscular completamente denervada teñida con α -bungarotoxina (roja) y negativa para la cadena pesada del neurofilamento. Barra de escala, 20 μ m. A la derecha, cuantificación de estas uniones neuromusculares denervadas en ratones HSPB1 transgénicos de 10 meses de edad. En a-f, $n = 15$ ratones por genotipo. ANOVA de dos vías para medidas repetidas se utilizó en a-f. Se utilizó ANOVA de una vía en g-j. En g-j, $n = 3$ ratones por genotipo. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$. Los datos se presentan como medias \pm e.m.t.

Figura 5. La neuropatía inducida por HSPB1 mutante no provocaba pérdida axonal proximal, pero se caracteriza por denervación muscular.

(a) Tinción con azul toluidina de secciones de nervio ciático proximal semi-finis de ratones HSPB1^{WT} de 10 meses de edad (panel izquierdo) y HSPB1 mutantes (panel central y derecho) que no muestran pérdida axonal. No se observaron signos de desmielinización. Barra de escala 40 μ m. (b) Correlación del espesor de mielina y el diámetro axonal que confirma la ausencia de desmielinización en ratones HSPB1^{WT} (panel izquierdo) y HSPB1 mutantes (panel central y derecho). (c) Cuantificación del número de axones en las partes proximales del nervio ciático. ANOVA de una vía. $P > 0.05$. (d) Micrografía fluorescente de racimos de receptores de acetilcolina teñidos con α -bungarotoxina (en rojo) y rama de axón terminal teñida con neurofilamento de cadena pesada (Nf200; en verde) de una sección longitudinal de 25 μ m de grosor de músculo gastrocnemio de animales HSPB1^{S135F} de 10 meses de edad. Barra de escala: 20 μ m. (e) Cuantificación del número de racimos de receptores de acetilcolina por rama terminal de axón visible dentro de un campo de visión. ANOVA de una vía. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

Figura 6. Ratones HSPB1 mutantes muestran defectos de transporte axonal y niveles reducidos de tubulina acetilada. (a) Micrografía fluorescente representativa de una neurona DRG cultivada cargada con un marcador mitocondrial selectivo (MitoTracker-Red, izquierda) y quimografías típicas obtenidas de neuronas DRG aisladas de ratones de 10 meses de edad (arriba a la derecha, HSPB1WT; abajo a la derecha, HSPB1S135F). Mitocondrias estacionarias son visibles como líneas verticales rectas, mientras que las mitocondrias en movimiento se desvían hacia la izquierda (retrógradas) o hacia la derecha (anterógradas). Barra de escala izquierda, 40 μm . En las imágenes de la derecha, barra de escala de tiempo (t): 50 s; barra de escala de distancia (d): 25 μm . (b-e) Cuantificación de mitocondrias totales y móviles (por cada 200 s y por cada 100 μm) en neuronas DRG aisladas de diferentes líneas transgénicas y en diferentes edades. El número total (b, d) y el número de mitocondrias en movimiento (c, e) se determinaron en neuronas DRG de ratones transgénicos de 10 meses de edad (b, c) o de 2 meses de edad (d, e), $n = 25-35$ células aisladas de tres ratones diferentes por genotipo. * $P < 0.05$; *** $P < 0.0001$. (f) Borrnes Western de nervios ciáticos de ratones de 10 meses que expresan HSPB1^{WT} o HSPB1 mutante sondeados con anticuerpos contra tubulina acetilada. Los autores de la invención confirmaron la misma carga por tinción para α -tubulina. $n = 3$. (g, h) Cuantificación de las densidades ópticas de bandas de tubulina acetiladas en borrones Western de extractos del nervio ciático (g) y de la médula espinal (h). Las señales se normalizan a los niveles totales de α -tubulina, $n = 3$. (i) α -tubulina acetilada en el nervio ciático y la médula espinal de ratones transgénicos de 10 meses de edad, según se determina mediante ELISA. Las señales se normalizan a los niveles totales de α -tubulina, $n = 3$. ANOVA de una vía. *** $P < 0.0001$. El análisis estadístico de b, c, g y h se realizó con ANOVA de una vía. El análisis estadístico de d y e se realizó con el ensayo t de Student. El análisis estadístico de i se realizó con el ensayo exacto de Fisher. Los datos se presentan como medias \pm e.m.t.

Figura 7. Transporte axonal rescatado dependiente de la dosis de Tubastatina A y niveles aumentados de acetil-tubulina in vitro. (a, b) Se evaluó el transporte axonal de mitocondrias en neuronas DRG aisladas de ratones HSPB1^{S135F} sintomáticos (8 meses de edad) después de 12 h de incubación con diversas concentraciones (0, 0,25, 0,50 o 1,00 μM) de Tubastatina A. (a) Cuantificación del número total de mitocondrias a diversas concentraciones de Tubastatin A. ANOVA de una vía. $P > 0,05$. (b) Cuantificación del número de mitocondrias en movimiento a diferentes concentraciones de Tubastatina A. ANOVA de una vía. * $P < 0.05$; ** $P < 0,001$; $P < 0,0001$. (c) Cuantificación de la densidad integrada de la señal de tubulina acetilada a lo largo de neuritas a diversas concentraciones de Tubastatina A. $n = 25-30$ células/condición. ANOVA de una vía. * $P < 0,05$.

Figura 8. La inhibición de HDAC6 rescata los defectos de transporte axonal y restaura el fenotipo CMT2. (a, b) Transporte axonal de mitocondrias medido en neuronas DRG aisladas de ratones que expresan HSPB1^{S135F} de 10 meses de edad después de 12 h de tratamiento con TSA (0,4 μM), tubacina (2 μM), tubastatina A (1 μM) o una cantidad equivalente de DMSO. Se cuantificó el número total de mitocondrias (a) y el número de mitocondrias en movimiento (b) (cada 200 s y cada 100 μm). $n = 20-30$ células aisladas de tres ratones diferentes para cada condición. * $P < 0.05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$. (c, d) Borrnes Western de extractos de nervio ciático y médula espinal de ratones que expresan HSPB1^{S135F} sintomáticos de 8 meses de edad, tratados diariamente durante 3 semanas con TSA (10 mg por kg de peso corporal; c) o tubastatina A (25 mg por kg de peso corporal; d) sondeado frente a tubulina acetilada. La igual carga se confirmó con tinción de α -tubulina, $n = 3$. (e, f) Cuantificaciones de la densidad óptica (OD) de tubulina acetilada en borrones Western de extractos del nervio ciático (e) y la médula espinal (f) de ratones que expresan HSPB1^{S135F} sintomáticos, tratados con TSA o tubastatina A. $n = 3$. (g) Rendimiento motor en un rotarod acelerado de ratones que expresan HSPB1^{S135F}, tratados durante 3 semanas con TSA o tubastatina A. (h, i) Efecto de los tratamientos con TSA o tubastatina A de ratones que expresan HSPB1^{S135F} sobre las amplitudes de CMAPs (h) o SNAPs (i). $n = 3-6$ ratones por grupo. * $P < 0.05$; ** $P < 0,001$; *** $P < 0,0001$. Se utilizó ANOVA de una vía para analizar los datos en a, b, e-i. Los datos se presentan como medias \pm e.m.t.

Figura 9. El tratamiento con TSA o tubastatina A conduce a la reinervación muscular y rescata los defectos del transporte axonal. (a, b) Efecto del tratamiento con vehículo (DMSO), TSA o tubastatina A sobre el nivel de inervación del músculo gastrocnemio en ratones que expresan HSPB1^{S135F} sintomáticos de 8 meses de edad. El número de uniones neuromusculares visibles (NMJs) por cada axón en cada campo de visión (a) y la cantidad relativa de uniones nerviosas denervadas (b) se determinaron después de teñir músculo gastrocnemio con anticuerpos contra α -bungarotoxina y cadena pesada de neurofilamento, $n = 2$ o 3 ratones por condición. *** $P < 0.0001$. (c, d) Transporte axonal de mitocondrias medido en neuronas DRG cultivadas, aisladas de ratones que expresan HSPB1^{S135F} sintomáticos después de 3 semanas de tratamiento con TSA o tubastatina A. El número total de mitocondrias (c) y el número de mitocondrias en movimiento (d) se cuantificaron (cada 200 s y 100 μm). $n = 20-25$ células aisladas de tres ratones diferentes en cada condición. * $P < 0,05$; *** $P < 0,0001$. Se utilizó ANOVA para analizar los datos. La prueba HSD de Tukey se utilizó para el análisis *post hoc* en a-d. Los datos se presentan como medias \pm e.m.t.

Descripción detallada

Definiciones

La presente solicitud se describirá con respecto a ejemplos particulares y con referencia a determinados dibujos, pero la solicitud no está limitada a los mismos, sino solo por las reivindicaciones. Cualesquiera signos de referencia en las reivindicaciones no deben interpretarse como una limitación del alcance. Los dibujos descritos son sólo esquemáticos y no son limitativos. En los dibujos, el tamaño de algunos de los elementos puede ser exagerado y no dibujado a escala con fines ilustrativos. En los casos en los que se utilice la expresión "que comprende" en la presente descripción y reivindicaciones, la misma no excluye otros elementos o etapas. Cuando se utiliza un artículo indefinido o definido cuando se refiere a un sustantivo en singular, p. ej., "un" o "una", "el" o "la", esto incluye un plural de ese sustantivo, a menos que se establezca específicamente.

Además, los términos primero, segundo, tercero y similares en la descripción y en las reivindicaciones se utilizan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe entenderse que los términos así utilizados son intercambiables en circunstancias apropiadas y que los ejemplos de la solicitud descritos en esta memoria son capaces de funcionar en otras secuencias que las descritas o ilustradas en esta memoria.

Los siguientes términos o definiciones se proporcionan únicamente para ayudar en la comprensión de la solicitud. A menos que se defina específicamente en esta memoria, todos los términos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que para un experto en la técnica de la presente solicitud. Los practicantes están particularmente dirigidos a Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Press, Plainview, Nueva York (1989); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Suplemento 47), John Wiley & Sons, Nueva York (1999), para definiciones y términos de la técnica. Las definiciones proporcionadas en esta memoria no deben interpretarse como que tienen un alcance menor que el entendido por una persona de experiencia ordinaria en la técnica.

El término "HDAC" o "HDACs", tal como se utiliza en esta memoria se refiere a histona desacetilasas, enzimas responsables de la desacetilación reversible de proteínas (número EC 3.5.1). Hasta la fecha, se han identificado dieciocho miembros de la familia HDAC. Se pueden dividir en dos categorías, es decir, enzimas dependientes de zinc (Clase I, Clase II y Clase IV) y enzimas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido (Clase III: sirtuinas). Las HDACs de Clase I incluyen HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8 y muestran homología con la deficiencia reducida de potasio de proteínas de levaduras 3. Las HDACs de clase II incluyen HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 y HDAC10 y son homólogas a la enzima de levaduras HDA1. Las HDACs de Clase II se agrupan además en dos subclases, IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 y HDAC9) y IIb (HDAC6 y HDAC10), de acuerdo con su homología de la secuencia y organización del dominio. HDAC11, el miembro identificado más recientemente, se clasifica en la nueva Clase IV de HDAC. Las sirtuinas, incluida la sirtuina humana (SIRT)1-7, muestran una homología distinta con la enzima levadura Sir2.

La expresión "inhibidor de HDAC" se utiliza en esta memoria para aludir a una molécula capaz de inhibir la función desacetilasa de una o más HDACs. Inhibidores de HDAC son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a trifluoroacetilfenol-carboxamidas, tubacina, tubastatina A, WT 161, PCI-34051, MC1568, MC1575, ácido suberoilánilida hidroxámico (también conocido como vorinostat o SAHA), Tricostatina, A, butirato de sodio, ácido valproico, M344, Sriptaid, Trapoxina, Depsipeptido (también conocido como Romidepsina), MS275 (Entinostat), 4-fenilimidazol, MC1293, droxinostat, curcumina, belinostat (PXD101), panobinostat (LBH589), MGCD0103 (mocetinostat), partenolida y givinostat (ITF2357).

Un "inhibidor selectivo de HDAC" o "inhibidor de HDAC específico" es un inhibidor que inhibe selectivamente determinados HDACs, mientras que no inhibe a otros, o inhibe a otros en una medida mucho menor. Por ejemplo, un inhibidor selectivo de HDAC6 inhibirá HDAC6, pero no otros HDACs; o será más activo hacia HDAC6. Un inhibidor de HDAC selectivo de clase II inhibirá típicamente los HDACs de clase II, pero no los HDACs de clase I (o solo en un grado mucho menor).

Particularmente, un inhibidor de HDAC selectivo será 2 veces más activo para el o los HDACs fijados como objetivo que para los no fijados como objetivo, o 4 veces más activo, o 6 veces más activo, u 8 veces más activo, o 10 veces más activo, o 20 veces más activo, o incluso 50 veces más activo o más. Ejemplos de inhibidores de HDAC6 selectivos incluyen, pero no se limitan a tubacina, tubastatina A, WT161, ácidos hidroxámicos que contienen piridilalanina (Schäfer et al., *ChemMedChem*. 2009; 4(2):283-90), SAHA sustituida con etilo C3 (Choi et al., *Bioorg Med Chem Lett*. 2011; 21(20):6139-42). El documento WO2011/091213 describe compuestos de amida inversa que también son inhibidores selectivos de HDAC6, su uso también está explícitamente previsto. Los isómeros scriptaid descritos en el documento WO2010/086646, particularmente los compuestos de amida en los ejemplos 1-15 de esa solicitud (es decir, *N*-hidroxi-7,7-di(piridin-2-il)hept-6-enamida, 6-(dipiridin-2-ilamino)-*N*-hidroxiheptanamida, 7-(dipiridin-2-ilamino)-*N*-hidroxiheptanamida, *N*-hidroxi-7-(piridin-2-il(quinolin-2-il)amino)heptanamida, *N*-hidroxi-8,8-di(piridin-2-il)oct-7-enamida, *N*-hidroxi-7-((4-metilpiridin-2-il)(piridin-2-il)amino)heptanamida, *N*-hidroxi-7-((4-fenilpiridin-2-il)(piridin-2-il)amino)heptanamida, *N*-hidroxi-7-((5-metilpiridin-2-il)(piridin-2-il)amino)heptanamida, 7-((5-benciloxi)piridin-2-il)(piridin-2-il)amino)-*N*-hidroxiheptanamida, *N*-hidroxi-7-((5-metoxipiridin-2-il)(piridin-2-il)amino)heptanamida, *N*-hidroxi-7-((5-fenilpiridin-2-il)(piridin-2-il)amino)heptanamida, 7-((5-(4-fluorofenil)piridin-2-il)amino)heptanamida,

il)(piridin-2-il)amino)-*N*-hidroxiheptanamida, hidroxamida del ácido 7-(isoquinolin-3-il-piridin-2-il-amino)-heptanoico, hidroxamida del ácido 7-[(4-benciloxi-piridin-2-il)-piridin-2-il-amino]-heptanoico) son también inhibidores de HDAC con particular selectividad para HDAC6 y, por lo tanto, están explícitamente previstos.

5 Ejemplos de inhibidores selectivos de HDAC de tipo II incluyen, pero no se limitan a MC1568 y MC1575. Droxinostat es un ejemplo de un inhibidor selectivo para HDAC3, 6 y 8. Bufexamac es un inhibidor selectivo para HDACs de tipo IIb, es decir, HDAC6 y HDAC10 (Bantscheff et al., *Nature Biotechnology* 29, 255-265 (2011)). Ejemplos de inhibidores de HDAC no selectivos incluyen, pero no se limitan a tricostatina A, SAHA y ácido valproico. Depsipéptidos que inhiben HDACs, pero de los que no se describe selectividad se informan en los documentos WO2008/062201, WO2009/022182, WO2009/141657, WO2009/141658, WO2009/141659 y WO2010/116173.

10 De acuerdo con un primer aspecto, la presente solicitud se refiere al uso de inhibidores de HDAC para tratar una neuropatía periférica, particularmente la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT). O, de manera equivalente, la presente solicitud se refiere a métodos para tratar una neuropatía periférica tal como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, administrando un inhibidor de HDAC al sujeto que tiene la neuropatía (particularmente la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth). Estas expresiones se consideran equivalentes, pero cumplen con los diferentes requisitos
15 con patentabilidad en todas las jurisdicciones. Debe entenderse que ejemplos previstos para los métodos de tratamiento también se aplican para el uso de un compuesto para tratar la enfermedad y viceversa.

Los hallazgos en esta memoria son aplicables a numerosas neuropatías, ya que abordan un principio subyacente fundamental, en lugar de síntomas específicos asociados con una enfermedad particular. Es decir, se demuestra que la restauración de la re-inervación muscular es posible mediante la recreación de nuevas uniones
20 neuromusculares. Por lo tanto, cualquier enfermedad o trastorno en el que la pérdida de las uniones neuromusculares sea uno de los síntomas puede, en principio, tratarse de esta manera. Esto se aplica particularmente a enfermedades que tienen este como un fenotipo principal tal como neuropatías periféricas (que no tienen un componente central), ya sean hereditarias (p. ej., CMT) o inducidas (p. ej., neuropatía periférica inducida por quimioterapia).

25 Aunque todos los tipos de neuropatía periférica se beneficiarán, al menos hasta cierto punto, del tratamiento descrito en esta memoria, se esperan la mayoría de los efectos beneficiosos cuando el trastorno es una axonopatía, es decir, cuando los axones se ven afectados principalmente. Esto se debe a que la inhibición de HDAC como se propone en esta memoria tiene efectos directos sobre el transporte axonal, y no sobre las vainas de mielina. Por lo tanto, en las mielinopatías (en donde la mielina se ve primero afectada y los axones se ven afectados de manera secundaria)
30 también se espera una mejoría de los síntomas (debido a la participación secundaria de los axones), pero no siempre una recuperación completa. Sin embargo, debe destacarse que la recuperación completa también es posible para las mielinopatías, aunque esto podría requerir un tratamiento crónico para mantener la protección de los axones desprovistos de vainas.

35 Por lo tanto, también para el tratamiento de Charcot-Marie-Tooth, está previsto principalmente tratar la CMT con un componente axonal - se espera que la recuperación en CMT2 o HMN distal sea más completa, aunque también se prevé CMT1 (la forma desmielinizante) para el tratamiento de los síntomas.

Una subclase particularmente contemplada de CMT2 o HMN distal son las enfermedades provocadas por mutaciones en HSPB1 (entrada 602195 en OMIM). El mecanismo patógeno exacto por el cual las mutaciones en HSPB1 provocan CMT2F y/o HMN2B distal es desconocido. *In vitro*, HSPB1 mutante formó agregados intracelulares
40 e inhibió la división celular y/o causó la muerte neuronal^{3,12,13}. Además, la HSPB1 mutada interrumpió la red de neurofilamentos, perturbando con ello la distribución intracelular de cargas específicas^{12,13}. Para dilucidar los mecanismos patológicos que subyacen a CMT2 y/o HMN distal, los autores de la invención desarrollaron y caracterizaron modelos de ratones transgénicos para CMT2 inducida por HSPB1 mutante y HMN distal. Encontraron que los ratones que expresan HSPB1 mutante selectivamente en las neuronas recapitulan todas las características clave de CMT2 o HMN distal dependiendo de la mutación. Los autores de la invención proporcionan evidencia de
45 que la HSPB1 mutante conduce a defectos graves de transporte axonal de una manera autónoma de las células. El fenotipo clínico de los ratones HSPB1 mutantes y los defectos de transporte axonal provocados por HSPB1 mutante se pueden rescatar mediante la inhibición de la histona desacetilasa 6 (HDAC6), lo que indica que HDAC6 juega un papel crucial en la patología de neuropatías periféricas inducidas por HSPB1.

50 Los datos de los autores de la invención demuestran que la expresión neuronal de HSPB1 humana con la mutación S135F da como resultado un fenotipo CMT2, mientras que la mutación P182L conduce a un fenotipo HMN distal en ratones. Estos dos modelos animales recapitulan las características clave de estas dos enfermedades y se parecen mucho a los síntomas clínicos humanos. Utilizando estos modelos de ratón recién creados, los autores de la invención descubrieron que los fenotipos se caracterizan por alteraciones de la motilidad mitocondrial dentro de los
55 axones, que va acompañada de una disminución de los niveles de α -tubulina acetilada. La inhibición farmacológica de HDAC6 rescata el fenotipo CMT2 en ratones HSPB1 mutantes y restablece el defecto de transporte axonal en las neuronas.

Ratones HSPB1^{S135F} y HSPB1^{P182L} desarrollan un brote adulto, progresando lentamente la enfermedad sin un efecto sobre la supervivencia. Esto es una reminiscencia de lo que se observa en CMT2 y las enfermedades distales de HMN que comienzan en la edad adulta, progresan lentamente y no tienen un gran impacto en la esperanza de vida de los pacientes^{3,4,8-11}. Ambas líneas de HSPB1 mutantes también demuestran varias otras características clave de estas neuropatías axonales. La degeneración axonal parece estar implicada de una manera dependiente de la longitud. Ambas líneas de HSPB1 mutantes también muestran signos de pérdida axonal distal en las fibras nerviosas motoras tras la evaluación electrofisiológica. No se observaron signos de desmielinización de las fibras nerviosas motoras. Las amplitudes de CMAP reducidas, pero las latencias del nervio motor no afectadas están de acuerdo con las observaciones en pacientes de CMT2 y HMN distales^{3,8-11}. El examen histológico del músculo gastrocnemio de HSPB1 mutante demuestra signos patológicos neurogénicos tales como masas nucleares picnóticas y fibras musculares atróficas de tipo 2 y una agrupación de fibras tipo 1, todas ellas distintivas de la pérdida axonal. La reducción drástica en los axones motores en los nervios periféricos y la disminución de las uniones neuromusculares inervadas en el músculo gastrocnemio confirman adicionalmente la neuropatía motora en ratones HSPB1 mutantes. El patrón de marcha en estepaje, tal como se muestra por un aumento pronunciado en el ángulo de la pata de las patas traseras y ciclos de pasos acortados son indicativos de una marcha en estepaje. Además, los ratones HSPB1 mutantes sintomáticos tienen patas traseras con garras. Todas estas características fenotípicas imitan con precisión lo que se ve en CMT2 y HMN distal. Estos pacientes muestran un debilitamiento y una atrofia del músculo de la extremidad distal, así como reflejos de los tendones profundos reducidos o ausentes que conducen a deformidades de la pata (tales como *pes cavus* y dedos martillo) y marcha en estepaje^{3,8-11}.

Una diferencia notable entre los dos ratones HSPB1 mutantes es la gravedad relativa del fenotipo motor. Los ratones HSPB1^{P182L} muestran una reducción más temprana en la coordinación motora general y en la fuerza muscular en comparación con ratones HSPB1^{S135F}. Además de ello, la reducción tanto la coordinación motora como en la fuerza muscular, así como la alteración en el ángulo de la pata trasera son siempre más pronunciadas en los ratones HSPB1^{P182L} que en los ratones HSPB1^{S135F}. La gravedad del fenotipo motor en los ratones HSPB1^{P182L} también se refleja en los hallazgos electrofisiológicos. Ratones HSPB1^{P182L} tienen una reducción dependiente de la edad más pronunciada en las amplitudes de CMAP en comparación con ratones HSPB1^{S135F}. Estos hallazgos están en concordancia con los síntomas clínicos más graves en pacientes con la mutación P182L en comparación con pacientes con otras mutaciones de HSPB1²⁶.

Otra diferencia entre ambos modelos de ratón es la participación del sistema sensorial. Los ratones HSPB1^{S135F} tienen una polineuropatía sensoriomotora mixta, mientras que los ratones HSPB1^{P182L} tienen una neuropatía motora pura. Esto se indica por la observación de que los ratones HSPB1^{S135F} muestran latencias de respuesta prolongada al aumento de la temperatura, mientras que los ratones HSPB1^{P182L} no lo hicieron. Los hallazgos electrofisiológicos confirman esta diferencia, ya que solo los ratones HSPB1^{S135F} tienen amplitudes de SNAP reducidas. Además de ello, se observó la pérdida de pequeños axones sensoriales en ratones HSPB1^{S135F}, mientras que estos axones sensoriales se salvaron en ratones HSPB1^{P182L}. Esta distinción fenotípica también se confirmó *in vitro*, ya que neuronas DRG aisladas de HSPB1^{P182L} sintomática no mostraron anomalía alguna en el transporte axonal de las mitocondrias. En conjunto, esta situación imita perfectamente la condición humana, ya que los pacientes portadores de la mutación S135F pueden tener una polineuropatía sensoriomotora, mientras que pacientes con la mutación P182L tienen una neuropatía motora pura^{1,3,4,8-11}. Estos datos argumentan en contra de la hipótesis de que las mutaciones de HSPB1 que inducen un fenotipo sensoriomotor son más graves que las mutaciones que inducen un fenotipo motor solamente. La selectividad de la implicación tiene un aspecto cualitativo más que cuantitativo. La investigación en el tema de la selectividad se ve seriamente obstaculizada por el uso del casete de expresión de Thy1.2 que impulsa selectivamente la expresión del transgén en las neuronas post-natales y que las neuronas motoras solo pueden cultivarse a partir de embriones. Además, las neuronas DRG cultivadas sólo muestran un fenotipo cuando son aisladas de animales sintomáticos y, por lo tanto, indica que solo es útil estudiar las neuronas de animales enfermos. El hecho de que ambas mutaciones estén situadas en diferentes dominios de las proteínas HSPB1 parece implicar que diferentes tipos de células muestran una sensibilidad diferente a los efectos negativos de estas proteínas mutadas. Con respecto a esto, es interesante observar que en pacientes las mutaciones situadas en la parte C-terminal de la proteína afectan principalmente a los axones motores, mientras que las mutaciones en la región N-terminal y en el dominio α -cristalino están afectando en general tanto a neuronas ambas motoras como sensoriales.

Además, los resultados de los autores de la invención indican que HSPB1 mutante puede provocar los fenotipos de una manera autónoma de las células, ya que la expresión de HSPB1 humana está limitada a las neuronas en los ratones transgénicos y esto es suficiente para inducir los fenotipos CMT2 o HMN distales. La patología autónoma de las células de CMT2 inducida por HSPB1 mutante y HMN distal está en línea con los hallazgos en otros modelos de CMT2. La expresión específica para las neuronas en ratones mutantes mitofusina 2 (MFN2) mostró una masa reducida de los músculos de la extremidad posterior anterior, lo que en última instancia dio como resultado patas traseras flácidas²⁷. Otro modelo de ratón con expresión neuronal de MFN2 mutante mostró deterioro locomotor y defectos de la marcha²⁸. Utilizando un sistema de genes sensible a la tetraciclina, Dequen *et al.* (2010) demostraron recientemente que la expresión selectiva de la cadena ligera del neurofilamento mutante (NEFL; que provoca

CMT2E) en el sistema nervioso conduce a las características clave de CMT axonal, incluida la postura anómala de las extremidades posteriores y la pérdida de la inervación muscular²⁹.

Los fenotipos en los ratones transgénicos de los autores de la invención son probablemente causados por un mecanismo de ganancia de la función. Esto está en línea con los patrones de herencia dominante de CMT2 inducida por HSPB1 mutante y HMN distal en seres humanos. Además de ello, los ratones inactivados en *Hspb1* son viables y no muestran fenotipo evidente alguno (Huang et al., *Genesis*. 2007; 45(8):487-501). Estos modelos de ratones HSPB1 transgénicos nos proporcionan la oportunidad única de estudiar el mecanismo patológico responsable de los fenotipos observados. Dado que se demostró anteriormente que la presencia de HSPB1^{P182L} perturbaba la distribución intracelular de proteínas y organelas específicas en las neuronas corticales transfectadas, los autores de la invención se concentraron primero en el transporte axonal¹². Además, el transporte axonal parece jugar un papel crucial en muchas enfermedades neurodegenerativas³⁰. Aunque no se encontraron diferencias en el transporte axonal en las neuronas DRG cultivadas aisladas de ratones HSPB1^{S135F} antes del inicio de la enfermedad, el transporte mitocondrial se vio gravemente afectado en las neuronas DRG aisladas de los ratones HSPB1^{S135F} sintomáticos mutantes. Este parece ser un tema común en la CMT, ya que las alteraciones en el transporte mitocondrial también se observaron en otros modelos de CMT2. Mutaciones en proteínas mitocondriales tales como MFN2 (que provocan CMT2A) y la proteína 1 asociada a la diferenciación inducida por gangliósidos (GDAP1, que provoca CMT2K) afectaron la motilidad mitocondrial en líneas celulares transfectadas³¹⁻³³. El mutante MFN2 mostró un aumento de la inmovilización al retículo endoplásmico, que alteró el transporte axonal de las mitocondrias en las neuronas DRG transfectadas^{31,32}. GDAP1 mutante también afectó a la dinámica mitocondrial, excluyendo parcialmente a las mitocondrias de los axones³³. NEFL mutante también condujo a la disfunción mitocondrial previa a la disrupción de la red de neurofilamentos³⁴. Además de ello, otras proteínas implicadas en el transporte axonal están mutadas en pacientes con CMT2 y/o HMN distal, incluida la pequeña GTPasa RAB7 (CMT2B), enfatizando el papel central de los defectos del transporte axonal en la patología CMT2².

El transporte intracelular, en particular a lo largo de procesos extendidos tales como axones, requiere proteínas motoras que distribuyen sus cargas utilizando señales de orientación^{16,35,36}. La α -tubulina acetilada es una de estas señales^{17,35,36}. Esto es especialmente cierto para el transporte mitocondrial, ya que las mitocondrias en movimiento se localizan preferentemente en microtúbulos acetilados³⁵. Además, se demostró que la alteración de la acetilación de α -tubulina desempeña un papel en enfermedades neurodegenerativas tales como la disautonomía familiar y que el aumento de α -tubulina acetilada induce un aumento en el transporte axonal^{19,20}. Los autores de la invención encontraron que los niveles totales de α -tubulina acetilada disminuyeron drásticamente en el nervio periférico de los ratones HSPB1 mutantes en comparación con animales HSPB1^{WT}. Esta reducción de la acetilación de α -tubulina es un fenómeno periférico (distal), ya que los niveles de α -tubulina acetilada no se vieron afectados en la médula espinal de ratones HSPB1 mutantes. La causa de esta disminución es incierta. La restauración de niveles de α -tubulina acetilada inhibiendo HDAC6 (p. ej., utilizando TSA, tubacina o tubastatina A) rescató los defectos del transporte axonal, sugiriendo un papel clave para la desacetilación en el mecanismo de CMT inducida por HSPB1 mutante, como se ha demostrado en otros trastornos neurodegenerativos incluida la enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, pero también lesiones de nervios periféricos³⁷⁻³⁹. La inhibición farmacológica de HDAC6 también aumentó el transporte mitocondrial en las neuronas del hipocampo, lo que indica que HDAC6 regula el transporte¹⁹ axonal. El tratamiento con TSA y tubastatina A de ratones HSPB1 mutantes (véase el Ejemplo 9) también restauró parcialmente el fenotipo CMT2 tanto a nivel de conducta como electrofisiológico, indicando además que niveles reducidos de α -tubulina acetilada juegan un papel importante en la patología CMT2 inducida por HSPB1 mutante.

En sí, el efecto de TSA podría ser más amplio que su efecto sobre el transporte mitocondrial, ya que se demostró antes que el tratamiento con TSA restauró el transporte vesicular deteriorado y estimuló la liberación de factores de crecimiento esenciales, tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), en un modelo de ratón de la enfermedad de Huntington⁴⁰. Por otra parte, TSA también tiene un efecto importante sobre la acetilación de histonas, influyendo con ello en la expresión génica^{25,41,42}. En un modelo de ratón para la atrofia muscular espinal (SMA), una enfermedad de neurona motora autosómica recesiva que afecta a los niños provocada por SMN insuficiente, el tratamiento con TSA aumentó la expresión de la proteína SMN, conduciendo a una mejora del rendimiento motor y a un aumento de la supervivencia²⁵. Además de la importancia de la acetilación de histonas y tubulina, se ha demostrado que la acetilación de lisina de muchas otras proteínas (conocido como el "acetiloma") en general podría co-regular las principales funciones celulares, incluyendo la remodelación de la cromatina, el ciclo celular, el corte y empalme, el transporte nuclear y la nucleación de actina⁴³. Sin embargo, dado que se observaron los mismos efectos utilizando tubacina y tubastatina A, ambos inhibidores selectivos de HDAC6, parece que la inhibición específica de HDAC6 puede recapitular los efectos de la inhibición de pan-HDAC observada con TSA.

Por tanto, la presente solicitud prevé que la inhibición de HDAC que se propone en esta memoria para tratar la neuropatía periférica es la inhibición particular de HDACs de tipo II (es decir, utilizando un inhibidor de HDAC de tipo II), más particularmente HDACs de tipo IIb. De acuerdo con realizaciones específicas, el inhibidor de HDAC es un inhibidor selectivo de HDACs de tipo II.

De acuerdo con la mayoría de los ejemplos particulares, el inhibidor de HDAC es un inhibidor de HDAC6. Incluso más particularmente, el inhibidor de HDAC6 es un inhibidor selectivo de HDAC6. Una lista no exhaustiva de inhibidores de HDAC y HDAC6 que pueden utilizarse se proporciona arriba. De acuerdo con ejemplos específicos, el inhibidor de HDAC es un inhibidor selectivo de HDAC6 seleccionado de tubacina y tubastatina A.

5 Los resultados presentados en esta memoria indican que el fenotipo de neuropatías periféricas heredadas puede detenerse e incluso revertirse mediante la inhibición farmacológica de la desacetilación, al menos en modelos animales. Tal reversibilidad también se demostró mediante ratones NEFL mutantes condicionales con síntomas de CMT2, un fenotipo que podría restablecerse al desactivar la expresión de NEFL mutante en ratones sintomáticos²⁹.
 10 Lo más destacable a este respecto es que la restauración de los niveles de α -tubulina acetilados a través de la inhibición de HDACs, particularmente HDAC6, rescata y revierte el fenotipo del comportamiento motor como se ve en CMT. De hecho, dado que este fenotipo se debe a la pérdida axonal y a la denervación muscular, solo puede ser rescatado mediante la re-inervación del músculo. Esto es exactamente lo que se ve en experimentos preliminares: se restauran los contactos perdidos entre los nervios y los músculos (= uniones neuromusculares), revertiendo con ello el fenotipo. Según los conocimientos de los autores de la invención, esta es la primera vez que se demuestra
 15 que la pérdida de uniones neuromusculares encontradas en la enfermedad neurodegenerativa puede revertirse mediante un tratamiento farmacológico. Además, las nuevas uniones neuromusculares son funcionales, permitiendo con ello el rescate del fenotipo neurodegenerativo. Sin estar ligados a un mecanismo particular, este efecto es probablemente debido al aumento de α -tubulina acetilada, ya que esto es importante para el transporte mitocondrial y el transporte axonal. Este mecanismo también indica que el hallazgo de regeneración de uniones neuromusculares
 20 funcionales puede extenderse a otras enfermedades además de la CMT, dado que todas las enfermedades neurodegenerativas en donde es importante el transporte axonal mediado por microtúbulos (p. ej., Parkinson, Huntington, MS, atrofia muscular espinal, esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Guillain-Barré, véanse también las referencias 37-39). Sin embargo, lo más particularmente previsto son las axonopatías (es decir, trastornos que se caracterizan principalmente por axones disfuncionales, en oposición a enfermedades desmielinizantes, en donde la vaina de mielina que cubre los axones se ve primero afectada). Particularmente previstas son las neuropatías periféricas. De particular interés son las neuropatías (o axonopatías) inducidas por sustancias externas tales como los fármacos. Ejemplos de estos incluyen neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN) tal como, por
 25 ejemplo, inducida por alcaloides vinca (p. ej., vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina), sales de platino (p. ej., cisplatino, oxaliplatino), taxanos (p. ej., paclitaxel, docetaxel), epotilonas (ixabepilona y otras), bortezomib, talidomida y derivados. Estas neuropatías se revisan, p. ej., en Cavaletti et al., Nat Rev Neurol. 2010; 6(12):657-66, y Balayssac et al., Expert Opin Drug Saf. 2011; 10(3):407-17.

En conclusión, los autores de la invención han desarrollado animales transgénicos que expresan HSPB1 mutante humana selectivamente en neuronas. Estos ratones demuestran fenotipos que replican con precisión todas las
 35 características clave de los síntomas humanos de CMT2 y HMN distal. HSPB1 mutante afecta autónomamente celular al transporte axonal y disminuye los niveles de α -tubulina acetilada. La reducción de los niveles de α -tubulina acetilada se revierte mediante la inhibición de HDAC6, que restablece los defectos en el transporte axonal y rescata el fenotipo CMT2 de forma conductual y electrofisiológica⁴⁷. Por lo tanto, los autores de la invención proporcionan evidencia de la implicación de los cambios citoesqueléticos en CMT2 inducida por HSPB1 mutante y HMN distal. La inhibición de HDAC6 puede ser un nuevo enfoque terapéutico para ambas enfermedades, o para las neuropatías
 40 periféricas en general.

Debe entenderse que aunque en esta memoria se han discutido ejemplos particulares, configuraciones específicas así como materiales y/o moléculas para células y métodos de acuerdo con la presente invención, se pueden realizar diversos cambios o modificaciones en la forma y el detalle sin apartarse del alcance y espíritu de esta solicitud. Los
 45 siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor ejemplos particulares, y no se deben considerar como limitativos de la solicitud. La solicitud está limitada sólo por las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1. Ratones HSPB1 mutantes muestran déficits motores progresivos que se propagan desde las extremidades traseras a las delanteras.

Los autores de la invención han creado ratones transgénicos utilizando un casete de expresión Thy1.2 responsable
 50 de la expresión postnatal y específica para las neuronas del transgén (esta solicitud y Ref. 48). El ADNc de HSPB1 humana de tipo salvaje (WT) o mutante (S135F y P182L) acoplado a una etiqueta de hemaglutinina (HA) N-terminal se clonaron en esta construcción y los animales transgénicos se hicieron utilizando inyección de cigoto. El análisis de la transferencia Western no reveló expresión de HSPB1 humana en tejidos no neuronales tales como corazón, hígado y riñón (no mostrado). El cerebro, la médula espinal, la DRG y el nervio periférico expresaron HSPB1
 55 humana marcado con HA (Fig. 1a). No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de HSPB1 entre los diferentes ratones transgénicos (no mostrado).

En ratones transgénicos, HSPB1 humana WT o mutante solo estaba presente en la sustancia gris y en procesos extendidos en la sustancia blanca (no mostrado). A nivel celular, HSPB1 se co-localizó con el marcador neuronal SMI-32 en el cuerno ventral de la médula espinal de ratones transgénicos, pero no con la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), confirmando que HSPB1 humana se expresaba exclusivamente en neuronas (no mostrado). De acuerdo con otros estudios utilizando el casete de expresión Thy1.2, los autores de la invención no observaron ninguna diferencia en la expresión transgénica entre DRG y las neuronas motoras (no mostrado).

Todos los ratones transgénicos fueron normales al nacer y mostraron un comportamiento normal de destete y aseo. La frecuencia de nacimiento de todas las líneas transgénicas siguió el patrón de herencia mendeliano normal, lo que indica que no hubo letalidad embrionaria. Además de ello, no se observaron diferencias en la supervivencia entre todos los genotipos ($P > 0.05$, Fig. 2a). Sin embargo, a los 6 meses de edad, todos los ratones HSPB1 mutantes (S135F y P182L) mostraron un comportamiento de bloqueo de las extremidades cuando se suspendieron por la cola, mientras que los ratones no transgénicos y HSPB1^{WT} nunca lo hicieron (Fig. 1b).

A continuación, evaluaron el comportamiento general motor utilizando un rotarod acelerado. Todos los ratones podrían permanecer en el rotarod (300 s) hasta la edad de 6 meses. A partir de esa edad, ambas líneas de HSPB1 mutantes comenzaron a fallar en la prueba de rotarod y se observó una reducción progresiva en el comportamiento a lo largo del tiempo ($P < 0.0001$; Fig. 1c). Los ratones que expresan HSPB1^{P182L} mostraron una disminución más pronunciada en comparación con los ratones que expresan HSPB1^{S135F} (Fig. 2b).

Dado que la debilidad muscular progresiva y la atrofia que se propaga desde las extremidades traseras a las extremidades delanteras son características importantes de CMT2 y HMN distal, los autores de la invención evaluaron la fuerza de agarre de los ratones transgénicos HSPB1. Se observó una disminución progresiva en la fuerza de agarre de las patas delanteras y traseras combinadas para ambas líneas HSPB1 mutantes ($P < 0.0001$; Fig. 1d). Esta disminución era más grave para HSPB1^{P182L} que para HSPB1^{S135F} (Fig. 2c). La fuerza de agarre de las patas delanteras solo mostró una disminución significativa a partir de la edad de 10 meses ($P = 0.001$; Fig. 1e). De nuevo, esta disminución fue más pronunciada para los ratones que expresan HSPB1^{P182L} (Fig. 2d). En conjunto, estos resultados indican que ratones tanto HSPB1^{S135F} como HSPB1^{P182L} desarrollan deficiencias motoras que progresan desde las extremidades traseras a las extremidades delanteras y empeoran con la edad.

Ejemplo 2. Ratones HSPB1 mutantes demuestran marcha de estepaje.

Los autores de la invención observaron que los ratones HSPB1 mutantes colocaban sus patas de una manera anómala en la varilla giratoria. Para cuantificar esta diferencia, monitorearon el patrón de marcha utilizando el sistema semiautomático Catwalk™ como se describió anteriormente^{14,15}. A partir de los 6 meses, ambas líneas de HSPB1 mutantes necesitaron, en promedio, el doble del número de ciclos de pasos para cruzar una pasarela de 40 cm de largo en comparación con HSPB1^{WT} (Fig. 3a). Esto dio como resultado una reducción del 50% de la longitud de la zancada ($P < 0.0001$, Fig. 3b). Además, ambas líneas de ratón mutantes que expresan HSPB1 mostraron vacilaciones al colocar sus patas y aumentaron los ángulos de las patas traseras y disminuyeron las áreas de impresión de las patas traseras, mientras que las patas delanteras no se vieron afectadas ($P < 0.0001$; Fig. 3a-f). La disminución en el área de impresión de las patas traseras está en línea con las patas traseras con garras observadas en ratones que expresan HSPB1 mutante (Fig. 3g). Estas patas traseras con garras eran más pronunciadas en ratones que expresaban HSPB1^{P182L} que en aquellas que expresaban HSPB1^{S135F} y no se observaron en ratones que expresaban HSPB1^{WT} o ratones no transgénicos. Estos datos demuestran claramente que los ratones mutantes HSPB1 imitan con precisión la marcha de estepaje y las deformidades del pie (como el *pes cavus*) observadas en pacientes de CMT2 y HMN distal.

Ejemplo 3. Déficit sensoriales dependientes de la mutación en ratones HSPB1 mutantes.

Clínicamente, la mutación P182L en HSPB1 se asocia con una neuropatía motora pura, mientras que los pacientes portadores de la mutación S135F también pueden tener déficits sensoriales, en particular para el dolor y la temperatura^{1,2}. Por lo tanto, los autores de la invención probaron si ratones HSPB1^{S135F} y HSPB1^{P182L} mostraban signos de deterioro sensorial utilizando la prueba de placa calefactora. HSPB1^{S135F} demostró latencias de respuesta incrementadas en comparación con ratones HSPB1^{WT} agravantes con la edad ($P = 0.01$; Fig. 4a). Por el contrario, HSPB1^{P182L} no mostró diferencia alguna en las latencias de respuesta en comparación con los ratones HSPB1^{WT} (Fig. 4a), indicando que los ratones HSPB1^{P182L} sólo tienen un comportamiento motor alterado, mientras que los ratones HSPB1^{S135F} tienen déficits tanto sensoriales como motores.

Ejemplo 4. Estudios electrofisiológicos revelan fenotipos CMT axonales primarios y HMN distales.

Estudios de conducción nerviosa se realizan rutinariamente en pacientes con CMT para discriminar formas desmielinizantes (tipo 1) de axónicas (tipo 2), así como para evaluar si los pacientes muestran una neuropatía sensoriomotora mixta (CMT2) o una neuropatía motora pura (HMN distal). Por lo tanto, los autores de la invención realizaron estudios de conducción nerviosa en ratones transgénicos HSPB1 utilizando electrodos sub-dermales a

nivel del músculo gastrocnemio para medir los potenciales de acción muscular compuestos (CMAP) o en el extremo distal de la cola para registrar los potenciales de acción del nervio sensorial (SNAP). Ratones HSPB1^{P182L} y HSPB1^{S135F} mostraron una disminución significativa de la amplitud de pico a pico de CMAPs a los 6 y 8 meses de edad, respectivamente ($P < 0,0001$; Fig. 4b). La disminución de las amplitudes CMAP en función de la edad era más pronunciada en ratones HSPB1^{P182L} en comparación con ratones HSPB1^{S135F} evaluados por las pendientes (pendiente_{S135F} = $-4,66 \pm 0,32$; pendiente_{P182L} = $-6,23 \pm 0,93$; $P = 0,004$; Fig. 4c). Las latencias de CMAP no se vieron afectadas, lo que confirma la naturaleza axonal de la neuropatía motora en ambas líneas de HSPB1 mutantes (Fig. 4d). Ratones HSPB1^{S135F} de seis meses de edad también mostraron una disminución en la amplitud de línea de base a pico de SNAPS, que se agrava con la edad ($P < 0,0001$; Fig. 4e). De nuevo, las latencias de SNAP no se alteraron, lo que demuestra que la pérdida sensorial se debió a una neuropatía axonal (Fig. 4f). Por el contrario, ratones HSPB1^{P182L} no mostraron reducción alguna en las amplitudes de SNAP, lo que confirma que esta línea de HSPB1 mutante no tiene déficits sensoriales (Fig. 4e).

En ratones HSPB1^{S135F}, las amplitudes de CMAP se redujeron significativamente en comparación con HSPB1^{WT} a la edad de 8 meses, mientras que las amplitudes de SNAP ya eran significativamente menores a la edad de 6 meses. Dado que los electrodos de registro para las amplitudes de SNAP se colocaron más distalmente (4 cm distalmente desde la base de la cola) en comparación con los electrodos para las amplitudes CMAP (a nivel del músculo gastrocnemio), los autores de la invención concluyeron que la neuropatía axonal depende de la longitud (es decir, axones más largos se ven afectados primero). En conclusión, los hallazgos electrofisiológicos confirman que los ratones HSPB1^{S135F} tienen una polineuropatía sensoriomotora mixta (CMT2), mientras que los ratones HSPB1^{P182L} desarrollan una neuropatía motora pura (HMN distal).

Ejemplo 5. La pérdida axonal y la denervación muscular subyacen a CMT2 y fenotipos HMN distales.

Los autores de la invención no encontraron evidencia histológica de desmielinización en partes tanto proximales como distales del nervio ciático (Fig. 4g, h y Fig. 5a, b) o pérdida axonal en la parte proximal del nervio ciático ($P > 0,05$; Fig. 5c). Por el contrario, hubo una disminución significativa en el número de axones en las partes distales del nervio ciático en ratones que expresan tanto HSPB1^{S135F} como HSPB1^{P182L} ($P = 0,002$ y $P = 0,001$, respectivamente, Fig. 4i).

En el músculo gastrocnemio encontraron menos racimos de receptores de acetilcolina por axón terminal en ratones que expresan HSPB1 mutante en comparación con ratones que expresan HSPB1^{WT} (Fig. 5d, e). Ratones que expresan HSPB1^{WT} tenían uniones neuromusculares casi no visiblemente denervadas, mientras que de las restantes uniones neuromusculares, ratones que expresan HSPB1^{S135F} y ratones que expresan HSPB1^{P182L} mostraron un marcado aumento de las uniones neuromusculares denervadas (Fig. 4j).

Ambas líneas de ratón que expresan HSPB1 mutantes mostraron fibras musculares atroficas en el músculo gastrocnemio acompañadas de racimos nucleares picnóticos (datos no mostrados). Se observó una agrupación del tipo de fibra en músculos de ambas líneas de ratón que expresan HSPB1 mutantes, mientras que las fibras musculares mostraron una apariencia normal de "tablero de ajedrez" en ratones que expresan HSPB1^{WT} (no mostrado). Tomados en conjunto, el examen histológico de los músculos de las extremidades traseras y los nervios periféricos confirma que ratones HSPB1^{S135F} tienen una polineuropatía axonal sensoriomotora mixta (CMT2), mientras que ratones HSPB1^{P182L} desarrollan una neuropatía axonal motora pura (HMN distal) que imita por completo las condiciones humanas. Los defectos no se deben a la desmielinización, sino a la pérdida axonal distal.

Ejemplo 6. HSPB^{S135F} provoca defectos de transporte axonal.

Se ha demostrado previamente que la distribución intracelular de cargas específicas tales como la propia HSPB1 mutante, pero también el neurofilamento y p150 estaban alterados en las neuronas corticales transfectadas con HSPB1^{P182L} (ref.12). Con el fin de estudiar los efectos de HSPB1 mutante en el transporte axonal, los autores de la invención aislaron las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) de ratones transgénicos adultos y analizaron el transporte mitocondrial en estas neuronas después de 2 días en cultivo. El movimiento mitocondrial se visualizó cargando las neuronas DRG con un marcador mitocondrial selectivo (MitoTracker®) y por imágenes de video en vivo (Fig. 6a). Se utilizaron quimográficos resultantes de la compresión en el tiempo de imágenes de video para cuantificar el número total de mitocondrias presentes en las neuritas y para discriminar el movimiento anterógrado y retrógrado de las mitocondrias estacionarias (Fig. 6a, paneles derechos).

Neuronas DRG aisladas de ratones HSPB1^{S135F} sintomáticos mostraron una reducción drástica del número de mitocondrias en movimiento en comparación con HSPB1^{WT} ($P < 0,0001$, Fig. 6a, b). Además, significativamente menos mitocondrias estaban presentes en sus neuritas en comparación con HSPB1^{WT} ($P = 0,01$, Fig. 6a, c). Neuronas DRG HSPB1^{P182L} no mostraron diferencia alguna en el número total de mitocondrias o de mitocondrias en movimiento, consistente con el fenotipo motor puro de estos ratones ($P > 0,05$; Fig. 6b, c), y el transporte mitocondrial tampoco se vio afectado en las neuronas DRG aisladas de ratones que expresan HSPB1^{S135F} mutantes

presintomáticos (Fig. 6d, e). Esto demuestra que la alteración del transporte axonal en las neuronas DRG aisladas coincide con la presencia de déficits sensoriales en los ratones transgénicos.

Ejemplo 7. Ratones HSPB1 mutantes muestran niveles de α -tubulina acetilada reducidos.

5 Las mitocondrias son transportadas principalmente a lo largo de microtúbulos que consisten en tubulina polimerizada¹⁶. La tubulina puede experimentar una diversidad de modificaciones post-traduccionales tales como tirosinación/destirosinación, glutamilación, glicilación y acetilación/desacetilación¹⁷. Los autores de la invención se centraron en la acetilación/desacetilación de α -tubulina, ya que este proceso es necesario para el tráfico intracelular de una amplia gama de proteínas y organelas, ya que se considera como una señal de reconocimiento para el anclaje del motor molecular¹⁷⁻¹⁹. Además, niveles disminuidos de α -tubulina acetilada se han asociado con enfermedades neurodegenerativas^{20,21}.

15 En homogeneizados de nervios periféricos de ratones HSPB1 mutantes de 10 meses de edad se observó una disminución drástica en los niveles de α -tubulina acetilada en presencia de HSPB1 mutante en comparación con HSPB1^{WT} ($P < 0,0001$; Fig. 6f, g). Curiosamente, en homogeneizados de la médula espinal no se observaron diferencias significativas en los niveles de α -tubulina acetilada ($P > 0,05$; Fig. 6f, h). Utilizando ELISA, se confirmó la disminución en los niveles de α -tubulina acetilada en el nervio ciático de ratones HSPB1 mutantes ($P < 0,0001$, Fig. 6i). Secciones longitudinales de los nervios ciáticos demostraron niveles más bajos de niveles de α -tubulina acetilada en ratones HSPB1 mutantes en comparación con animales HSPB1^{WT} (datos no mostrados).

Ejemplo 8 La inhibición de HDAC6 rescata defectos del transporte axonal en neuronas de HSPB1^{S135F} cultivadas.

20 La acetilación y la desacetilación son únicas entre las modificaciones de tubulina, porque ocurren dentro de la cara luminal de los microtúbulos en la lisina-40 de α -tubulina¹⁸. La histona desacetilasa 6 (HDAC6), una histona deacetilasa de clase II, es la enzima principal que interactúa con α -tubulina y muestra una actividad de α -tubulina desacetilante^{22,23}. Además de ello, se ha demostrado en neuronas del hipocampo cultivadas que HDAC6 puede regular el transporte axonal de mitocondrias¹⁹.

25 Para demostrar un vínculo directo entre HDAC6 y el mecanismo patológico subyacente de CMT2 inducido por HSPB1 mutante, los autores de la invención incubaron neuronas DRG con varios inhibidores de HDAC6. Tricostatina A (TSA) es un inhibidor de pan-HDAC que inhibe selectivamente la función desacetilante de las HDACs de clase I y clase II (pero no de clase III), mientras que tanto tubacina como tubastatina A (Fig. 7) son inhibidores altamente selectivos de HDAC6 (refs. 24 y 46). El tratamiento de neuronas DRG aisladas de ratones que expresan HSPB1^{S135F} sintomáticos con TSA, tubacina o tubastatina A aumentó el número total de mitocondrias (Fig. 8a) y restableció el número de mitocondrias en movimiento (Fig. 8b). Tubacina y tubastatina A fueron más efectivas en comparación con TSA (Fig. 8a, b).

Ejemplo 9. La inhibición de HDAC6 *in vivo* corrige el fenotipo CMT2 en ratones HSPB1 mutantes

35 A continuación, los autores de la invención trataron ratones que expresan HSPB1^{S135F} sintomáticos durante 21 d con un inhibidor no específico o uno específico para HDAC6. El tratamiento con TSA y tubastatina A dio como resultado un aumento significativo de cantidades de α -tubulina acetilada en los nervios periféricos ($P = 0,009$ y $P < 0,008$, respectivamente, Fig. 8c-e). TSA, pero no tubastatina A, también aumentó las cantidades de α -tubulina acetilada en la médula espinal (Fig. 8c,d,f). Tanto TSA como tubastatina A no afectaron la abundancia global de α -tubulina (Fig. 8c,d).

40 Además, los autores de la invención descubrieron que el tratamiento con TSA o tubastatina A incrementó significativamente el comportamiento motor de ratones que expresan HSPB1^{S135F} ($P < 0,0001$; Fig. 8g). El tratamiento con cualquiera de los fármacos también aumentó los parámetros electrofisiológicos tales como las amplitudes CMAP, así como las amplitudes SNAP (Fig. 8h,i). También observaron que se restauró la pérdida de los racimos receptores de acetilcolina en las placas terminales en el músculo gastrocnemio (Fig. 9a) y que disminuyó el nivel de denervación de las uniones neuromusculares restantes (Fig. 9b). Estas observaciones indican que el aumento de la abundancia de α -tubulina acetilada en los nervios periféricos conduce a la re-inervación de los músculos.

45 Finalmente, los autores de la invención midieron el transporte axonal *ex vivo* en neuronas DRG aisladas de ratones tratados. En contraposición con TSA, tubastatina A aumentó el número total de mitocondrias (Fig. 9c). Además de ello, el número de mitocondrias en movimiento aumentó significativamente después del tratamiento con TSA o tubastatina A ($P < 0,0001$, Fig. 9d). Tubastatina A era más eficaz que TSA y dio como resultado un rescate completo de la motilidad mitocondrial (Fig. 9c, d).

Referencias

1. Barisic, N. et al. Charcot-Marie-Tooth disease: a clinico-genetic confrontation. *Ann Hum Genet* **72**, 416-441 (2008).
2. Zuchner, S. y Vance, J.M. Mechanisms of disease: a molecular genetic update on hereditary axonal neuropathies. *Nat Clin Pract Neurol* **2**, 45-53 (2006).
- 5 3. Evgrafov, O.V. et al. Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet* **36**, 602-606 (2004).
4. Ismailov, S.M. et al. A new locus for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2F) maps to chromosome 7q11-q21. *Eur J Hum Genet* **9**, 646-650 (2001).
- 10 5. Arrigo, A.P. The cellular "networking" of mammalian Hsp27 and its functions in the control of protein folding, redox state and apoptosis. *Adv Exp Med Biol* **594**, 14-26 (2007).
6. Dierick, I., Irobi, J., De Jonghe, P. y Timmerman, V. Small heat shock proteins in inherited peripheral neuropathies. *Ann Med* **37**, 413-422 (2005).
7. Xanthoudakis, S. y Nicholson, D.W. Heat-shock proteins as death determinants. *Nat Cell Biol* **2**, E163-165 (2000).
- 15 8. Houlden, H. et al. Mutations in the HSP27 (HSPB1) gene cause dominant, recessive, and sporadic distal HMN/CMT type 2. *Neurology* **71**, 1660-1668 (2008).
9. Ikeda, Y. et al. A clinical phenotype of distal hereditary motor neuropathy type II with a novel HSPB1 mutation. *J Neurol Sci* **277**, 9-12 (2009).
- 20 10. James, P.A., Rankin, J. y Talbot, K. Asymmetrical late onset motor neuropathy associated with a novel mutation in the small heat shock protein HSPB1 (HSP27). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **79**, 461-463 (2008).
11. Kijima, K. et al. Small heat shock protein 27 mutation in a Japanese patient with distal hereditary motor neuropathy. *J Hum Genet* **50**, 473-476 (2005).
- 25 12. Ackerley, S. et al. A mutation in the small heat-shock protein HSPB1 leading to distal hereditary motor neuropathy disrupts neurofilament assembly and the axonal transport of specific cellular cargoes. *Hum Mol Genet* **15**, 347-354 (2006).
13. Zhai, J., Lin, H., Julien, J.P. y Schlaepfer, W.W. Disruption of neurofilament network with aggregation of light neurofilament protein: a common pathway leading to motor neuron degeneration due to Charcot-Marie-Tooth disease-linked mutations in NFL and HSPB1. *Hum Mol Genet* **16**, 3103-3116 (2007).
- 30 14. Hamers, F.P., Koopmans, G.C. y Joosten, E.A. CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. *J Neurotrauma* **23**, 537-548 (2006).
15. Vandeputte, C. et al. Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders. *BMC Neurosci.* **11**, 92 (2010).
16. Hollenbeck, P.J. y Saxton, W.M. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* **118**, 5411-5419 (2005).
- 35 17. Westermann, S. y Weber, K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 938-947 (2003).
18. Hammond, J.W., Cai, D. y Verhey, K.J. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 71-76 (2008).
19. Chen, S., Owens, G.C., Makarenkova, H. y Edelman, D.B. HDAC6 regulates mitochondrial transport in hippocampal neurons. *PLoS One* **5**, e10848 (2010).

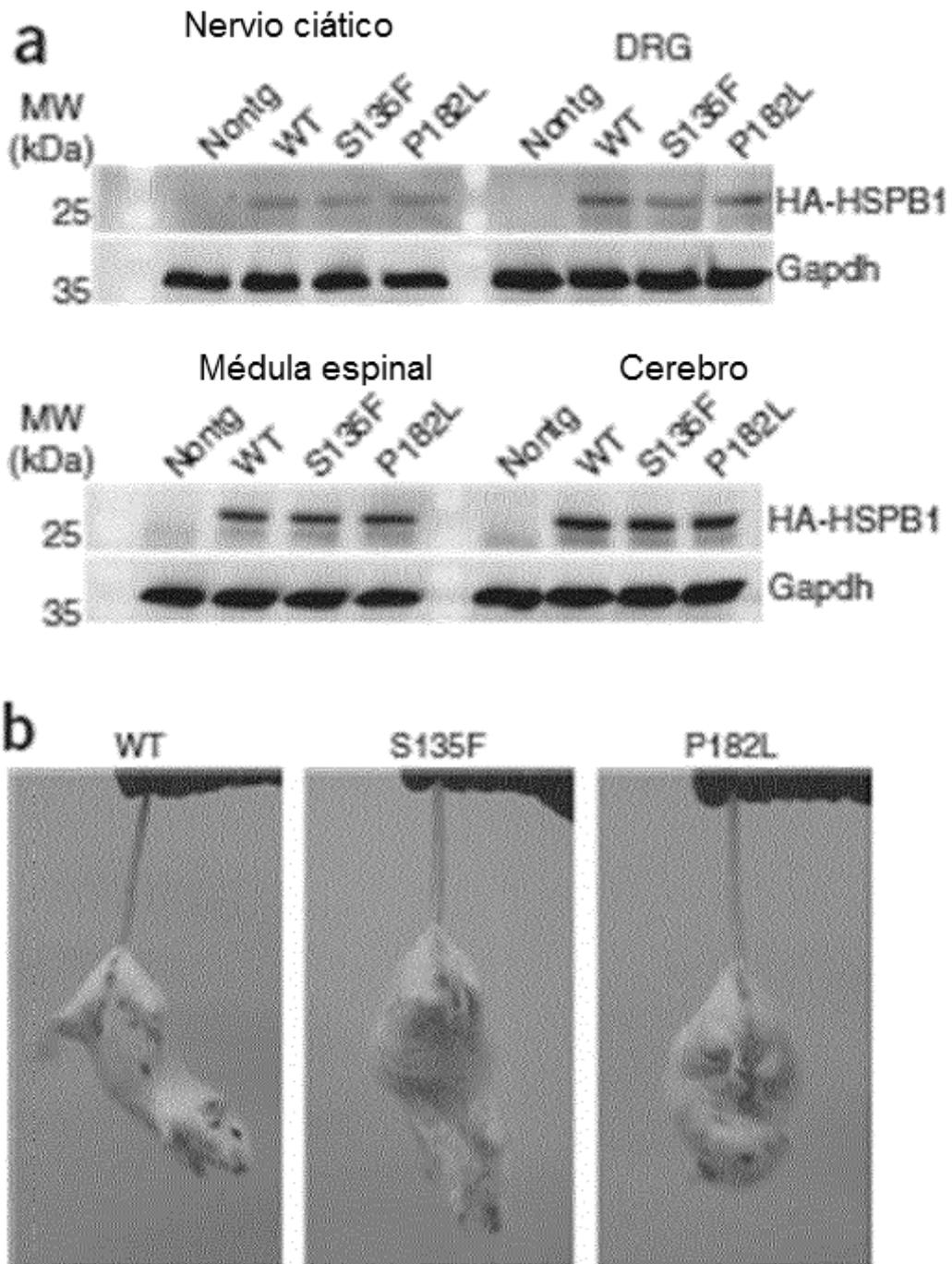
20. Gardiner, J., Barton, D., Marc, J. y Overall, R. Potential role of tubulin acetylation and microtubule-based protein trafficking in familial dysautonomia. *Traffic* **8**, 1145-1149 (2007).
21. Hempen, B. y Brion, J.P. Reduction of acetylated alpha-tubulin immunoreactivity in neurofibrillary tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 964-972 (1996).
- 5 22. Hubbert, C. *et al.* HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455-458 (2002).
23. Zhang, Y. *et al.* HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J* **22**, 1168-1179 (2003).
- 10 24. Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Wong, J.C., Grozinger, C.M. y Schreiber, S.L. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4389-4394 (2003).
25. Avila, A.M. *et al.* Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* **117**, 659-671 (2007).
26. Dierick, I. *et al.* Relative contribution of mutations in genes for autosomal dominant distal hereditary motor neuropathies: a genotype-phenotype correlation study. *Brain* **131**, 1217-1227 (2008).
- 15 27. Detmer, S.A., Vande Velde, C., Cleveland, D.W. y Chan, D.C. Hindlimb gait defects due to motor axon loss and reduced distal muscles in a transgenic mouse model of Charcot-Marie-Tooth type 2A. *Hum Mol Genet* **17**, 367-375 (2008).
28. Cartoni, R. *et al.* Expression of mitofusin 2(R94Q) in a transgenic mouse leads to Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Brain* **133**, 1460-1469 (2010).
- 20 29. Dequen, F. *et al.* Reversal of neuropathy phenotypes in conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Hum Mol Genet* **19**, 2616-2629 (2010).
30. De Vos, K.J., Grierson, A.J., Ackerley, S. y Miller, C.C. Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* **31**, 151-173 (2008).
- 25 31. Baloh, R.H., Schmidt, R.E., Pestronk, A. y Milbrandt, J. Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* **27**, 422-430 (2007).
32. de Brito, O.M. y Scorrano, L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605-610 (2008).
- 30 33. Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A. y Suter, U. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* **170**, 1067-1078 (2005).
34. Tradewell, M.L., Durham, H.D., Mushynski, W.E. y Gentil, B.J. Mitochondrial and axonal abnormalities precede disruption of the neurofilament network in a model of charcot-marie-tooth disease type 2E and are prevented by heat shock proteins in a mutant-specific fashion. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 642-652 (2009).
- 35 35. Friedman, J.R., Webster, B.M., Mastronarde, D.N., Verhey, K.J. y Voeltz, G.K. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J Cell Biol* **190**, 363-375 (2010).
36. Janke, C. y Kneussel, M. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci* **33**, 362-372 (2010).
37. Chuang, D.M., Leng, Y., Marinova, Z., Kim, H.J. y Chiu, C.T. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci* **32**, 591-601 (2009).

38. Kazantsev, A.G. y Thompson, L.M. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 854-868 (2008).
39. Riviuccio, M.A. *et al.* HDAC6 is a target for protection and regeneration following injury in the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19599-19604 (2009).
- 5 40. Dompierre, J.P. *et al.* Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* **27**, 3571-3583 (2007).
41. Kernochan, L.E. *et al.* The role of histone acetylation in SMN gene expression. *Hum Mol Genet* **14**, 1171-1182 (2005).
- 10 42. Dietz, K.C. y Casaccia, P. HDAC inhibitors and neurodegeneration: at the edge between protection and damage. *Pharmacol Res* **62**, 11-17 (2010).
43. Choudhary, C. *et al.* Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**, 834-840 (2009).
44. Krishnan, J. *et al.* Over-expression of Hsp27 does not influence disease in the mutant SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **106**, 2170-2183 (2008).
- 15 45. Vanden Berghe, P., Hennig, G.W. y Smith, T.K. Characteristics of intermittent mitochondrial transport in guinea pig enteric nerve fibers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G671-682 (2004).
46. Butler KV, Kalin J, Brochier C, Vistoli G, Langley B, Kozikowski AP. Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *J Am Chem Soc.* **132(31)**, 10842-6 (2010).
- 20 47. d'Ydewalle C, Krishnan J, Chiheb DM, Van Damme P, Irobi J, Kozikowski AP, Vanden Berghe P, Timmerman V, Robberecht W, Van Den Bosch L. HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med.* **17(8)**, 968-74 (2011).
- 25 48. d'Ydewalle C *et al.* A transgenic animal model for Charcot-Marie-Tooth disease caused by mutations in HSPB1 shows length-dependent muscle weakening and atrophy due to axonal loss. *Society for neuroscience abstract viewer and itinerary planner* 39, 2009, XP009154422, y 39ª reunión anual de la sociedad para neurociencia; Chicago, IL, EE.UU., 17-21 de octubre de 2009.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de HDAC6 selectivo para uso en el tratamiento de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.
- 5 2. El inhibidor de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de la enfermedad de CMT de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es CMT axonal o neuropatía motora hereditaria distal.
3. El inhibidor de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de la enfermedad de CMT de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad de CMT se caracteriza por al menos una mutación en el gen o la proteína HSPB1.
- 10 4. El inhibidor de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de la enfermedad de CMT de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha mutación en el gen o la proteína HSPB1 es una mutación en el dominio alfa-cristalino de HSPB1, particularmente del residuo S135, o en la cola C-terminal, particularmente del residuo P182.
5. El inhibidor de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de la enfermedad de CMT de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor de HDAC6 selectivo se selecciona de tubacina y tubastatina A.

FIGURA 1



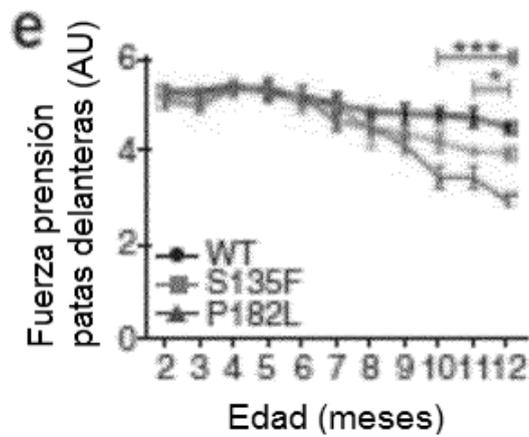
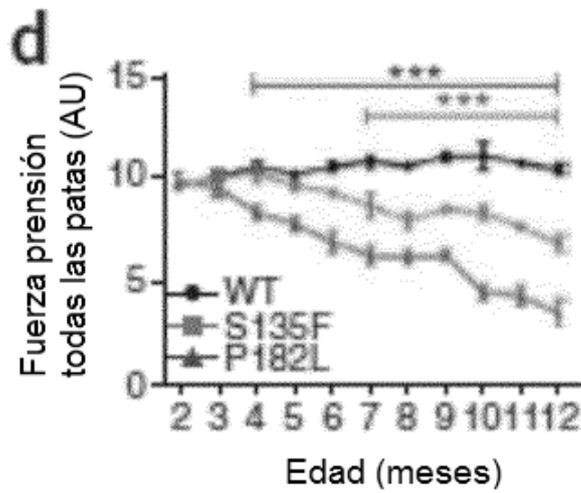
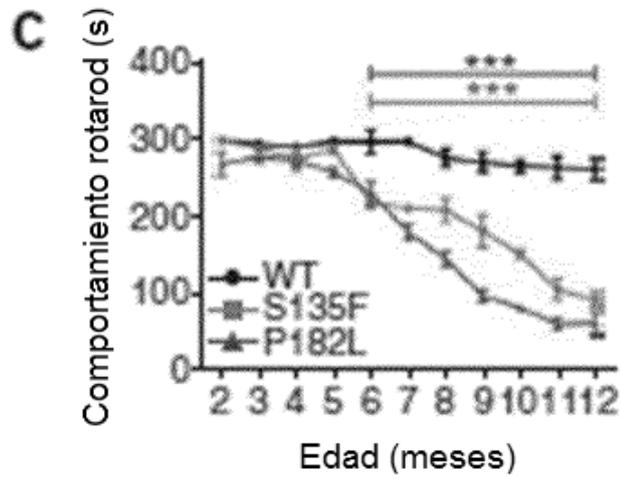


Figura 2

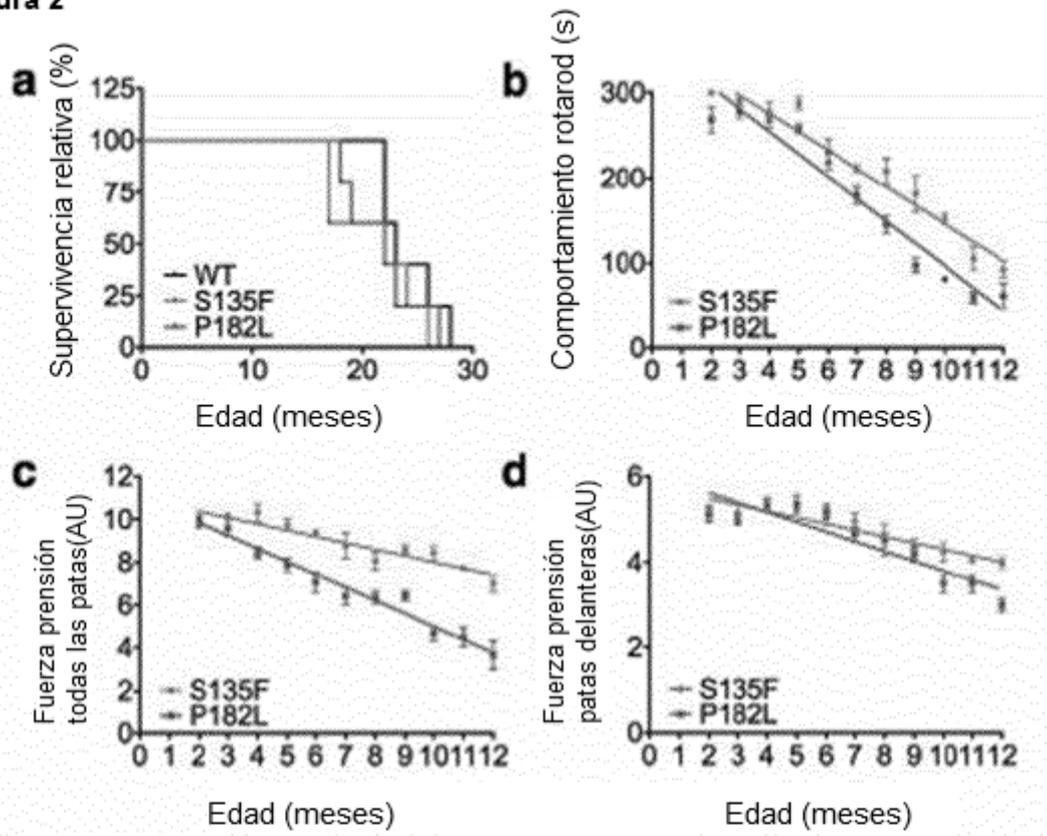
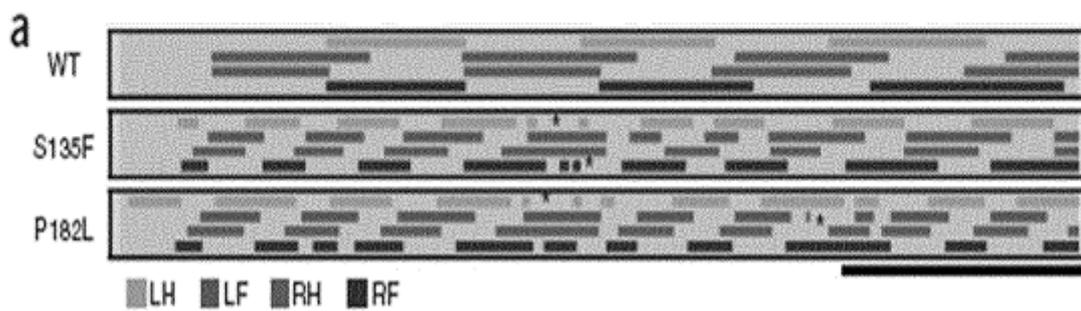


Figura 3



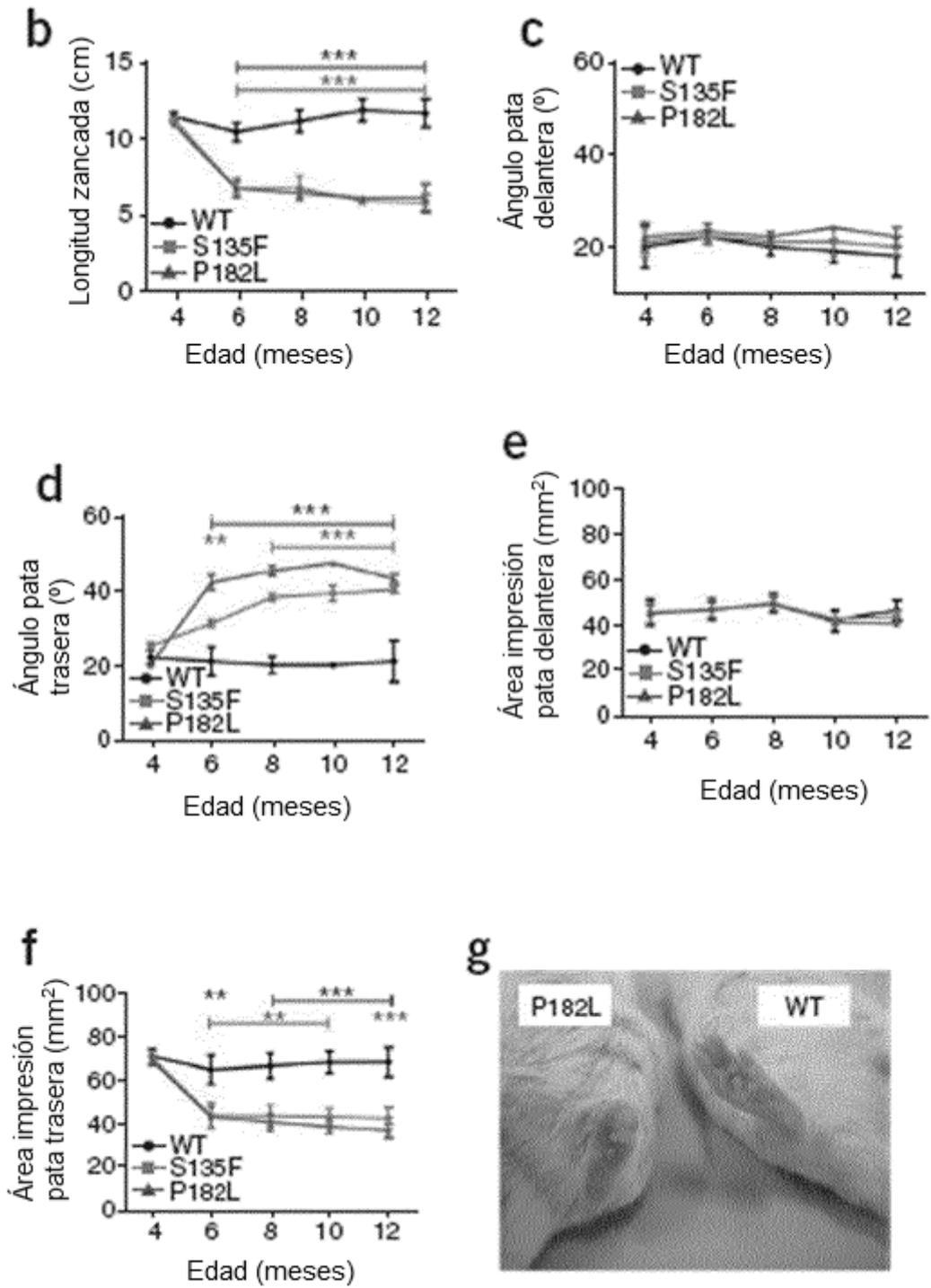
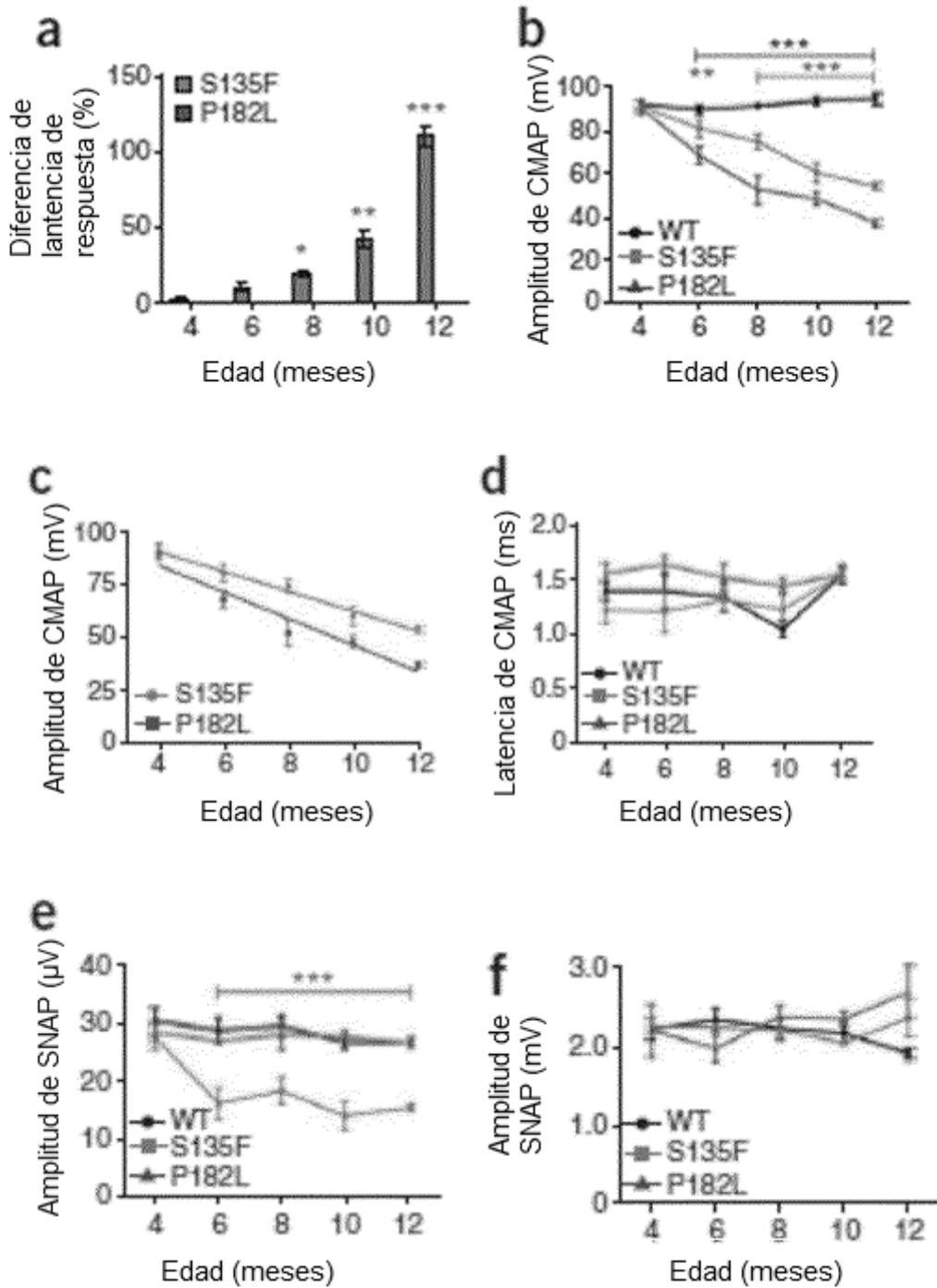


Figura 4



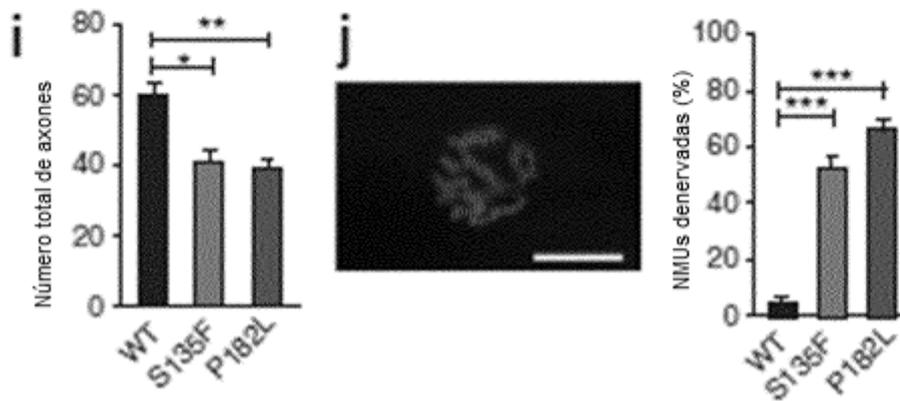
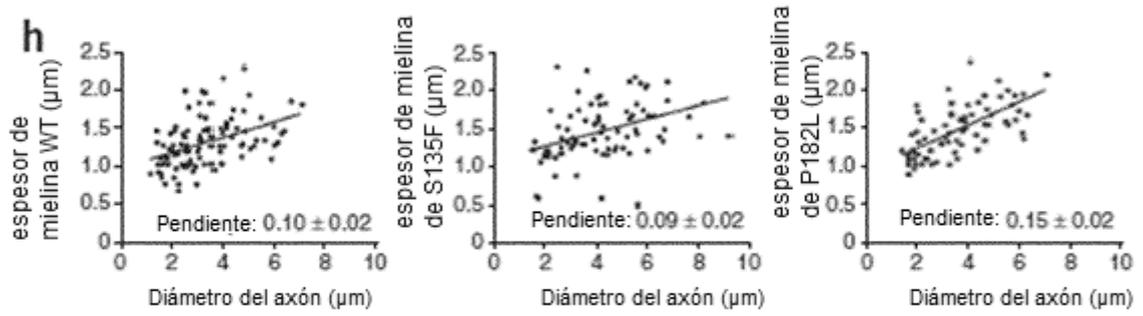
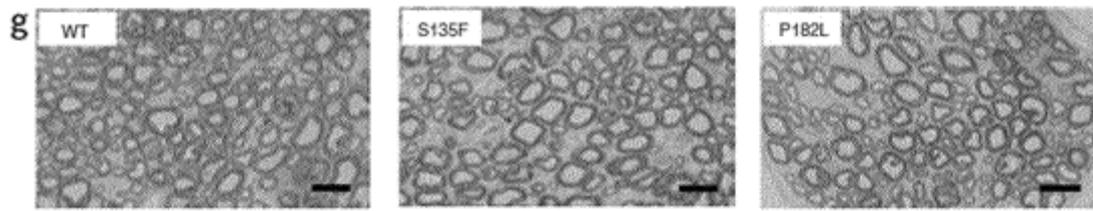


Figura 5

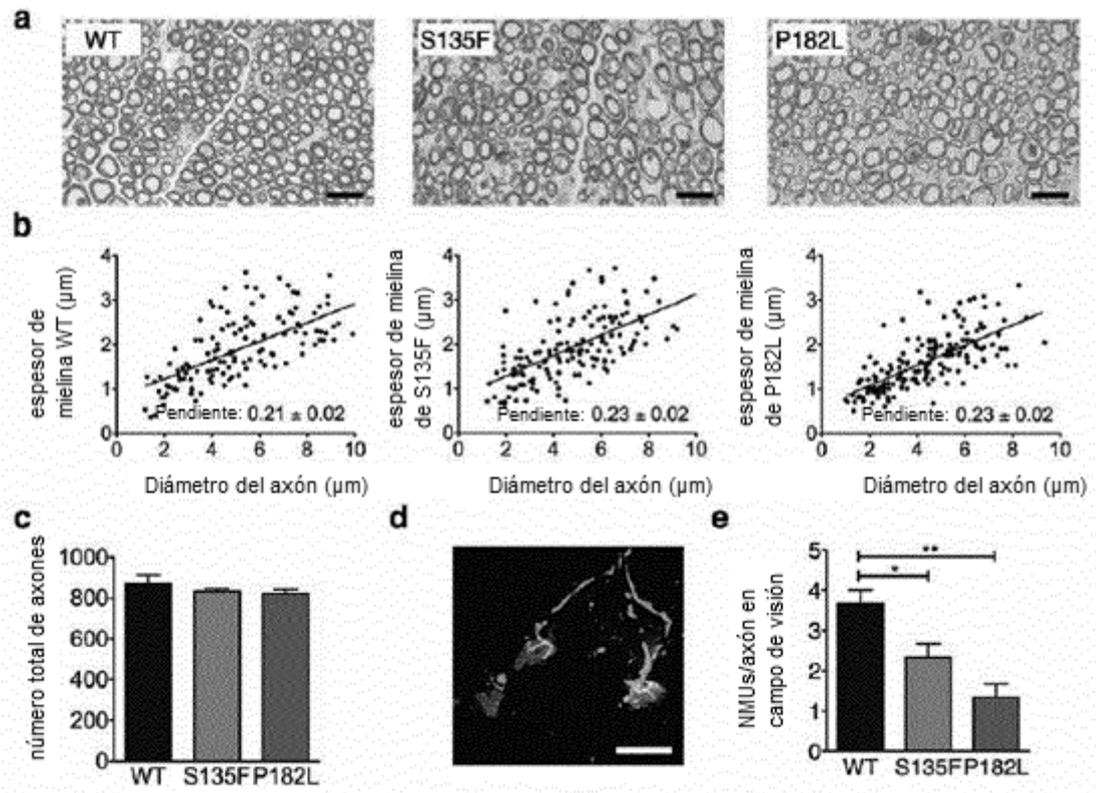
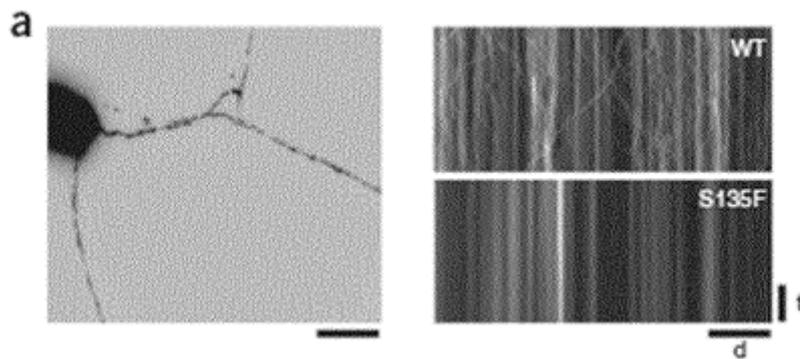
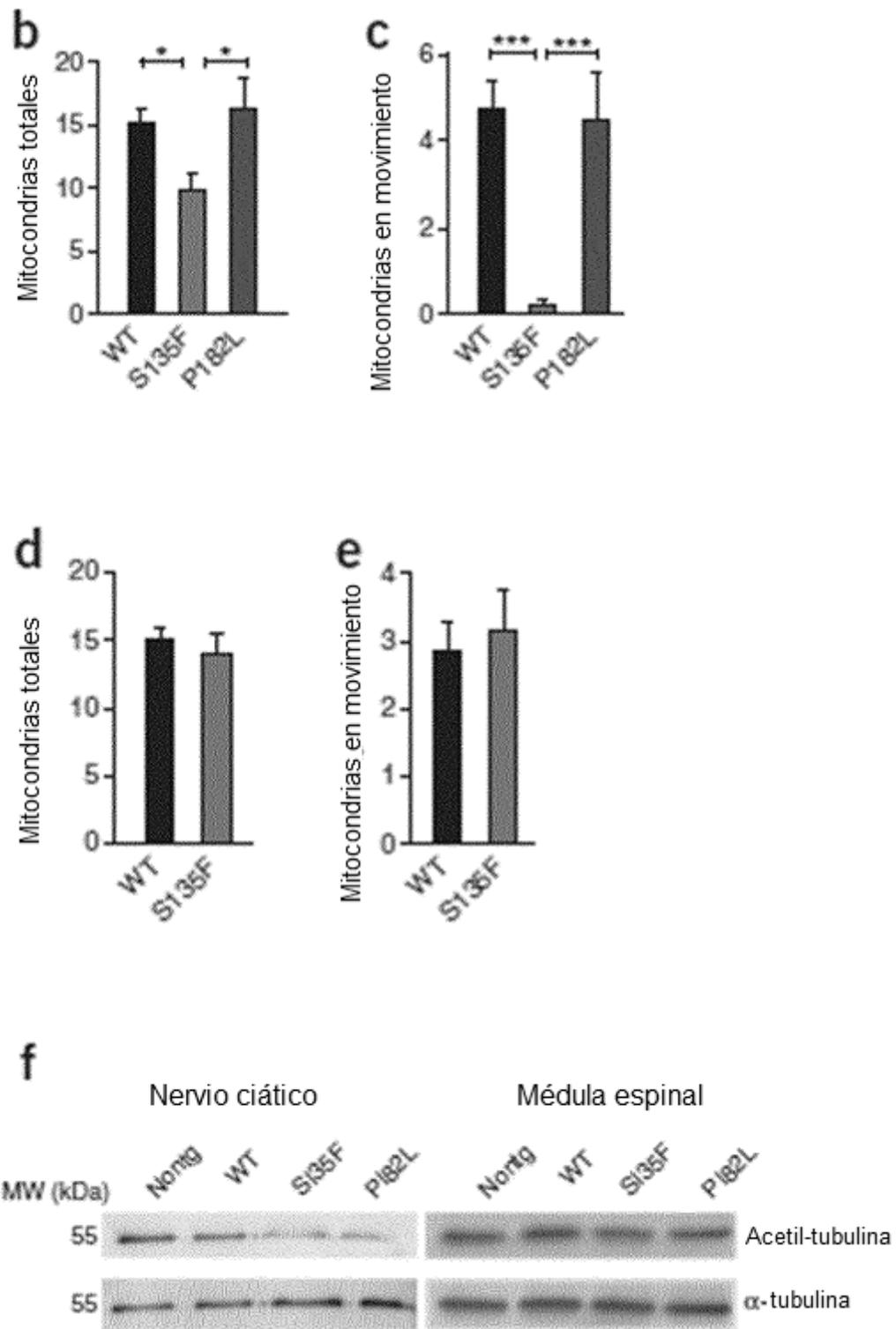


Figura 6





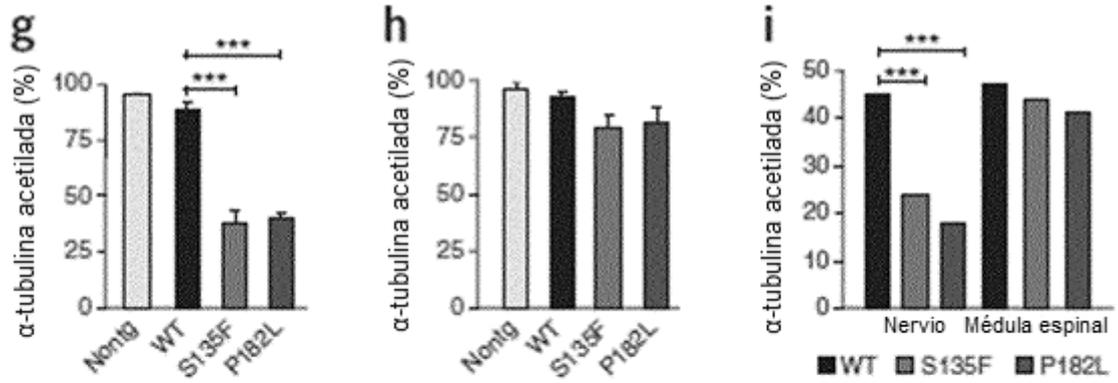


Figura 7

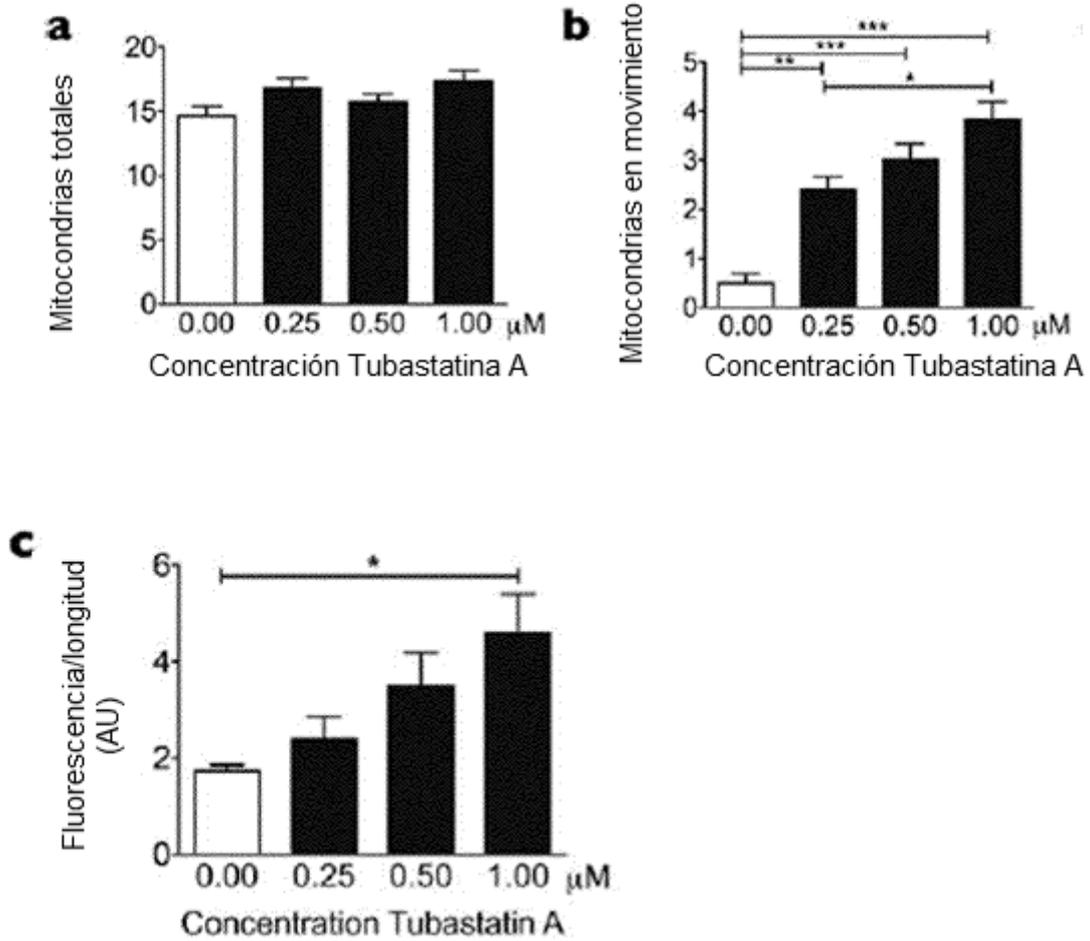
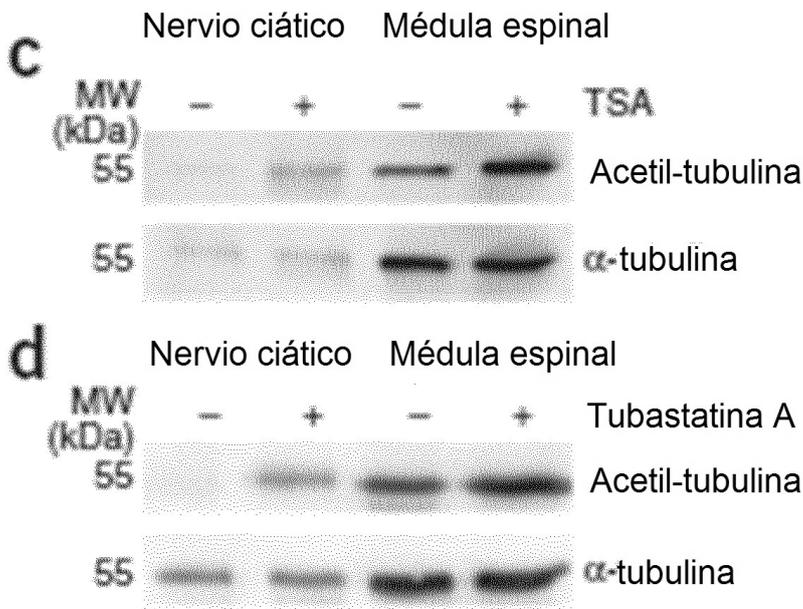
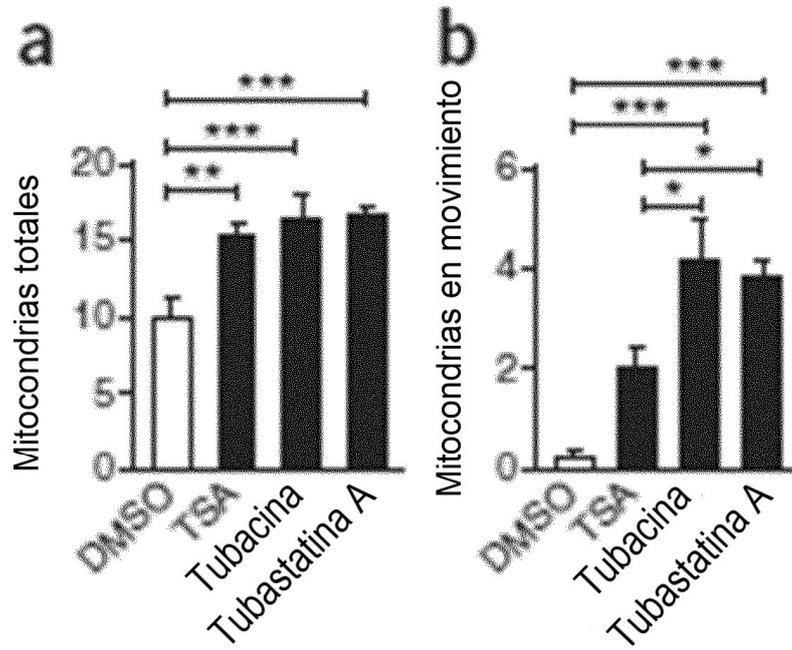


Figura 8



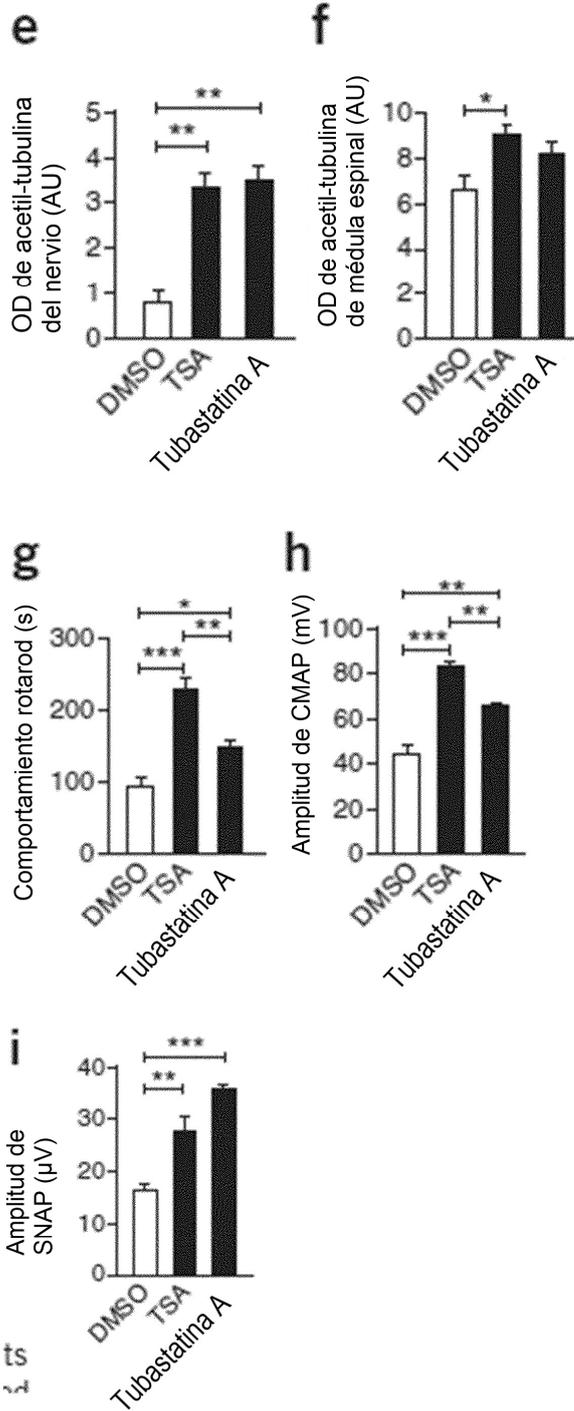


Figura 9

