

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 508**

51 Int. Cl.:

A61K 31/197 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 31/7004 (2006.01)

A61K 31/485 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2008** **E 12196650 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 2609916**

54 Título: **Nuevos enfoques terapéuticos para tratar CMT y trastornos relacionados**

30 Prioridad:

30.11.2007 EP 07301614
03.12.2007 US 991800 P

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

11.03.2019

73 Titular/es:

PHARNEXT (100.0%)
11, rue des Peupliers
92130 Issy-les-Moulineaux, FR

72 Inventor/es:

COHEN, DANIEL;
CHUMAKOV, ILYA;
GUERASSIMENKO, OXANA y
NABIROCHKIN, SERGUEI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 703 508 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

Nuevos enfoques terapéuticos para tratar CMT y trastornos relacionados

Descripción de la Invención

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

10 La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ("CMT") es una polineuropatía periférica genética poco frecuente. Esta enfermedad, que afecta a aproximadamente 1 de 2.500 individuos, es el trastorno hereditario más común del sistema nervioso periférico. Su inicio típicamente ocurre durante la primera o segunda década de vida, aunque puede ser detectada en la infancia. El curso de la enfermedad es crónico con degeneración muscular gradual. La enfermedad es incapacitante con casos de dolor neurológico acompañante y discapacidad muscular extrema. La CMT es una de las patologías genéticas mejor estudiadas con aproximadamente 30.000 casos en Francia. Mientras que una mayoría de pacientes con CMT portan una duplicación de un fragmento del cromosoma 17 que contiene un gen de mielina, PMP22 (forma CMT1A), dos docenas de genes han sido implicados en diferentes formas de CMT. Por consiguiente, aunque de origen monogénico, esta patología manifiesta heterogeneidad clínica debido a posibles genes moduladores. Los genes mutados en pacientes CMT se agrupan alrededor de vías moleculares muy conectadas que afectan a la diferenciación de células de Schwann o neuronas o que cambian la interacción de estas células en nervios periféricos.

20 PMP22 es un componente importante de la mielina expresado en la porción compacta esencialmente de todas las fibras mielinadas en el sistema nervioso periférico y es producido predominantemente por las células de Schwann. Una sobreexpresión moderada en 1,5 veces de una proteína PMP22 normal también se observa en las células de Schwann heterocigóticas para la duplicación en pacientes con CMT (en algunos casos raros, el fenotipo similar a CMT1A también puede estar ligado a mutaciones estructurales en 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). La evidencia directa de que la dosis de gen PMP22 anormal causa un fenotipo similar a CMT1A fue provista por experimentos transgénicos en modelos de roedores con sobreexpresión de proteína PMP22 (Niemann et al., 1999; Perea et al., 2001; Robaglia-Schlupp et al., 2002; Meyer et al., 2006; Sereda y Nave, 2006). Además, intervenciones terapéuticas con onapristona: inhibidor específico de receptor de progesterona (Sereda et al., 2003; Meyer zu Horste et al., 2007), y el ácido ascórbico (Passage et al., 2004), disminuyeron esta expresión en los animales transgénicos al mitigar o desacelerar la progresión del fenotipo de enfermedad.

30 Grandis M. et al. (Terapia actual de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, CURRENT TREATMENT OPTIONS IN NEUROLOGY, volumen 7, nº 1, 2005 págs 23-31) establece la relación entre la expresión del gen PMP22 y las enfermedades CMT-1A de Charcot-Marie-Tooth, neuropatías hereditarias con parálisis por presión (HNPP), neuropatía de Dejerine-Sottas (DSS) de tipo DSN A, y neuropatía hipomielinizante congénita (CHN) de tipo CHA. Los compuestos capaces de reducir la sobreexpresión de PMP22, como el ácido ascórbico y la onapristona, se describe que mitigan la neuropatía en modelos animales con CMT-1A.

40 Los datos experimentales existentes indican que la proteína PMP22 no sólo es el componente estructural de las vainas de mielina, sino también una proteína reguladora importante, que influye en múltiples rasgos fenotípicos en las células de Schwann. El mecanismo exacto que enlaza el nivel anormal de la proteína a una modificación de sus funciones en una célula glial CMT1A mutante no se entiende por completo, pero empiezan a surgir algunos mecanismos celulares que explican potencialmente sus efectos perjudiciales sobre la biología de células de Schwann.

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

50 La construcción inicial de un modelo dinámico de patología de CMT ha sido seguida por una selección de fármacos genéricos comercializados dirigidos a la regulación funcional de vías celulares pertinentes de la enfermedad de CMT1A.

Sumario de la invención

55 El propósito de la presente invención es proveer nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de CMT y trastornos relacionados. La invención describe también composiciones y métodos para la modulación de la expresión de PMP22 en un sujeto.

La invención se define en las reivindicaciones. Cualquier asunto que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo a modo informativo.

5 Los inventores han identificado varias vías que pueden ser reguladas en un sujeto para mitigar CMT y trastornos relacionados. Los inventores también han identificado varios fármacos que, en combinación(es) o solos, pueden afectar de manera efectiva esas vías que conducen a CMT y trastornos relacionados, y representan una nueva terapia para el tratamiento de estos trastornos.

La invención por lo tanto provee composiciones para su uso en métodos novedosos para el tratamiento de la enfermedad de CMT y trastornos relacionados.

10 También se describe el uso de combinaciones de compuestos para (la fabricación de un medicamento para) el tratamiento de CMT o un trastorno relacionado, en donde los compuestos se seleccionan de un agonista de receptor de GABA-B, un agonista de receptor muscarínico, un antagonista de receptor de hormona esteroidea, un fármaco que afecta a las vías de señalización de D-sorbitol, un antagonista o agonista parcial de receptor de opioides, un inhibidor de la señalización de hormona tiroidea, un activador de cinasa regulada por señal extracelular (ERK, por sus siglas en inglés) y un inhibidor de cinasa pAkt, un inhibidor de COX, y cualquier combinación(es) de los mismos.
15 El compuesto puede ser un fármaco o un anticuerpo (o un fragmento o derivado del mismo), una proteína o un péptido.

También se describe el uso de combinaciones de compuestos seleccionados de: compuesto A: D-Sorbitol (CAS 50-70-4) y sus posibles sales, profármacos y derivados; compuesto B: Baclofen (CAS 1134-47-0 y CAS 63701-56-4 para baclofen - clorhidrato) y sus posibles sales, profármacos y derivados; compuesto C: Pilocarpina (CAS 92-13-7 y CAS 54-71-7 para clorhidrato de pilocarpina) y sus posibles sales, profármacos y derivados; compuesto D: Naltrexona (CAS 16590-41-3 y CAS 16676-29-2 para clorhidrato de naltrexona) y sus posibles sales, profármacos y derivados; compuesto E: Metimazol (CAS 60-56-0) y sus posibles sales y derivados; compuesto F: Mifepristona (CAS 84371-65-3) y sus posibles sales, profármacos y derivados; Montelukast (CAS 158966-92-8) y sus posibles sales y derivados; Ketoprofeno (CAS 22071-15-4 y CAS 57495-14-4 para Ketoprofeno sódico) y sus posibles sales y derivados; compuesto G o compuestos individuales de los mismos, para la (fabricación de un medicamento para el) tratamiento de CMT o un trastorno relacionado.
20

También se describe el uso de un compuesto seleccionado de Acetazolamida (CAS 59-66-5 y CAS 1424-27-7 para la forma de sodio) y sus posibles sales y derivados; Aminoglutetimida (CAS 125-84-8) y sus posibles sales y derivados; Aztreonam (CAS 78110-38-0 y CAS 80581-86-8 existe para Aztreonam disódico) y sus posibles sales y derivados; Baclofen (CAS 1134-47-0 y CAS 63701-56-4 para baclofen - clorhidrato) y sus posibles sales, profármacos y derivados; Balsalazida (CAS 80573-04-2, 150399-21-6 (forma de disodio), 213594-60-6 (forma de disodio), y 82101-18-6) y sus posibles sales y derivados; Bicalutamida (CAS 90357-06-5) y sus posibles sales y derivados; Bromocriptina (CAS 25614-03-3 y CAS 22260-51-1 para la forma de mesilato) y sus posibles sales y derivados; Bumetanida (CAS 28395-03-1) y sus posibles sales y derivados; Buspirona (CAS 36505-84-7 y CAS 33386-08-2 para la forma de clorhidrato) y sus posibles sales y derivados; Ciprofloxacino (CAS 85721-33-1 y CAS 86393-32-0 para la forma de clorhidrato) y sus posibles sales y derivados; Clonidina (CAS 4205-90-7 y CAS 4205-91-8 para la forma de clorhidrato) y sus posibles sales y derivados; Ciclosporina A (CAS 59865-13-3) y sus posibles sales y derivados; Disulfiram (CAS 97-77-8) y sus posibles sales, profármacos y derivados; Exemestano (CAS 107868-30-4) y sus posibles sales y derivados; Felbamato (CAS 25451-15-4) y sus posibles sales y derivados; Fenofibrato (CAS 49562-28-9) y sus posibles sales y derivados; Finasterida (CAS 98319-26-7) y sus posibles sales y derivados; Flumazenil (CAS 78755-81-4) y sus posibles sales y derivados; Flunitrazepam (CAS 1622-62-4) y sus posibles sales y derivados; Furosemida (CAS 54-31-9) y sus posibles sales y derivados; Gabapentina (CAS 60142-96-3) y sus posibles sales y derivados; Galantamina (CAS 357-70-0 y CAS 1953-04-4 para la forma de bromhidrato) y sus posibles sales y derivados; Haloperidol (CAS 52-86-8) y sus posibles sales y derivados; Ibuprofeno (CAS 15687-27-1 y CAS 31121-93-4 para la sal de sodio) y sus posibles sales y derivados; Isoproterenol (CAS 7683-59-2, CAS 51-30-9 para la forma de clorhidrato, CAS 5984-95-2 (clorhidrato de isoproterenol) y sus posibles sales y derivados; L-carnitina (CAS 541-15-1 y CAS 6645-46-1 para la forma de clorhidrato) y sus posibles sales y derivados; Liotironina (T3) (CAS 6893-02-3 y CAS 55-06-1 para la forma de sodio) y sus posibles sales y derivados; Losartan (CAS 114798-26-4 y CAS 124750-99-8 para la forma de potasio) y sus posibles sales y derivados; Loxapina (CAS 1977-10-2, y CAS 27833-64-3 y CAS 54810-23-0 para las formas de succinato y clorhidrato, respectivamente) y sus posibles sales; Metaproterenol (CAS 586-06-1 y CAS 5874-97-5 para la forma de sulfato) y sus posibles sales y derivados; Metaraminol (CAS 54-49-9 y CAS 33402-03-8 para la forma de bitartrato) y sus posibles sales y derivados; Metformina (CAS 657-24-9 y CAS 1115-70-4 para la forma de clorhidrato) y sus posibles sales, derivados; Metimazol (CAS 60-56-0) y sus posibles sales y derivados; Metilergonovina (CAS 113-42-8 y CAS 57432-61-8 correspondientes a la sal de maleato) y sus posibles sales y derivados; Metopirona (CAS 54-36-4) y sus posibles sales y derivados; Metoprolol (CAS 37350-58-6, CAS 51384-51-1 y CAS 56392-17-7 (formas de tartato)) y sus posibles sales y derivados; Mifepristona (CAS 84371-65-3) y sus posibles sales, profármacos y derivados; Nadolol (CAS 42200-33-9) y sus posibles sales y derivados; Naloxona (CAS 465-65-6 y CAS 51481-60-8 para el clorhidrato dihidratado) y sus posibles sales y derivados; Naltrexona (CAS 16590-41-3 y CAS 16676-29-2 para el clorhidrato de naltrexona) y sus posibles sales profármacos y derivados; Norfloxacin (CAS 70458-96-7) y sus posibles sales y derivados; Pentazocina (CAS 359-83-1, CAS 7361-76-4 para la forma de pentazocina (+), CAS 17146-95-1 para la forma lactato, CAS 64 024-15-3 para la forma de clorhidrato) y sus posibles sales y derivados;
30
35
40
45
50
55
60

5 Fenoxibenzamina (CAS 59-96-1, CAS 63-92-3 para la forma de clorhidrato) y sus posibles sales y derivados; Fenilbutirato (CAS 1716-12-7, que corresponde a forma de sodio; CAS 1821-12-1 que corresponde a ácido 4-fenilbutírico) y sus posibles sales y derivados; Pilocarpina (CAS 92-13-7 y CAS 54-71-7 para clorhidrato de pilocarpina) y sus posibles sales, profármacos y derivados; Pioglitazona (CAS 111025-46-8, CAS 112529-15-4 para la forma de clorhidrato) y sus posibles sales y derivados; Prazosina (CAS 19216-56-9, CAS 19237-84-4 para la forma de clorhidrato) y sus posibles sales y derivados; Raloxifeno (CAS 84449-90-1, CAS 82640-04-8 para la forma de clorhidrato) y sus posibles sales y derivados; Rifampina (CAS 13292-46-1) y sus posibles sales y derivados; Simvastatina (CAS 79902-63-9) y sus posibles sales y derivados; D-Sorbitol (CAS 50-70-4) y sus posibles sales, profármacos y derivados; el compuesto espirolactona (CAS 52-01-7) y sus posibles sales y derivados; Tamoxifeno (CAS 10540-29-1, CAS 54965-24-1 para la forma de citrato) y sus posibles sales y derivados; Trilostano (CAS 13647-35-3) y sus posibles sales y derivados; ácido valproico (CAS 99-66-1, CAS 1069-66-5 y CAS 76584-70-8 para la forma de sodio y forma de sodio de Divalproex respectivamente) y sus posibles sales y derivados; Carbamazepina (CAS 298-46-4, CAS 85756-57-6 para la forma de dihidrato) y sus posibles sales y derivados; Ketoprofeno (CAS 22071-15-4 y CAS 57495-14-4 para Ketoprofeno sódico) y sus posibles sales y derivados; Flurbiprofeno (CAS 5104-49-4, CAS 51543-39-6 y CAS 51543-40-9 correspondiente a los enantiómeros S y R; CAS 56767-76-1 correspondiente a la forma de sodio) y sus posibles sales y derivados; Diclofenaco (CAS 15307-86-5, CAS 15307-79-6 para la forma de sodio; CAS 15307-81-0 para la forma de potasio) y sus posibles sales y derivados; Meloxicam (CAS 71125-38-7) y sus posibles sales y derivados; Tacrolimus (CAS 104987-11-3, CAS 109581-93-3 para la forma sólida de monohidrato) y sus posibles sales y derivados; Diazepam (CAS 439-14-5) y sus posibles sales y derivados; Dutasterida (CAS 164656-23-9) y sus posibles sales y derivados; Indometacina (CAS 53-86-1, CAS 74252-25-8 y 7681-54-1 para 2 formas de sodio) y sus posibles sales y derivados; Dinoprostona (CAS 363-24-6) y sus posibles sales y derivados; Carbacol (CAS 51-83-2, CAS 462-58-8 que corresponde a carbonato de colina (éster)) y sus posibles sales y derivados; Estradiol (CAS 50-28-2 y 57-91-0 para las formas beta y alfa respectivamente) y sus posibles sales y derivados; Curcumina (CAS 458-37-7) y sus posibles sales y derivados; Litio (CAS 7439-93-2, CAS 554-13-2 y 919-16-4 para las formas anhidras de carbonato y citrato; CAS 7447-41-8 para las formas de cloruro) y sus posibles sales y derivados; Rapamicina (CAS 53123-88-9) y sus posibles sales y derivados; Betaína (CAS 2218-68-0, para betaína cloral; CAS 107-43-7, 17146-86-0, 590-46-5, 590-47-6 corresponde a betaína, monohidrato de betaína, clorhidrato de betaína y formas monohidratadas de betaína) y sus posibles sales y derivados; Trehalosa (CAS 4484-88-2) y sus posibles sales y derivados; Amilorida (CAS 2016-88-8, correspondiente a clorhidrato anhidro; CAS 2609-46-3 correspondiente a amilorida (identificado en IPA)) y sus posibles sales y derivados; Albuterol (CAS 18559-94-9, CAS 51022-70-9 para la forma de sulfato) y sus posibles sales y derivados, o combinación(es) de los mismos, para la (fabricación de un medicamento para el) tratamiento de CMT o un trastorno relacionado.

35 También se describe el uso de una combinación de por lo menos dos compuestos seleccionados de D-Sorbitol (compuesto A); Baclofeno (compuesto B); Pilocarpina (compuesto C); Naltrexona (compuesto D); Metimazol (compuesto E); Mifepristona (compuesto F), y Ketoprofeno (compuesto G), o sales o profármacos de los mismos, para la (fabricación de un medicamento para el) tratamiento de CMT o un trastorno relacionado.

40 También se describe el uso de un compuesto seleccionado de D-Sorbitol (compuesto A); Baclofeno (compuesto B); Pilocarpina (compuesto C); Naltrexona (compuesto D); Metimazol (compuesto E); Mifepristona (compuesto F), y Ketoprofeno (compuesto G), o sales, profármacos o agonistas de los mismos, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de CMT o un trastorno relacionado.

45 También se describe el uso de una combinación de por lo menos dos compuestos seleccionados de Acetazolamida; Aminoglutetimida; Aztreonam; Baclofeno; Balsalazida; Bicalutamida; Bromocriptina; Bumetanida; Buspirona; Ciprofloxacina; Clonidina; Ciclosporina A; Disulfiram; Exemestano; Felbamato; Fenofibrato; Finasterida; Flumazenil; Flunitrazepam; Furosemida; Gabapentina; Galantamina; Haloperidol; Ibuprofeno; Isoproterenol; L-carnitina; Liotironina (T3); Losartano; Loxapina; Metaproterenol; Metaraminol; Metformina; Metimazol; Metilergonovina; Metopirona; Metoprolol; Mifepristona; Montelukast; Nadolol; Naltrexona; Naloxona; Norfloxacin; Pentazocina; Fenoxibenzamina; Fenilbutirato; Pilocarpina; Pioglitazona; Prazosina; Raloxifeno; Rifampina; Simvastatina; Espironolactona; Tamoxifeno; Trilostano; Ácido Valproico; Carbamazepina; Ketoprofeno; Flurbiprofeno; Diclofenaco; Meloxicam; D-Sorbitol; Tacrolimus; Diazepam; Dutasterida; Indometacina; Dinoprostona; Carbacol; Estradiol; Curcumina; Litio; Rapamicina; Betaína; Trehalosa; Amilorida; Albuterol, o sales, profármacos o agonistas de los mismos, para el (fabricación de un medicamento para el) tratamiento de CMT o un trastorno relacionado.

55 También se describe el uso de una combinación de por lo menos dos compuestos seleccionados de D-Sorbitol (compuesto A); Baclofen (compuesto B); Pilocarpina (compuesto C); Naltrexona (compuesto D); Metimazol (compuesto E); Mifepristona (compuesto F), Ketoprofeno (compuesto G) o sales, profármacos o agonistas de los mismos, para (la fabricación de un medicamento para) reducir la expresión de PMP22 en un sujeto que tiene CMT o un trastorno relacionado.

60 También se describe el uso de una combinación de por lo menos dos compuestos seleccionados de Acetazolamida; Aminoglutetimida; Aztreonam; Baclofeno; Balsalazida; Bicalutamida; Bromocriptina; Bumetanida; Buspirona; Ciprofloxacin; Clonidina; Ciclosporina A; Disulfiram; Exemestano; Felbamato; Fenofibrato; Finasterida; Flumazenil; Flunitrazepam; Furosemida; Gabapentina; Galantamina; Haloperidol; Ibuprofeno; Isoproterenol; L-carnitina; Liotironina (T3); Losartano; Loxapina; Metaproterenol; Metaraminol; Metformina; Metimazol; Metilergonovina;

Metopirona; Metoprolol; Mifepristona; Montelukast; Nadolol; Naltrexona; Naloxona; Norfloxacin; Pentazocina; Fenoxibenzamina; Fenilbutirato; Pilocarpina; Pioglitazona; Prazosina; Raloxifeno; Rifampina; Simvastatina; Espironolactona; Tamoxifeno; Trilostano; Ácido Valproico; Carbamazepina; Ketoprofeno; Flurbiprofeno; Diclofenaco; Meloxicam; D-Sorbitol; Tacrolimus; Diazepam; Dutasterida; Indometacina; Dinoprostona; Carbacol; Estradiol; Curcumina; Litio; Rapamicina; Betaína; Trehalosa; Amilorida; Albuterol, o sales, profármacos o agonistas de los mismos, para (la fabricación de un medicamento para) reducir la expresión de PMP22 en un sujeto que tiene CMT o un trastorno relacionado.

También se describe una composición farmacéutica que comprende una combinación de por lo menos dos compuestos seleccionados del grupo de D-Sorbitol, Baclofeno, Pilocarpina, Naltrexona, Metimazol, Mifepristona y Ketoprofeno, sales o profármacos de los mismos, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una descripción, los fármacos anteriores se usan en combinación(es), para proveer el efecto más efectivo. A este respecto, un objeto adicional de esta invención radica en el uso de una combinación de fármacos para el tratamiento de CMT o un trastorno relacionado, en donde la combinación se selecciona de:

- un antagonista de receptor de hormona esteroidea y un compuesto seleccionado de un agonista de receptor muscarínico, un agonista de receptor de GABA-B, un activador de ERK, un inhibidor de cinasa pAkt, un fármaco que afecta a la señalización de la hormona tiroidea; un fármaco que afecta a las vías de señalización de D-sorbitol, un antagonista de receptor de opioides, un inhibidor de COX;

- un agonista de receptor muscarínico y un compuesto seleccionado de agonista de receptor de GABA-B, un activador de ERK, un inhibidor de cinasa pAkt, un fármaco que afecta a la señalización de hormona tiroidea; un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un antagonista de receptor de opioide; un inhibidor de Cox;

- un agonista de receptor de GABA-B y un compuesto seleccionado de un activador de ERK, un inhibidor de cinasa pAkt, un fármaco que afecta a la señalización de hormona tiroidea; un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un antagonista de receptor de opioides y un inhibidor de Cox;

- un activador de ERK y un compuesto seleccionado de un inhibidor de cinasa pAkt, un fármaco que afecta a la señalización de hormona tiroidea; un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un antagonista de receptor de opioides, un inhibidor de Cox;

- un inhibidor de cinasa pAkt y un fármaco que afecta a la señalización de hormona tiroidea; un compuesto seleccionado de un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un antagonista de receptor de opioides y un inhibidor de Cox;

-un fármaco que afecta a la señalización de hormona tiroidea; y un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol y un antagonista de receptor de opioides o un inhibidor de Cox;

-un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol y un antagonista de receptor de opioides o un inhibidor de Cox;

- un antagonista de receptor de opioides y un inhibidor de Cox.

En una descripción particular, la invención se refiere al uso de los compuestos o composiciones o combinaciones anteriores para el tratamiento de CMT.

La invención además describe un método para el tratamiento de CMT o un trastorno relacionado, particularmente CMT, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de cualquier compuesto o combinación de compuestos como se describió antes. Un método preferido comprende la administración de una combinación de por lo menos dos compuestos seleccionados de compuesto A, compuesto B, compuesto C, compuesto D, compuesto E, compuesto F, y compuesto G, o sales o profármacos de los mismos.

A este respecto, una descripción específica de esta invención es un método de tratamiento de CMT1a en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un compuesto o una combinación de compuestos como se describió antes.

Cualquiera de los varios usos o métodos de tratamiento descritos aquí también pueden incluir un paso opcional de diagnosticar a un paciente como que tiene CMT o un trastorno relacionado, particularmente CMT1A, o identificar a un individuo como en riesgo de desarrollar CMT o un trastorno relacionado, particularmente CMT1A.

A este respecto, una descripción más de esta invención es un método de tratamiento de CMT, particularmente CMT1a, comprendiendo el método (1) evaluar si un sujeto tiene CMT, particularmente CMT1a y (2) tratar al sujeto que tiene CMT, particularmente CMT1a con una cantidad efectiva de una combinación de compuestos como se describió antes. La determinación de si un sujeto tiene CMT, particularmente CMT1a, se puede hacer mediante varias pruebas conocidas como tales en la técnica, tales como ensayos de ADN. Esos diagnósticos se pueden hacer, por ejemplo, evaluando la expresión o función de PMP22 en (una muestra procedente de) el paciente antes y durante la terapia.

Una descripción más de esta invención describe también una composición que comprende PMP22 o un fragmento de PMP22 como un inmunógeno para la vacunación de pacientes.

Una descripción más de esta invención describe también una vacuna que comprende un anticuerpo anti-PMP22, o un fragmento o derivado de ese anticuerpo.

- 5 Los compuestos y composiciones se pueden usar para el tratamiento de CMT o un trastorno relacionado en cualquier sujeto mamífero, particularmente sujetos humanos, muy preferiblemente CMT1a.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: Efecto de fármacos seleccionados sobre el nivel de expresión de ARNm de PMP22.

Figura 2: Efecto de fármacos seleccionados sobre el nivel de expresión de ARNm de PMP22.

- 10 Figura 3: Efecto de fármacos seleccionados a varias dosis sobre el nivel de expresión de ARNm de PMP22.

Figura 4: Efecto de fármacos seleccionados sobre el nivel de expresión de la proteína PMP22.

Figura 5: Efecto de combinación de Pilocarpina (comparativo) y Naltrexona sobre el nivel de expresión de la proteína PMP22.

- 15 Figura 6: (comparativo) Resultados de la evaluación motora de las ratas hembras en la prueba de barra a lo largo del estudio de tratamiento presentado en forma de tendencias. A: Metimazol; B: Pilocarpina.

Figura 7: (comparativo) Media de los rendimientos de la prueba de barra registradas en esta prueba después de 16 semanas de tratamiento. A: Metimazol; B: Pilocarpina.

Figura 8: (comparativo) Evaluación electrofisiológica de la amplitud del potencial nervioso sensorial en ratas con CMT tratadas con fármacos durante 20 semanas. A: Metimazol; B: Pilocarpina.

- 20 **Descripción Detallada de la Invención**

La presente invención provee nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de CMT o trastornos relacionados. La invención describe el uso novedoso de fármacos o combinaciones de fármacos que permiten una corrección efectiva de esas enfermedades y se pueden usar en cualquier sujeto mamífero.

- 25 Un objeto de esta invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende D-Sorbitol o Baclofeno, o una sal de los mismos, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Charcot-MarieTooth o un trastorno relacionado seleccionado entre el síndrome de Dejerine-Sottas (DSS) y la neuropatía hipomielinizante congénita (CHN).

- 30 Otro objeto de esta invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende naltrexona, o una sal de la misma, para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión de PMP22 anormal seleccionada entre CMT1A, el síndrome de Dejerine-Sottas (DSS) y la neuropatía hipomielinizante congénita (CHN).

Dentro del contexto de la presente invención, el término "trastorno relacionado con CMT" designa otras enfermedades asociadas con la expresión anormal de proteínas de mielina que incluyen PMP22. La variedad de estas enfermedades se debe a la variedad de los papeles de PMP22.

- 35 PMP22 es primeramente un componente principal de la mielina expresado en la porción compacta de esencialmente todas las fibras mielinadas en el sistema nervioso periférico. La proteína PMP22 interactúa con otra proteína de la mielina estructural P0, y por lo tanto, la relación de proteína PMP22/P0 alterada podría influir en la compactación de vainas de mielina (Vallat et al., 1996; D'Urso et al., 1999). Como se demuestra por estudios *in vitro*, la proteína PMP22 también está implicada en la regulación de la dispersión de células de una manera dependiente de Rho y por lo tanto podría afectar la formación de la vaina axonal (Brancolini et al., 1999). Más aún, PMP22 forma complejos con integrinas $\alpha 6 \beta 4$ y podría mediar en la interacción de las células de Schwann con la matriz extracelular (Amici et al., 2006; Amici et al., 2007). Además, el nivel incrementado de proteína PMP22 puede alterar la vía de reciclado endosómico de la membrana plasmática regulada por Arf6 y conduce a la acumulación de PMP22 en los endosomas tardíos (Chies et al., 2003). También se demuestra que la proteína PMP22 sobreexpresada perturba la distribución de proteína intracelular y sobrecarga la maquinaria de degradación de proteínas en células de Schwann (Notterpek et al., 1997; Tobler et al., 2002; Fortun et al., 2003; Fortun et al., 2006; Fortun et al., 2007; Khajavi et al., 2007). Finalmente, PMP22 está directamente implicada en el control de la proliferación celular y la muerte celular programada (Sancho et al., 2001; Atanasoski et al., 2002), y se demostró que la proteína PMP22 mutante provoca reorganización profunda y la expresión aberrante de canales de iones axonales (Ulzheimer et al., 2004; Devaux y Scherer, 2005). PMP22 también es expresada en algunas partes del cerebro humano (Ohsawa Y et al., 2006). Hay evidencia para su implicación en trastornos del estado de ánimo (Le-Niculescu H. et al., 2008) y en la esquizofrenia (Dracheva S. et al., 2006). PMP22 juega un papel en el establecimiento de la barrera hematoencefálica (Roux K.J. et al., 2004) que a menudo es defectuosa en la esclerosis múltiple y en enfermedades neurodegenerativas.

Consecuentemente, la expresión "trastorno relacionado con CMT" designa a la enfermedad de Alzheimer (AD), demencia senil de tipo AD (SDAT), enfermedad de Parkinson, demencia de cuerpos de Lewis, demencia vascular, autismo, alteración cognitiva ligera (MCI), alteración de la memoria asociada con la edad (AAMI) y problemas asociados con el envejecimiento, Parkinsonismo post-encefálico, esquizofrenia, depresión, enfermedad bipolar y otros trastornos del estado de ánimo, enfermedad de Huntington, enfermedades de las neuronas motoras que incluyen esclerosis lateral amiotrófica (ALS), esclerosis múltiple, neuropatías idiopáticas, neuropatía diabética, neuropatía tóxica que incluye neuropatía inducida por tratamientos con fármacos, neuropatías provocadas por VIH, radiación, metales pesados y estados de deficiencia de vitaminas, neurodegeneración provocada por priones, que incluye enfermedad de Creutzfeld-Jakob (CJD), encefalopatía espongiiforme bovina (BSE), GSS, FFI, Kuru y síndrome de Alper.

El trastorno relacionado con CMT designa una neuropatía, tal como neuropatías desmielinizantes, que incluyen HNPP (neuropatía hereditaria con propensión a parálisis de presión), CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1X, CMT2A, CMT2B, CMT2D, CMT2E, CMT2-P0, neuropatías desmielinizantes severas, DSS (síndrome de Dejerine-Sottas), CHN (neuropatía hipomielinizante congénita), CMT4A, CMT4B1, CMT4B2, CMT4D, CMT4F, CMT4, AR-CMT2A, HSN1.

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

También, el término compuesto designa los compuestos químicos como se nombran específicamente en la solicitud, así como cualquier composición farmacéutica con sal, hidrato, éster, éter, isómeros, racemato, conjugados, profármacos aceptables de los mismos.

El término anticuerpo designa un anticuerpo monoclonal o policlonal. El término fragmento designa, sin limitación, una cadena de inmunoglobulina, un fragmento Fab o Fab', o una región CDR. Un derivado de un anticuerpo incluye un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, etc. Los fragmentos o derivados del anticuerpo deberán retener la especificidad de epítipo del anticuerpo.

También, el término "combinación" designa un tratamiento en donde por lo menos dos fármacos son co-administrados a un sujeto para causar un efecto biológico. En una terapia combinada, por lo menos dos fármacos se pueden administrar juntos o separados, al mismo tiempo o secuencialmente. También, por lo menos dos fármacos se pueden administrar a través de diferentes vías y protocolos.

La invención muestra que la funcionalidad de proteína(s) de mielina periférica puede ser modulada por fármacos que afectan al receptor muscarínico, receptor de GABA-B, receptor de hormona esteroidea, receptor de opioide, vías de señalización de sorbitol, o ERK de activación (cinasa regulada por señal extracelular), inhibidor de COX, inhibidores de señalización de hormona tiroidea y/o inhibiendo la pAkt cinasa, lo que permite por lo tanto el diseño de nuevos enfoques terapéuticos de CMT y trastornos relacionados.

Además, la invención describe la identificación y actividades de fármacos particulares que, ya sea en combinación(es) o solos modulan las vías anteriores y se pueden usar para tratar esas enfermedades.

De manera más específica, la invención muestra que el compuesto A, compuesto B, compuesto C, compuesto D, compuesto E, compuesto F y compuesto G, tanto en combinación(es) como solos, preferiblemente en combinación, se puede usar para tratar CMT o trastornos relacionados.

D-Sorbitol (compuesto A, de acuerdo con la invención)

Este fármaco, $C_6H_{14}O_6$, es un miembro de las clases irrigante de vejiga, laxante e hiperosmótica.

Ha sido aprobado para el tratamiento de i) Irrigación de la vejiga urinaria (adulto) para prevenir la infección durante una cirugía de próstata u otras cirugías del tracto urinario ii) Envenenamiento (adulto) cuando se mezcla con carbón activado y iii) Estreñimiento (adulto) al actuar como un laxante hiperosmótico: funciona al retener fluido en el colon, lo que ayuda a incrementar el movimiento muscular en los intestinos.

Vía metabólica dirigida en la enfermedad de CMT1A:

Las vías de cinasa (ERK) y Akt reguladas por señales extracelulares controlan la expresión del gen de PMP22 de manera opuesta: la transcripción del gen de PMP22 es incrementada por la vía de señalización de PI3K/pAkt/GSK-3 β activada y es suprimida por la cascada de Ras/MEK/ERK cinasa. El compuesto A es capaz de activar ERK/JNK/p38 cinasas y, probablemente, disminuye la expresión del gen de PMP22 al modular la actividad de ERK cinasa (Bogoyevitch et al., 1995; Galvez et al., 2003). Agregaciones de proteína PMP22 plegadas incorrectamente provocadas por la sobreexpresión del gen de PMP22 son la característica fenotípica integral de las células de Schwann en CMT1A y podrían afectar la dinámica de las membranas intracelulares, la distribución y la degradación de proteínas. Por lo tanto, D-sorbitol, como un osmolito celular que posee una actividad de chaperona, podría además suprimir el efecto perjudicial del gen de PMP22 sobreexpresado al aumentar la capacidad de la maquinaria

intracelular, implicada en el plegamiento y retirada de la proteína (Fortun et al., 2005; Fortun et al., 2006; Welch y Brown, 1996).

5 El compuesto A también podría ejercer un efecto incrementado mediante la estimulación del receptor de tipo 2 muscarínico al cual el compuesto A se une específicamente. Esto conduce a una disminución en la expresión de PMP22.

Finalmente, el compuesto A suprime la apoptosis y estrés oxidativo mediante la inhibición por retroalimentación de la vía de la aldosa reductasa. Se produce D-Sorbitol en la vía metabólica de la aldosa reductasa. La atenuación del gen de la aldosa reductasa suprime la apoptosis y el estrés oxidativo en células de rata (Nambu H. et al., 2008).

Baclofeno (compuesto B, de acuerdo con la invención)

10 Este fármaco, $C_{10}H_{12}ClNO_2$, ha sido aprobado para el alivio de signos y síntomas de espasticidad reversible que resultan de la esclerosis múltiple, particularmente para el alivio de espasmos flexores y dolor concomitante, clono, y rigidez muscular, y para el tratamiento intratecal de la espasticidad severa de origen en la médula espinal en pacientes que no responden a la terapia oral o no la pueden tolerar.

15 El compuesto B es un agonista directo en receptores de GABA-B. Su mecanismo de acción preciso no es completamente conocido. Es capaz de inhibir reflejos tanto monosinápticos como polisinápticos al nivel espinal, posiblemente por hiperpolarización de terminales aferentes, aunque también pueden aparecer acciones en sitios supraespinales y contribuir a su efecto clínico.

Vía metabólica dirigida en la enfermedad de CMT1A:

20 El receptor de GABA(B) se mostró que activa las ERK1/2 cinasas mediante la proteína de andamio que interactúa con GPCR (GISP) y por lo tanto puede regular negativamente la vía de señalización de PI3K-Akt-GSK-3 β y actividad de receptores de hormona esteroidea implicados en la regulación transcripcional positiva del gen de PMP22 en células de Schwann (Kantamneni et al., 2007; Lange et al., 2007; Miller et al., 2007; Tu et al., 2007). Además, los receptores de GABAB pueden - de una manera dependiente del contexto de desarrollo - disminuir la actividad de receptores de GABAA que también son reconocidos como moduladores positivos de expresión de PMP22 (Obrietan y van den Pol, 1998).

Pilocarpina (compuesto C)

Este fármaco, $C_{11}H_{16}N_2O_2$, ha sido aprobado para el tratamiento de i) síntomas de sequedad de la boca a partir de la hipofunción de glándulas salivales causada por radioterapia para cáncer de la cabeza y cuello; y ii) el tratamiento de síntomas de sequedad de la boca en pacientes con síndrome de Sjogren.

30 Siendo agonista de receptores muscarínicos, causa la contracción de las fibras de músculo liso (tracto digestivo, ojos, bronquios), estimula las secreciones sudoríparas, salivales, de los bronquios y gástricas. Además, presenta una acción cardiovascular compleja, estimulando ambas vías excitoganglionares parasimpaticomiméticas (vasodilatación).

Vía metabólica dirigida en la enfermedad de CMT1A:

35 Los inventores de la presente demostraron que la pilocarpina, un agonista de receptores muscarínicos, disminuye la expresión de la proteína PMP22 en células de Schwann *in vitro*. Los receptores muscarínicos son capaces de modular tanto la vía de Akt como de Erk en diferentes ambientes celulares y por lo tanto, podrían participar en el control del cambio fino entre estas dos vías de señalización, implicadas en regulación transcripcional positiva y negativa de la proteína PMP22 respectivamente. Los inventores de la presente proponen que la estimulación de los receptores muscarínicos por la pilocarpina conduce - probablemente, a través del establecimiento complejo de mecanismos moleculares - a un cambio en el equilibrio intracelular de las actividades de Erk/Akt a una señalización de Erk más pronunciada, lo que inhibe la expresión del gen de PMP22. Por ejemplo, los receptores muscarínicos pueden bloquear selectivamente la señalización por IGF-1 mediada por el módulo funcional de pAkt/GSK-3 β al promover la desfosforilación de tirosina IRS-1, que desacopla IRS-1 del receptor de IGF-1 estimulado (Batty et al., 40 2004; Stimweiss et al., 2006).

Naltrexona (compuesto D, de acuerdo con la invención)

Este fármaco, $C_{20}H_{23}NO_4$, ha sido aprobado para el tratamiento de la dependencia del alcohol y para el bloqueo de los efectos de opioides exógenamente administrados.

50 Este fármaco se une al receptor de opioide mu antagonísticamente, lo que evita que los fármacos opiáceos convencionales (heroína, morfina) se unan e induzcan respuestas neurales de opioides. Atenúa marcadamente o bloquea completamente, de manera reversible, los efectos subjetivos de opioides administrados por vía intravenosa. Cuando se coadministra con morfina, sobre una base crónica, bloquea la dependencia física a la morfina, heroína y otros opioides. En sujetos físicamente dependientes de opioides, precipitará la sintomatología de abstinencia.

El mecanismo de acción en el alcoholismo no se ha entendido; sin embargo, la implicación del sistema opioide endógeno es sugerido por datos preclínicos. Se une competitivamente a esos receptores y puede bloquear los efectos de opioides endógenos.

Vía metabólica dirigida en la enfermedad de CMT1A:

5 Las vías de cinasa (ERK) y Akt reguladas por la señalización extracelular controlan la expresión del gen de PMP22 de manera opuesta: la transcripción del gen de PMP22 es elevada por la vía de señalización de PI3K/pAkt/GSK-3 β activada y es suprimida por la cascada de Ras/MEK/ERK cinasa. El compuesto D, mediante la regulación negativa del receptor de opioide σ , podría bloquear la actividad de la pAkt cinasa y por lo tanto disminuir la transcripción del gen de PMP22.

10 Las células de Schwann expresan, aunque a niveles bajos, todos los tipos de receptores de opioides y sigma y sus ligandos naturales prodinorfina y proencefalina - una observación que indica que una señalización de opioides autocrinos podría jugar un papel importante en la biología de estas células gliales.

15 La señalización a través de receptores de opioide es extremadamente compleja y varía entre modos de aplicación de agonistas agudos y crónicos. Los inventores de la presente sugieren que la naltrexona podría atenuar la activación de la pAkt cinasa y la infraregulación de la señalización mediada por Erk cinasa, provocada - como se demostró para algunas células neuronales - por la aplicación de morfina aguda (Muller y Unterwald, 2004).

20 Las vías de cinasa (ERK) y Akt reguladas por señales extracelulares controlan la expresión del gen de PMP22 de manera opuesta: la transcripción del gen de PMP22 es elevada por la vía de señalización de PI3K/pAkt/GSK-3 β activada y es suprimida por la cascada de Ras/MEK/ERK cinasa. El compuesto D, mediante la regulación negativa del receptor de opioides σ , podría bloquear la actividad de la pAkt cinasa y aumentar la señalización mediante Erk cinasa, lo que disminuye la transcripción del gen de PMP22.

Metimazol (Compuesto E)

Este fármaco ha sido aprobado para el tratamiento del hipertiroidismo, bocio, enfermedad de Graves y psoriasis.

25 El metimazol se une y bloquea la actividad de la peroxidasa tiroidea, una enzima limitante de la velocidad en la síntesis de hormonas tiroideas que convierten el yoduro a yodo. Por lo tanto, el metimazol inhibe de manera efectiva la producción de nuevas hormonas tiroideas.

Vía metabólica dirigida en la enfermedad de CMT1A:

30 Aunque las células de Schwann no expresan receptores de la hormona tiroidea en el nervio ciático adulto intacto, la alteración de la interacción axonal-glia normal en nervios periféricos dañados rápidamente induce la expresión de estos receptores en células de Schwann, lo que indica la importancia de la señalización de la hormona tiroidea para la reparación inducible de daños del PNS (Walter, 1993). Esta propuesta es además apoyada por la observación de que los nervios ciáticos dañados expresan no sólo receptores tiroideos, sino también enzimas implicadas en el metabolismo de hormonas tiroideas - la desyodinasas de tipo 2, que convierte la tiroxina (T4) en triyodotironina (T3), y la desyodinasas de tipo 3 responsable de la degradación de las hormonas tiroideas (Walter et al., 1995; Li et al., 35 2001). Puesto que la sobreexpresión de gen de PMP22 en células de Schwann altera la interacción axonal-glia normal en nervios periféricos dañados de pacientes con CMT, la señalización del receptor tiroideo también podría jugar un papel importante en la progresión de enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

40 La triyodotironina T3 es un activador fuerte de la expresión de EGR2 en células de Schwann; puesto que el factor de transcripción EGR2 es reconocido como un regulador positivo importante del programa de transcripción de promielinización en células de Schwann, la señalización a través de receptores de hormonas tiroideas podría influir en la transcripción del gen de PMP22 (Mercier et al., 2001). Los inventores de la presente suponen que el metimazol podría disminuir la transcripción de gen de PMP22 al atenuar la señalización de la hormona tiroidea en células de Schwann dañadas.

Mifepristona (compuesto F)

45 Este fármaco, C₂₉H₃₅NO₂, ha sido aprobado para la terminación médica del embarazo intrauterino en embarazos de 49 días.

La actividad anti-progestacional del compuesto F resulta de la interacción competitiva con la progesterona en los sitios de receptor de progesterona. Con base en estudios con varias dosis orales en varias especies animales (ratón, rata, conejo y mono), el compuesto inhibe la actividad de la progesterona endógena o exógena.

50 Vía metabólica dirigida en la enfermedad de CMT1A:

El compuesto F es un antagonista de los receptores de progesterona y glucocorticoides, que son reguladores positivos de la transcripción de PMP22.

Aunque el compuesto F se desarrolló como un antagonista de receptor de progesterona, también se reconoce como antagonista del receptor de hormonas glucocorticoides; además, también despliega una actividad anti-andrógeno débil y no se une al receptor de estrógeno o a los receptores de mineralocorticoides.

5 La transcripción de la proteína PMP22 es positivamente regulada por varios receptores nucleares, que incluyen receptores de hormona esteroidea, expresados en células de Schwann (Robert et al., 2001; Schumacher et al., 2001).

10 Los inventores de la presente sugieren que la mifepristona, un antagonista no específico que reduce simultáneamente la actividad de receptores tanto de progesterona como de glucocorticoides, podría ser un modulador negativo más potente de la transcripción de PMP22 y por lo tanto, un candidato más prometedor para el desarrollo de fármacos relevantes de CMT1A que antagonistas específicos del receptor de progesterona previamente probados, que demostraron un efecto terapéutico más bien marginal, especialmente en el paradigma de tratamiento a largo plazo (Sereda et al., 2003; Meyer zu Horste et al., 2007); esta conclusión también es apoyada por datos recientemente publicados que indican que los receptores de glucocorticoide son expresados por lo menos 50 veces más fuerte en células de Schwann que los receptores de progesterona (Grayer et al., 2006).

15 Ketoprofeno (Compuesto G)

El Ketoprofeno ha sido aprobado para el tratamiento de la artritis reumatoide y la osteoartritis. El compuesto G es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo que bloquea la actividad tanto de ciclooxigenasa-1 (COX-1) como de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y debido a este efecto, inhibe la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos.

Vía metabólica dirigida en la enfermedad de CMT1A:

20 Previamente se ha demostrado que las células de Schwann expresan varios tipos de receptores de prostaglandina funcional EP, prostaciclina IP, tromboxona, cisteinil leucotrieno y leucotrieno B₄, poseen una actividad COX-2 inducible y son capaces de producir prostaglandina E₂, tromboxano A₂ y leucotrieno LTC₄ (Constable et al., 1999; Muja et al., 2001; Woodhams et al., 2007).

25 Las prostaglandinas - a través de sus receptores de GPCR cognados - podrían aumentar la actividad de la vía de señalización de Akt, que promueve la expresión de proteínas relacionadas con mielina que incluyen PMP22. Por ejemplo, los hallazgos recientes sugieren que la prostaglandina PGE₂ está estrechamente implicada en el metabolismo de la β -catenina, un efector cadena abajo de la señalización de pAkt y un activador del programa transcripcional de promielinización en células de Schwann (Ogata et al., 2004). Se demostró que con la activación de β receptores de EP por PGE₂, la subunidad α s se une a complejo Axin/GSK-3 β y reduce la fosforilación y degradación de β -catenina mediadas por GSK-3 β . Concomitantemente, la unión de PGE₂ a receptores de EP provoca la liberación de subunidades G $\beta\gamma$, que directamente estimulan la proteína Akt a través de fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3K) (Castellone et al., 2006).

30 Por lo tanto, el inhibidor de cox ketoprofeno (compuesto G) podría disminuir la transcripción del gen de PMP22 al suprimir la señalización autocrina a través de receptores de prostaglandina en células de Schwann, lo que potencia la actividad de la β -catenina.

35 Además, la invención describe el uso de los siguientes compuestos, ya sea en combinación(es) o solos, para tratar CMT o trastornos relacionados: Acetazolamida; Aminoglutetimida; Aztreonam; Baclofeno; Balsalazida; Bicalutamida; Bromocriptina; Bumetanida; Buspirona; Ciprofloxacino; Clonidina; Ciclosporina A; Disulfiram; Exemestano; Felbamato; Fenofibrato; Finasterida; Flumazenil; Flunitrazepam; Furosemida; Gabapentina; Galantamina; Haloperidol; Ibuprofeno; Isoproterenol; L-carnitina; Liotironina (T3); Losartano; Loxapina; Metaproterenol; Metaraminol; Metformina; Metimazol; Metilergonovina; Metopirona; Metoprolol; Mifepristona; Montelukast; Nadolol; Naltrexona; Naloxona; Norfloxacin; Pentazocina; Fenoxibenzamina; Fenilbutirato; Pilocarpina; Pioglitazona; Prazosina; Raloxifeno; Rifampina; Simvastatina; Espironolactona; Tamoxifeno; Trilostano; Ácido Valproico; Carbamazepina; Ketoprofeno; Flurbiprofeno; Diclofenaco; Meloxicam; D-Sorbitol; Tacrolimus; Diazepam; Dutasterida; Indometacina; Dinoprostona; Carbacol; Estradiol; Curcumina; Litio; Rapamicina; Betaína; Trehalosa; Amilorida; Albuterol.

40 Como se discutió anteriormente, la invención además muestra que vías de células particulares pueden ser moduladas para tratar de manera efectiva CMT o trastornos relacionados. De manera más específica, la invención muestra que la funcionalidad de PMP22 que incluye su expresión, plegamiento o transporte de proteína(s) de mielina periférica, puede ser modulada por fármacos que afectan al receptor muscarínico, receptor de GABA-B, receptor de hormonas esteroideas, receptor de opioides, vías de señalización de sorbitol, vía de señalización de la hormona tiroidea, o que activan ERK (cinasa regulada por señales extracelulares) o que inhiben pAkt cinasa y/o inhibidores de COX, lo que permite el diseño de nuevos enfoques terapéuticos de CMT y trastornos relacionados. Esas vías pueden ser moduladas ya sea independientemente, o en combinación, para proveer el mejor efecto terapéutico posible.

55 Generalmente, se han propuesto tipos de combinaciones de fármacos, que normalizan la expresión del gen de PMP22, para el tratamiento terapéutico de CMT o trastornos relacionados:

(I) - combinaciones de fármacos que afectan a la misma vía celular que implica el funcionamiento del gen de PMP22 y su proteína,

(II) - combinaciones de fármacos que modulan diferentes vías de señalización, que convergen en el funcionamiento del gen de PMP22 y su proteína,

5 (III) - combinaciones de fármacos que modulan diferentes vías de señalización, que controlan el funcionamiento del gen de PMP22 y su producto de proteína.

Estas combinaciones producen efectos aditivos o sinérgicos sobre la transcripción del gen de PMP22, y por lo tanto, deberían poder disminuir significativamente las dosis terapéuticas efectivas de fármacos seleccionados y reducir al mínimo sus efectos colaterales indeseables.

10 Combinaciones preferidas de fármacos de acuerdo con esta descripción se seleccionan entre:

- un antagonista de un receptor de hormonas esteroideas y un compuesto seleccionado de un agonista de receptor muscarínico, un agonista de receptor de GABA-B, un activador de ERK, un inhibidor de cinasa pAkt, un fármaco que inhibe la señalización de la hormona tiroidea, un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un antagonista de receptor de opioides, un inhibidor de COX;

15 - un agonista de receptor muscarínico y un compuesto seleccionado de agonista de receptor de GABA-B, un activador de ERK, un inhibidor de cinasa pAkt, un fármaco que inhibe la señalización de la hormona tiroidea, un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un antagonista de receptor de opioides; un inhibidor de COX;

20 - un agonista de receptor de GABA-B y un compuesto seleccionado de un activador de ERK, un inhibidor de cinasa pAkt, un fármaco que inhibe la señalización de la hormona tiroidea, un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un antagonista de receptor de opioides y un inhibidor de COX;

- un activador de ERK y un compuesto seleccionado de un inhibidor de cinasa pAkt, un fármaco que inhibe la señalización de la hormona tiroidea, un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un antagonista de receptor de opioides y un inhibidor de COX;

25 - un inhibidor de cinasa pAkt y un compuesto seleccionado de un fármaco que inhibe la señalización de la hormona tiroidea; un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un antagonista de receptor de opioides y un inhibidor de COX;

- un fármaco que inhibe la señalización de la hormona tiroidea y un compuesto seleccionado de un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol y un antagonista de receptor de opioides o un inhibidor de COX;

30 - un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol y un compuesto seleccionado de un antagonista de receptor de opioides o un inhibidor de COX;

- un antagonista de receptor de opioides y un inhibidor de COX.

Ejemplos preferidos de combinaciones de fármacos se seleccionan entre:

- un antagonista de receptor de hormona esteroidea y un agonista de receptor muscarínico;

35 - un antagonista de receptor de hormona esteroidea y un agonista de receptor de GABA-B;

- un antagonista de receptor de hormona esteroidea y un activador de ERK;

- un antagonista de receptor de hormona esteroidea y un inhibidor de cinasa pAkt;

- un antagonista de receptor de hormona esteroidea y un inhibidor de la señalización de hormona tiroidea;

- un antagonista de receptor de hormona esteroidea y un inhibidor de COX;

40 - un agonista de receptor muscarínico y un agonista de receptor de GABA-B;

- un agonista de receptor muscarínico y un activador de ERK;

- un agonista de receptor muscarínico y un inhibidor de cinasa pAkt;

- un agonista de receptor muscarínico y un inhibidor de la señalización de hormona tiroidea;

- un agonista de receptor muscarínico y un inhibidor de COX;

45 - un agonista de receptor de GABA-B y un activador de ERK;

- un agonista de receptor de GABA-B y un inhibidor de cinasa pAkt;
- un agonista de receptor de GABA-B y un inhibidor de la señalización de hormona tiroidea;
- un agonista de receptor de GABA-B y un inhibidor de COX; o
- un activador de ERK y un inhibidor de cinasa pAkt;

- 5 - un activador de ERK y un inhibidor de la señalización de hormona tiroidea;
- un activador de ERK y un inhibidor de COX; o
 - un inhibidor de la señalización de hormona tiroidea y un inhibidor de COX.

10 En una descripción particular, el antagonista de un receptor de hormona esteroidea es el compuesto F, el agonista de receptor muscarínico es el compuesto A o el compuesto C, el agonista de receptor de GABA-B es el compuesto B o el compuesto E, el inhibidor de cinasa pAkt es el compuesto D, el activador de ERK es el compuesto A.

15 Una descripción particular de la invención reside en una terapia de combinación para el tratamiento de CMT o un trastorno relacionado, en donde la terapia de combinación comprende el compuesto A y por lo menos un segundo compuesto seleccionado de un antagonista de receptor de hormona esteroidea, un agonista de receptor muscarínico, un agonista de receptor de GABA-B, un activador de ERK, un inhibidor de cinasa pAkt, un agonista de receptor de opioides, un inhibidor de COX y un inhibidor de la señalización de hormona tiroidea.

20 Una descripción particular de la invención describe en una terapia de combinación para el tratamiento de CMT o un trastorno relacionado, en donde la terapia de combinación comprende el compuesto B y por lo menos un segundo compuesto seleccionado de un antagonista de receptor de hormona esteroidea, un agonista de receptor muscarínico, un activador de ERK, un inhibidor de cinasa pAkt, un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un antagonista de receptor de opioides, un inhibidor de COX y un inhibidor de la señalización de hormona tiroidea.

25 Una descripción particular de la invención describe una terapia de combinación para el tratamiento de CMT o un trastorno relacionado, en donde la terapia de combinación comprende el compuesto C y por lo menos un segundo compuesto seleccionado de un antagonista de receptor de hormona esteroidea, un agonista de receptor de GABA-B, un activador de ERK, un inhibidor de cinasa pAkt, un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un antagonista de receptor de opioides, un inhibidor de COX y un inhibidor de la señalización de hormona tiroidea.

30 Una descripción particular de la invención describe una terapia de combinación para el tratamiento de CMT o un trastorno relacionado, en donde la terapia de combinación comprende el compuesto D y por lo menos un segundo compuesto seleccionado de un antagonista de un receptor de hormona esteroidea, un agonista de receptor muscarínico, un agonista de receptor de GABA-B, un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un activador de ERK, un inhibidor de COX y un inhibidor de la señalización de hormona tiroidea.

35 Una descripción particular de la invención describe una terapia de combinación para el tratamiento de CMT o un trastorno relacionado, en donde la terapia de combinación comprende el compuesto E y por lo menos un segundo compuesto seleccionado de un antagonista de receptor de hormona esteroidea, un agonista de receptor muscarínico, un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un activador de ERK, un inhibidor de cinasa pAkt, un antagonista de receptor de opioides, un inhibidor de COX y un inhibidor de la señalización de hormona tiroidea.

40 Una descripción particular de la invención describe una terapia de combinación para el tratamiento de CMT o un trastorno relacionado, en donde la terapia de combinación comprende el compuesto F y por lo menos un segundo compuesto seleccionado de un agonista de receptor muscarínico, un agonista de receptor de GABA-B, un activador de ERK, un inhibidor de cinasa pAkt, un fármaco que afecta a las vías de señalización de sorbitol, un antagonista de receptor de opioides, un inhibidor de COX y un inhibidor de la señalización de hormona tiroidea.

45 Los ejemplos específicos y descritos de combinaciones de fármacos comprenden como sustancias activas por lo menos: (I) compuesto F y compuesto E; (II) compuesto C y compuesto B; (III) compuesto F y compuesto C; compuesto F y compuesto B; compuesto F y compuesto A; compuesto F y compuesto D; compuesto C y compuesto A; compuesto C y compuesto D; compuesto B y compuesto A; compuesto B y compuesto D; compuesto A y compuesto D; compuesto G y compuesto D.

50 La terapia de conformidad con la invención se puede realizar como combinación de fármacos o solos y/o junto con cualquier otra terapia. Se puede proporcionar en el hogar, el consultorio del médico, una clínica, el departamento de pacientes externos de un hospital, o un hospital, de modo que el médico pueda observar los efectos de la terapia estrechamente y hacer cualesquiera ajustes que sean necesarios.

La duración de la terapia depende de la etapa de la enfermedad que es tratada, la edad y condición del paciente, y de cómo el paciente responde al tratamiento.

Además, una persona que tiene un mayor riesgo de desarrollar un trastorno neuropático adicional (por ejemplo, una persona que está genéticamente predispuesta o que tiene, por ejemplo, diabetes, o está bajo tratamiento para una condición oncológica, etc.) puede recibir tratamiento profiláctico para aliviar o retardar una posible respuesta neuropática.

- 5 La dosis, frecuencia y modo de administración de cada componente de la combinación puede ser controlada independientemente. Por ejemplo, un fármaco se puede administrar oralmente mientras que el segundo fármaco se puede administrar por vía intramuscular. La terapia de combinación se puede dar en ciclos activos e inactivos que incluyen períodos de reposo por lo que el cuerpo del paciente tiene una probabilidad de recuperarse de cualesquiera efectos colaterales imprevistos. Los fármacos también se pueden formular juntos de tal manera que una
10 administración suministra ambos fármacos.

Formulación de composiciones farmacéuticas

La administración de cada fármaco de la combinación puede ser por cualquier medio adecuado que de como resultado una concentración del fármaco que, combinado con el otro componente, es capaz de corregir el efecto de una expresión elevada de PMP22 al alcanzar los nervios periféricos.

- 15 Aunque es posible que los ingredientes activos de la combinación sean administrados como el compuesto químico puro es preferible presentarlos como una composición farmacéutica, también referida en este contexto como formulación farmacéutica. Las posibles composiciones incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, rectal, tópica (que incluye transdérmica, bucal y sublingual), o parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica).

- 20 De forma más habitual, estas formulaciones farmacéuticas se prescriben al paciente en "paquetes para el paciente" que contienen un número de unidades de dosis u otros medios para la administración de dosis de unidad medidas para usarse durante un período de tratamiento diferenciado en un solo paquete, habitualmente un paquete de ampollas. Los paquetes para el paciente tienen una ventaja sobre las prescripciones tradicionales, en donde un farmacéutico divide el suministro de un paciente de compuesto farmacéutico desde un suministro a granel, por lo
25 que el paciente siempre tiene acceso al inserto del paquete contenido en el paquete para el paciente, que normalmente falta en las prescripciones tradicionales. Se ha demostrado que a inclusión de un inserto en el paquete mejora el acatamiento del paciente con las instrucciones del médico. Por lo tanto, la invención además incluye una formulación farmacéutica, como se describió aquí anteriormente, en combinación con material de envaseo adecuado para las formulaciones. En un paquete para el paciente el uso destinado de una formulación para el tratamiento de
30 combinación puede ser inferida por instrucciones, funciones, prestaciones, adaptaciones y/u otros medios para ayudar el uso de la formulación de la forma más adecuada para el tratamiento. Esas medias hacen que un paquete de paciente sea específicamente adecuado y esté adaptado para usarse para el tratamiento con la combinación de la presente invención.

- 35 El fármaco puede estar contenido en cualquier cantidad apropiada en cualquier sustancia de vehículo adecuada, y puede estar presente en una cantidad de 1-99% en peso del peso total de la composición. La composición se puede proveer en una forma de dosis que es adecuada para la vía de administración oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhalante, por la piel (parche), u ocular. Por lo tanto, la composición puede estar en forma de, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, pildoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, disoluciones, geles que incluyen hidrogeles, pastas, ungüentos, cremas, yesos para
40 escayolar, administración forzada, dispositivos de suministro osmótico, supositorios, enemas, inyectables, implantes, aspersiones o aerosoles.

- 45 Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas de conformidad con la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20^a ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención pueden ser formuladas para liberar el fármaco activo sustancialmente en forma inmediata bajo administración o en cualquier momento predeterminado o período después de la administración.

- 50 Las formulaciones de liberación controlada incluyen (i) formulaciones que crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un período prolongado; (ii) formulaciones que después de un tiempo de demora predeterminado crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un período prolongado; (iii) formulaciones que sostienen la acción del fármaco durante un período predeterminado al mantener un nivel de fármaco efectivo relativamente constante en el cuerpo con minimización concomitante de los efectos colaterales indeseables asociados con fluctuaciones en el nivel en el plasma de la
55 sustancia de fármaco activa; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco, por ejemplo, mediante colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente al tejido u órgano enfermo, o en el interior de estos; y (v) formulaciones que dirigen la acción de fármaco al usar vehículos o derivados químicos para suministrar el fármaco a un tipo de célula diana particular.

La administración de fármacos en forma de una formulación de liberación controlada es especialmente preferida en casos en los cuales el fármaco, ya sea solo o en combinación, tiene (i) un estrecho índice terapéutico (es decir, la diferencia entre la concentración en el plasma que conduce a efectos colaterales nocivos o reacciones tóxicas y la concentración en el plasma que conduce a un efecto terapéutico es pequeña; en general, el índice terapéutico, TI, es definido como la relación de la mediana de la dosis letal (DL50) a la mediana de la dosis efectiva (DE50)); (ii) una ventana de absorción estrecha en el tracto gastrointestinal; o (iii) una semivida biológica muy corta por lo que se requiere una dosificación frecuente durante un día para mantener el nivel en el plasma a nivel terapéutico.

Puede utilizarse cualquiera de una serie de estrategias para obtener una liberación controlada en la cual la velocidad de liberación es mayor que la velocidad del metabolismo del fármaco en cuestión. La liberación controlada se puede obtener por la selección apropiada de varios parámetros de formulación e ingredientes, que incluyen, por ejemplo, diversos tipos de composiciones de liberación controlada y revestimientos. Por lo tanto, el fármaco se formula con excipientes apropiados en una composición farmacéutica que, al administrarse, libera el fármaco de una manera controlada (composiciones en comprimidos o cápsulas de unidades individuales o múltiples, disoluciones oleosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches y liposomas).

Formas de dosis sólidas para uso oral

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

Los comprimidos pueden ser no revestidos o pueden ser revestidos por técnicas conocidas, opcionalmente para retardar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y proveer así una acción sostenida durante un período más largo. El revestimiento puede ser adaptado para liberar la sustancia de fármaco activa en un patrón predeterminado (por ejemplo, para lograr una formulación de liberación controlada) o puede ser adaptado no para liberar la sustancia de fármaco activa hasta después de pasar el estómago (revestimiento entérico). El revestimiento puede ser un revestimiento de azúcar, un revestimiento de película (por ejemplo, con base en hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona), o un revestimiento entérico (por ejemplo, con base en copolímeros de ácido metacrílico, acetato-ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, poli(acetato-ftalato de vinilo), laca, y/o etilcelulosa). Un material de demora de tiempo tal como, por ejemplo, monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo se puede utilizar.

Las composiciones en comprimidos sólidos pueden incluir un revestimiento adaptado para proteger la composición de cambios químicos no deseados (por ejemplo, degradación química antes de la liberación de la sustancia de fármaco activa). El revestimiento se puede aplicar en la forma de dosis sólida de una manera similar a la descrita en Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

Los dos fármacos se pueden mezclar entre sí en el comprimido, o pueden dividirse. Por ejemplo, el primer fármaco está contenido en el interior del comprimido, y el segundo fármaco está en el exterior, de tal manera que una porción sustancial del segundo fármaco es liberada antes de la liberación del primer fármaco.

Las formulaciones para uso oral también pueden ser presentadas como comprimidos masticables, o como cápsulas de gelatina dura en donde el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, almidón de patata, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas de gelatina dura en donde el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, parafina líquida, o aceite de oliva. Se pueden preparar polvos y granulados mediante el uso de los ingredientes mencionados anteriormente en forma de comprimidos y cápsulas de una manera convencional.

Las composiciones de liberación controlada para uso oral, por ejemplo, pueden ser construidas para liberar el fármaco activo al controlar la disolución y/o la difusión de las sustancia de fármaco activas.

La liberación controlada por disolución o difusión se puede lograr mediante un revestimiento apropiado de un comprimido, cápsula, granza, o formulación granulada de fármacos, o al incorporar el fármaco en una matriz apropiada. Un revestimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de revestimiento mencionadas antes y/o, por ejemplo, laca, cera de abeja, glicocera, cera de ricino, cera de carnauba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido dl-poliláctico, acetato-butirato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acetato de vinilo),

vinilpirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metacrilato de metilo, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3-butilenglicol, metacrilato de etilenglicol y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de matriz también puede incluir, por ejemplo, metilcelulosa hidratada, cera de carnauba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, poli(cloruro de vinilo), polietileno y/o fluorocarbono halogenado.

Una composición de liberación controlada que contiene uno o más de los fármacos de las combinaciones reivindicadas también puede estar en forma de un comprimido flotante o cápsula (es decir, un comprimido o cápsula que, tras la administración oral, flota sobre la parte superior del contenido gástrico durante un cierto período). Una formulación de comprimido flotante del fármaco(s) se puede preparar al granular una mezcla del fármaco(s) con excipientes y 20-75% p/p de hidrocoloides, tal como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, o hidroxipropilmetilcelulosa. Los granulos obtenidos entonces pueden ser prensados en comprimidos. Al contacto con el jugo gástrico, el comprimido forma una barrera de gel sustancialmente impermeable al agua alrededor de su superficie. Esta barrera de gel toma parte en el mantenimiento de una densidad menor que uno, lo que permite que la tableta permanezca flotante en el jugo gástrico.

Líquidos para administración oral

Los polvos, los polvos dispersables o los granulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua son formas de dosis convenientes para la administración oral. La formulación como una suspensión provee el ingrediente activo en una mezcla con un agente de dispersión o humectación, agente de suspensión, y uno o más conservantes. Los agentes de suspensión adecuados son, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato de sodio y similares.

Composiciones parenterales

La composición farmacéutica también puede ser administrada parenteralmente por inyección, infusión o implantación (intravenosa, intramuscular, subcutánea, o similar) en formas de dosis, formulaciones o por dispositivos de suministro adecuados o implantes que contienen vehículos y adyuvantes farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. La formulación y preparación de las composiciones es bien conocida por los expertos en la técnica de formulación farmacéutica.

Las composiciones para uso parenteral se pueden proveer en formas de dosis unitarias (por ejemplo, en ampollas de una sola dosis), o en viales que contienen varias dosis y en los cuales se puede añadir un conservante adecuado (véase más adelante). La composición puede estar en forma de una disolución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión, o un dispositivo de suministro para la implantación o se puede presentar como un polvo seco para ser reconstituido con agua u otro vehículo adecuado antes de usarse. Aparte del fármaco(s) activo, la composición puede incluir vehículos y/o excipientes parenteralmente aceptables adecuados. El fármaco(s) activo se puede incorporar en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas, o similares para la liberación controlada. La composición puede incluir agentes de suspensión, solubilización, estabilización, agentes ajustadores del pH y/o agentes dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención pueden estar en la forma adecuada para una inyección estéril. Para preparar esa composición, los fármacos activos adecuados son disueltos o suspendidos en un vehículo líquido parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden utilizar están el agua, agua ajustada a un pH adecuado mediante la adición de una cantidad apropiada de ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o un regulador de pH adecuado, 1,3-butandiol, disolución de Ringer, y disolución de cloruro de sodio isotónica. La formulación acuosa también puede contener uno o más conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo, etilo o n-propilo). En casos en donde uno de los fármacos es sólo escasamente o ligeramente soluble en agua, se puede añadir una disolución que incrementa o solubiliza el agente, o el solvente puede incluir 10-60% p/p de propilenglicol o similares.

Las composiciones parenterales de liberación controlada pueden estar en forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, disoluciones oleosas, suspensiones oleosas o emulsiones. Alternativamente, los fármacos activos se pueden incorporar en vehículos biocompatibles, liposomas, nanopartículas, implantes o dispositivos de infusión. Los materiales para usarse en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, por ejemplo, polímeros biodegradables/bioerosionables tales como poligalactina, poli(cianoacrilato de isobutilo), poli(2-hidroxietil-L-glutamina). Los vehículos biocompatibles que se pueden usar cuando se formula una formulación parenteral de liberación controlada son carbohidratos (por ejemplo, dextranos), proteínas (por ejemplo, albúmina), lipoproteínas o anticuerpos. Los materiales para usarse en implantes pueden ser no biodegradables (por ejemplo, polidimetilsiloxano) o biodegradables (por ejemplo, poli(caprolactona), poli(ácido glicólico) o poli(orto-ésteres)).

Composiciones rectales

Para la aplicación rectal, las formas de dosis adecuadas para una composición incluyen supositorios (tipo emulsión o suspensión), y cápsulas de gelatina rectales (disoluciones o suspensiones). En una formulación de supositorio típica, los fármacos(s) activos se combinan con una base de supositorio farmacéuticamente aceptable apropiada tal como

manteca de cacao, ácidos grasos esterificados, gelatina glicerizada, y diversas bases solubles o dispersables en agua como polietilenglicoles. Se pueden incorporar varios aditivos, potenciadores o agentes tensioactivos.

Composiciones percutáneas y tópicas

5 Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar tópicamente sobre la piel para absorción percutánea en formas de dosis o formulaciones que contienen vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales que incluyen microesferas y liposomas. Las formulaciones incluyen cremas, unguentos, lociones, linimentos, geles, hidrogeles, disoluciones, suspensiones, barras, aspersiones, pastas, yesos para escayolar y otros tipos de sistemas de suministro de fármaco transdérmicos. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir agentes emulsionantes, antioxidantes, agentes reguladores de pH, conservantes, humectantes, incrementadores de penetración, agentes quelatantes, agentes formadores de gel, bases de unguentos, perfumes y agentes protectores de la piel.

Los agentes emulsionantes pueden ser gomas naturales (por ejemplo, goma arábica o goma de tragacanto).

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

15 Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para la administración tópica sobre la piel también se pueden usar en conexión con la administración tópica sobre o cerca de la parte del cuerpo que ha de ser tratada. Las composiciones pueden ser adaptadas para la aplicación directa o para la aplicación por medio de dispositivos de suministro de fármaco especiales tales como vendas o alternativamente yesos para escayolar, almohadillas, esponjas, cintas, u otras formas de material flexible adecuado.

20 Formulaciones de liberación lenta

Los compuestos se pueden usar en formulaciones de liberación lenta y/o se pueden formular con agentes que modifican la distribución o biodisponibilidad en el tejido. Muy particularmente, en una realización preferida, la combinación de por lo menos 2 compuestos se formula con un polímero de elución de fármaco o biomoléculas o micelas o lípidos formadores de liposomas o emulsiones de aceite en agua, o nanopartículas o micropartículas pegiladas o sólidas para la administración oral o parenteral o intratecal para modificar la distribución o biodisponibilidad en el tejido.

Los ejemplos específicos de esos agentes de formulación incluyen PGA, PLGA, ciclodextrinas, vehículos de albúmina o proteínas, nano- y micropartículas, liposomas, emulsiones y PEG.

Conjugados

30 En las terapias de combinación de esta invención, los compuestos pueden estar asociados en composiciones farmacéuticas en diferentes formas. Se pueden mezclar juntos como entidades separadas. Se pueden formular por separado. También pueden estar conectados, covalente o no covalentemente, con o sin un conector. En una realización particular, por lo menos dos compuestos están conectados, preferiblemente a través de un conector escindible o no escindible.

35 Dosis y duración del tratamiento

Se apreciará que los fármacos de la combinación se pueden administrar concomitantemente, ya sea en la misma o en diferente formulación farmacéutica, o secuencialmente. Si hay administración secuencial, la demora en administrar el segundo ingrediente activo (o adicional) no debe ser tal como para perder el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. Un requerimiento mínimo para una combinación de conformidad con esta descripción es que la combinación debe ser diseñada para un uso combinado con el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. El uso destinado de una combinación puede ser inferido por funciones, prestaciones, adaptaciones y/o otros medios para ayudar a usar la combinación de conformidad con la invención.

45 Las cantidades terapéuticamente efectivas de dos o más fármacos que son sujetos de esta invención se pueden usar juntas para la preparación de un medicamento útil para reducir el efecto de la expresión incrementada del gen de PMP22, al prevenir o reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad de CMT1A, al detener o desacelerar la progresión de la enfermedad de CMT1A una vez que se ha vuelto clínicamente manifiesta, y al prevenir o reducir el riesgo de una primera o posterior aparición de un acontecimiento neuropático.

50 Aunque los fármacos activos de la presente invención se pueden administrar en dosis divididas, por ejemplo dos o tres veces diarias, una sola dosis diaria de cada fármaco en la combinación es preferida, siendo lo más preferido una sola dosis diaria de todos los fármacos en una sola composición farmacéutica (forma de dosis unitaria).

La administración puede ser una a varias veces diarias durante varios días a varios años, e incluso puede ser para toda la vida del paciente. La administración a largo plazo crónica o por lo menos periódicamente repetida será indicada en la mayoría de los casos.

El término "forma de dosis unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas (tales como cápsulas, comprimidos o cilindros de jeringa cargados) adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material o materiales activos calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

- 5 La cantidad de cada fármaco en la combinación preferida para una dosis unitaria dependerá de varios factores que incluyen el método de administración, el peso corporal y la edad del paciente, la gravedad del daño neuropático causado por la enfermedad de CMT1A o el riesgo de efectos colaterales potenciales si se considera el estado de salud general de la persona que ha de ser tratada.

- 10 Además, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo sobre el perfil farmacocinético, farmacodinámico o eficacia de un agente terapéutico) acerca de un paciente particular puede afectar a la dosis usada.

- 15 Excepto cuando responde a casos de enfermedad de CMT espacialmente problemáticos, cuando dosis más altas pueden ser requeridas, o cuando se tratan niños y se deben escoger dosis más bajas, la dosis preferida de cada fármaco en la combinación habitualmente estará dentro del intervalo de dosis no por arriba del habitualmente prescrito para un tratamiento de mantenimiento a largo plazo o que se ha probado como seguro en grandes estudios clínicos de fase 3.

Por ejemplo:

- para el compuesto F, de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 mg por día si se toma oralmente. Deben elegirse dosis especiales si se administra tópicamente.
- para el compuesto D, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg por día si se toma oralmente.
- 20 - para el compuesto B, de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 mg por día si se toma oralmente. Pueden ser adecuadas diferentes dosis si se administran en forma de nanopartículas o formulaciones similares.
- para el compuesto E, de aproximadamente 125 a aproximadamente 500 mg por día si se toma oralmente.
- para el compuesto C, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg por día si se toma oralmente.
- 25 - para el compuesto A, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 g por día si se toma oralmente. Deben elegirse dosis especiales si se inyecta.

La dosis más preferida corresponderá a cantidades de 1% hasta 10% de aquellas habitualmente prescritas para un tratamiento de mantenimiento a largo plazo.

- 30 Se entenderá que la cantidad del fármaco realmente administrada será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias pertinentes que incluyen la afección o afecciones que han de ser tratadas, la composición exacta que ha de ser administrada, la edad, peso y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y la vía escogida de administración. Por lo tanto, los intervalos de dosis anteriores están diseñados para proveer una guía general y para apoyar las enseñanzas en la presente, pero no pretenden limitar el alcance de la invención.

- 35 Los siguientes ejemplos se dan para propósitos de ilustración. Entre los compuestos sometidos a ensayo, D-sorbitol, Baclofeno y Naltrexona son compuestos de acuerdo con la invención. Los ejemplos en relación con otros compuestos son ejemplos de referencia.

Ejemplos

1. Cultivo de tejido

1.1: Células de Schwann primarias de rata comercialmente disponibles

- 40 Viales de cultivo primario de células de Schwann (SC) de rata (Sciencell n° R1700) son descongelados y sembrados a la densidad de 10.000 células/cm² en "medio de células de Schwann Sciencell" (medio basal de Sciencell n° R1701) en matraces de 75 cm² prerrevestidos con poli-L-lisina. El medio de cultivo está compuesto de medio basal, 5% de suero de bovino fetal (3H-Biomedical AB n° 1701-0025), 1% de complemento de crecimiento de células de Schwann (3H Biomedical AB n° 1701-1752), 1% de Gentamicin (Sigma n° G1397) y 10 µM de Forskolina (Sigma n° F6886) para promover su proliferación.

- 45 Después de alcanzar la confluencia (4 a 10 días según el lote de células), las células de Schwann son purificadas por agitación suave o por separación por marcaje inmunológico thy1.1 que permite el aislamiento de SC de los fibroblastos adherentes, para producir cultivos que son por lo menos 95% puros. Las SC después se cuentan (método de azul de tripano) y se siembran en un matraz de 75 cm² prerrevestido con poli-L-lisina en el mismo medio de SC. En la confluencia, las células son enjuagadas, tripsinizadas (tripsina-EDTA 1x diluida de Invitrogen n° 1540054), diluidas en PBS sin calcio y magnesio), se cuentan y se colocan en placas de 12 pocillos (140.000 células/pocillo) en medio de células de Schwann Sciencell con 5% de FBS, 1% de complemento de crecimiento de
- 50

células (CGS), 40 µg/ml de gentamicina y 4 µM de Forskolina.

1.2 Células de Schwann primarias de rata personalizadas

Se establecen cultivos de células de Schwann primarias (SC) a partir de nervios ciáticos de ratas recién nacidas Sprague-Dawley (entre P0 y P2). Todas las ratas recién nacidas son sacrificadas y aisladas en una placa de Petri.

5 La disección se realiza bajo condiciones estériles.

La piel dorsal es retirada de la pata trasera y el torso inferior. El nervio ciático es aislado y transferido a una placa de cultivo que contiene medio de Leibovitz (L15, Invitrogen n° 11415) enfriado con hielo complementado con disolución al 1% de penicilina/estreptomicina (50 UI/ml y 50 µg/ml, respectivamente; Invitrogen n° 15070) y 1% de albúmina de suero de bovino (BSA, Sigma A6003). Ambos nervios por rata son transferidos en un tubo de 15 ml que contiene L15 enfriado con hielo. El medio L15 es entonces retirado y reemplazado por 2,4 ml de DMEM (Invitrogen n° 21969035) con 10 mg/ml de colagenasa (Sigma n° A6003). Los nervios son incubados en este medio durante 30 minutos a 37°C. El medio es entonces retirado y ambos nervios son disociados con tripsina (10% de tripsina EDTA 10x, Invitrogen n° 15400054) diluida en PBS sin calcio y magnesio (Invitrogen n° 2007-03) durante 20 min a 37°C. La reacción es detenida mediante la adición de DMEM que contiene ADNasa I de calidad II (0,1 mg/ml Roche diagnóstico n° 104159) y suero de ternera fetal (FCS al 10%, Invitrogen n° 10270). La suspensión de células se trituró con una pipeta de 10 ml y se hizo pasar a través de un filtro a un tubo de 50 ml (unidades de filtro Swinnex 13 mm, Millipore, con filtros de nailon de 20 µm, Fisher). La suspensión de células es centrifugada a 350 g durante 10 min a temperatura ambiente (TA) y los sedimentos son suspendidos en DMEM con 10% de FCS y 1% de penicilina/estreptomicina. Las células se cuentan (método de azul de tripano) y se siembran en placas de cultivo de tejido primarias Falcon de 100 mm a la densidad de 5×10^5 a 10^6 células/placa.

10

15

20

Después de un día de cultivo, el medio es cambiado por DMEM, 10% de FCS, 1% de penicilina/estreptomicina y 10 µM de citosina b-D-arabinofuranósido (Sigma n° C1768). Cuarenta y ocho horas más tarde, el medio se elimina y las células se lavan tres veces con DMEM. El medio de crecimiento de SC se añade después, compuesto de DMEM, 10% de FCS, 1% de penicilina/estreptomicina, 2 µM de Forskolina (Sigma n° F6886), 10 µg/ml de extracto de pituitaria de bovino (PEX, Invitrogen n° 13028). El medio es reemplazado cada 2-3 días.

25

Después de 8 días de cultivo (4 a 10 días dependiendo de los lotes de células), las células de Schwann alcanzan la confluencia y el cultivo, que contiene una gran cantidad de fibroblastos contaminantes, es purificado por el método de separación por marcaje inmunológico thy1.1. Después de esta purificación, las células se suspenden en medio de crecimiento a 10.000 células/cm² en matraces de 75 cm² prerrevestidos con poli-L-lisina. Una vez que alcanzan la confluencia, las células son enjuagadas, tripsinizadas (tripsina-EDTA), contadas y colocadas en placas de 12 pocillos (100.000 células/pocillo).

30

1.3: Incubación del fármaco

Después de que las células se colocan en placas de 12 pocillos, el medio es reemplazado por un medio definido que consiste en una mezcla de DMEM-F12 (Invitrogen n° 21331020) complementado por 1% de complemento de N2 (Invitrogen n° 17502), 1% de L-Glutamina (Invitrogen n° 25030024), 2,5% de FBS (Sciencell n° 0025), 0,02 µg/ml de corticosterona (Sigma n° C2505), 4 µM de Forskolina y 50 µg/ml de gentamicina. No se añaden factores de crecimiento a este medio, para promover diferenciación de SC.

35

Veinticuatro horas más tarde, el medio es reemplazado por un medio definido (DMEM-F12) complementado con 1% de insulina-transferrina-selenio-X (ITS, Invitrogen n° 51300), 16 µg/ml de Putrescine (Sigma n° P5780), 0,02 µg/ml de corticosterona y 50 µg/ml de gentamicina. En este paso, ni la progesterona ni la forskolina están presentes en el medio.

40

Un día más tarde, las células de Schwann son estimuladas por combinaciones de fármacos o fármacos solos durante 24 horas (3 pocillos/condición). La preparación de cada compuesto se realiza inmediatamente antes de su adición al medio de cultivo de células.

45

Los fármacos se añaden a un medio definido compuesto de DMEM-F12, con 1% de insulina-transferrina-selenio-X (ITS, Invitrogen n° 51300), 16 µg/ml de Putrescine, 0,02 µg/ml de corticosterona, 10 nM de Progesterona y 50 µg/ml de gentamicina. La ausencia de Forskolina durante estimulación con fármaco evita la saturación de la adenilato ciclasa.

2. Purificación de células de Schwann por separación por marcaje inmunológico Thy1.1.

50 Para evitar la contaminación del cultivo de fibroblastos, las células de Schwann son purificadas mediante el uso del protocolo de separación por marcaje inmunológico de clon Thy1.1 (ATCC TIB-103™).

Se prepararon placas de Petri de bacterias de 100 mm prerrevestidas con anticuerpo como sigue: estas placas se lavan tres veces con PBS y se tratan mediante 20 ml de disolución de Tris HCl 50 mM, pH 9,5, con 10 µg/ml de anticuerpo Anti-IgM MU de ratón de cabra (Jackson ImmunoResearch n° 115-005-020) durante la noche a 4°C; después se enjuaga 3 veces con PBS y se trata mediante una disolución de PBS con 0,02% de BSA y el

55

sobrenadante obtenido del cultivo de hibridoma T11D7e2 (ATCC nº TIB-103) que contiene el anticuerpo IgM Thy1.1 durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavan tres veces con PBS antes de que se añadan las suspensiones de células.

- 5 Las SC son desprendidas con tripsina-EDTA. Tan pronto como la mayoría de las células están en suspensión, la tripsina es neutralizada con DMEM-10% de FBS y las células son centrifugadas. El sedimento de células disociadas es resuspendido en 15 ml de medio con 0,02% de BSA a la densidad de $0,66 \times 10^6$ células por ml (máximo) y es transferido a una placa de Petri (aproximadamente 6,6 millones de células/10 ml/placa de 100 mm).

- 10 La suspensión de células se incuba en la placa de Petri revestida con Thy1.1 durante 45 min a 37°C con agitación suave cada 15 minutos para prevenir la unión no específica. La mayoría de las células de fibroblastos que expresan Thy1.1 se adhieren en la placa. Al final de la incubación, la suspensión de células es recuperada y centrifugada. Esta suspensión de células contiene en teoría sólo células de Schwann. Las células son centrifugadas y el sedimento de células es suspendido en medio de crecimiento con 10 µM de Forskolina a 16.000 células/cm² en un matraz de 75 cm² tratado con poli-L-lisina.

3 - Reacción en cadena de polimerasa de transcriptasa inversa cuantitativa (Q-RT-PCR)

- 15 Se usa una RT-PCR cuantitativa para comparar los niveles de ARNm de PMP22 después de una estimulación con fármaco, en relación con ARNm L13A ribosomal constitutivo en un cultivo primario de células de Schwann de rata.

- 20 Después de enjuagar con PBS esterilizado frío, se extrae el ARN total de cada muestra de células y se purifica de las SC mediante el uso del microkit Qiagen RNeasy (Qiagen nº 74004). Los ácidos nucleicos son cuantificados por un espectrofotómetro de Nanodrop con el uso de 1 µl de muestra de ARN. La integridad ARN se determina a través de un aparato BioAnalyzer (Agilent).

Los ARN son transcritos inversamente a ADNc de conformidad con el protocolo estándar. Se sintetizan moldes de ADNc para la amplificación por PCR a partir de 200 ng de ARN total mediante el uso de transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen nº 18064-014) durante 60 minutos a 42°C en presencia de oligo (dT), en un volumen final de 20 µl.

- 25 Los ADNc son sometidos a una amplificación por PCR con el uso del sistema «LightCycler® 480» (Roche Molecular Systems Inc.) Cada ADNc es diluido cinco veces antes de usarse para la amplificación por PCR. En la disolución de reacción de PCR (volumen final de 10 µl) se introducen 2,5 µl de estos ADNc. Experimentos preliminares aseguraron que la cuantificación se hizo en la fase exponencial del proceso de amplificación para ambas secuencias y que la expresión del gen de referencia fue uniforme en las diferentes condiciones de cultivo.

- 30 La reacción de PCR se realiza por amplificación de 500 nM de cebador hacia adelante de PMP22 de rata (NM_017037), 5-GGAAACGCGAATGAGGC-3, y 500 nM de cebador de reversa 5-GTTCTGTTTGGTTTGGCTT-3 (amplificación de 148 pb). Un fragmento de 152 pb del ARN ribosomal RPL13A (NM_173340) es amplificado en paralelo en reacciones separadas para la normalización de los resultados al usar un 500 nM de cebador directo 5-CTGCCCTCAAGGTTGTG-3, y un 500 nM de cebador inverso 5-CTTCTTCTCCGGTAATGGAT-3.

- 35 Los inventores de la presente usaron química de FRET para realizar un análisis de RT-Q-PCR. Las sondas de FRET están compuestas de 0,3 µM de Pmp22-FL-5-GCTCTGAGCGTGCATAGGGTAC o Rp113A-FL-5-TCGGGTGGAAGTACCAGCC, marcadas en su extremo 3' con un colorante de fluoróforo donante (Fluoresceína). Se definen 0,15 µM de sondas Red640 sigue: Pmp22-rojo-5'-AGGGAGGGAGGAAGGAAACCAGAAA- o Rp113A-rojo-5'-TGACAGCTACTCTGGAGGAGAAACGGAA, marcadas en su extremo 5' con un colorante de fluoróforo de aceptor (rojo de rodamina 640).

Cada reacción de PCR contenía 2,5 µl de molde de ADNc en un volumen final de 10 µl de kit de mezcla maestra (Roche nº 04-887301001).

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

4 - Análisis de expresión de proteína PMP22 por citometría de flujo (FACS)

Ocho horas, 24 horas y 48 horas después de la incubación del fármaco, los sobrenadantes se recuperan, se centrifugan y se congelan. Las SC se desprenden con tripsina-EDTA. Tan pronto como la mayoría de las células están en suspensión, la tripsina es neutralizada al usar DMEM con 10% de FCS.

- 50 Los sobrenadantes con células son recuperados y centrifugados. Los sedimentos de células son transferidos a microtubos, lavados en PBS una vez y fijados con una disolución específica (AbCys nº Reactivo A BUF09B). Diez minutos más tarde, las células se enjuagan una vez con PBS y se mantienen a 4°C.

Cinco días después de la fijación de las células, todas las preparaciones de células con diferentes tiempos

deincubación son marcadas mediante el uso del siguiente protocolo.

5 Las células se centrifugan a 7000 rpm durante 5 minutos y los sedimentos son suspendidos en una disolución de permeabilización (AbCys nº Reactivo B BUF09B) y marcados con anticuerpo PMP22 primario (Abeam nº ab61220, 1/50) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células después son centrifugadas a 7000 rpm durante 5 minutos y los sedimentos de células son enjuagados una vez en PBS. Se añade un anticuerpo secundario, acoplado a Alexa Fluor 488 (IgG anti-conejo de cabra, sondas moleculares nº A11008, 1/100), durante una hora a temperatura ambiente. Las células después son centrifugadas a 7000 rpm durante 5 minutos y los sedimentos de células son enjuagados una vez en PBS. El marcaje es incrementado al añadir un anticuerpo terciario acoplado a Alexa Fluor 488 (IgG anticabra de pollo, sondas moleculares nº A21467, 1/100) con incubación durante una hora, a temperatura ambiente. Las células después se enjuagan una vez en PBS. El control sin ningún anticuerpo (células no marcadas) se realiza para determinar el nivel de auto-fluorescencia y se adaptó la sensibilidad de los fotomultiplicadores. El control tanto con anticuerpos secundarios como terciarios pero sin anticuerpo primario, se realiza para evaluar la unión no específica de anticuerpos.

15 La adquisición de datos y el análisis se realizan con un citómetro FACS Array y software FACS Array (Becton Dickinson) sobre 5000 células. Se analiza la dispersión directa (FSC) que se correlaciona con el volumen celular (tamaño), y la dispersión lateral (SSC) que depende de la complejidad interna de células (granulosidad). Para la expresión de PMP22, el análisis se realiza con las células totales y se calcula el porcentaje de células positivas. Las células positivas son células con una intensidad de fluorescencia mayor que el control con anticuerpo secundario.

20 A fin de cuantificar el número de SC, las células en el medio de control son analizadas mediante el uso de anticuerpos anti-proteína S100.

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

25 5. Incubación y actividad del fármaco

Los fármacos se incuban durante 24 horas o 48 horas en el mismo medio definido que se describió antes (3 pocillos/condición) en ausencia de Forskolina para evitar la saturación de estimulación de adenilato ciclasa, pero en presencia de 10 nM de progesterona. Después de la incubación del fármaco, los sobrenadantes son recuperados y las células de Schwann son congeladas para análisis de RT-Q-PCR.

30 Los inventores de la presente determinaron la actividad del fármaco hacia la expresión de PMP22 cuando reduce significativamente los niveles de PMP22 en comparación con el control. La tabla 1 siguiente resume los resultados para 20 fármacos activos que causan disminución de expresión de PMP22.

Tabla 1

Compuesto	ARNm	Proteína
Baclofeno	+	
Metimazol	+	+
Mifepristona	+	
Naltrexona	+	
Pilocarpina	+	+
Sorbitol	+	
Disulfiram	+	
Fenofibrato	+	
Haloperidol	+	
Indometacina	+	
Montelukast	+	
Simvastatina	+	

Trilostano	+	
Estradiol-b	+	
Isoproterenol	+	
Diclofenaco	+	+
Flurbiprofeno	+	+
Indometacina	+	+
Ketoprofeno	+	+
Meloxicam	+	+

Los datos para 18 fármacos que dan como resultado una disminución significativa de expresión de ARNm de PMP22 después de 24 horas de incubación se ilustra en las figuras 1-3. Estos datos muestran una reducción sustancial en los niveles de ARNm de PMP22, incluso a dosis muy bajas.

5 6. Nivel de proteína PMP22 después de 24 horas de incubación:

Los inventores de la presente probaron la capacidad de algunos fármacos para inhibir la expresión de proteína PMP22 (análisis de FACS). La figura 4 describe los resultados para 6 fármacos y muestra que son capaces de disminuir significativamente la expresión de proteína PMP22, 24 horas después de su adición al medio de cultivo. Los resultados de la acción de algunos fármacos individuales sobre el nivel de proteína de PMP22 también se muestran en la tabla 1 anterior.

10

En la figura 5, se muestra el efecto de una combinación de Pilocarpina y Naltrexona sobre la expresión de proteína PMP22 después de 24 horas de incubación. Los niveles de expresión de proteína se compararon con controles no tratados. Se demuestra que estas diferencias son estadísticamente significativas.

15

La tabla 2 siguiente resume los resultados obtenidos con diversas combinaciones de fármacos, a diversas concentraciones, sobre la expresión de proteína PMP22. Estos resultados fueron estadísticamente significativos y demostraron la ventaja y efecto benéfico de las combinaciones de fármacos propuestas.

Tablal 2

Combinación	% de PMP22 FACS	% d.e.	Variación	valor de p
Sorbitol 1 mM + Metimazol 1 µM	75	8	-25%	p<0,001
Sorbitol 100 µM + metimazol 10 µM	74	7	-26%	p<0,001
Sorbitol 100 µM + metimazol 1 µM	74	7	-26%	p<0,001
Pilocarpina 10 nM + Naltrexona 1 µM	63	6	-37%	p<0,0001
Pilocarpina 10 nM + Naltrexona 100 nM	68	5	-32%	p<0,0001
Sorbitol 1 mM + Naltrexona 1 µM	67	10	-33%	p<0,0001
Sorbitol 1 mM + Naltrexona 100 nM	70	10	-30%	p<0,0001
Sorbitol 100 µM + Naltrexona 1 µM	70	12	-30%	p<0,001
Sorbitol 100 µM + Naltrexona 100 nM	62	14	-38%	p<0,0001

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

20 Los inventores de la presente probaron los compuestos para determinar su efecto terapéutico en un modelo de rata transgénica de CMT - una rata transgénica de PMP22 hemicigótica que tenía tres copias adicionales del gen de PMP22 de ratón (Sereda et al., 1996; Grandis et al., 2004). Este modelo de rata con CMT es una buena

5 aproximación a la enfermedad humana de CMT1A desde un punto de vista clínico. Las ratas con CMT adultas presentan una desaceleración de la velocidad de conducción nervios motores con valores similares a los de pacientes con CMT1A, es decir, menos de 50%. Después de ña estimulación del nervio ciático, los potenciales de acción del músculo compuestos muestran amplitudes y desincronización reducidas. Los cambios histológicos y electrofisiológicos preceden los signos clínicos evidentes de alteración motora (Sereda et al., 1996, 2003). La pérdida axonal, confirmada por atrofia muscular pronunciada histológica, se corresponde con los síntomas de CMT1A humanos.

10 Se han usado ratas transgénicas de cuatro semanas de edad PMP22 a lo largo del estudio. Se ha verificado aspectos del diseño de estudio (aleatorización, estadísticas para comparaciones múltiples, tamaño de muestra, etc.) para que estén en línea con las recomendaciones provistas en la 4ª emisión del 43º volumen de ILAR Journal (2002), que provee revisiones en el campo de diseño experimental y estadísticas en investigación biomédica.

15 Los grupos experimentales se forman con ratas jóvenes de ambos géneros por separado. Las ratas son asignadas a los grupos siguiendo un programa de aleatorización con base en el peso corporal. En algunos experimentos, la aleatorización se basa en los rendimientos de las ratas en la prueba de barra. Ambos géneros son representados por grupos de control separados que son numéricamente iguales o más grandes que los grupos de tratamiento.

20 Las ratas son tratadas crónicamente con fármacos - alimentación forzada o inyectadas mediante una bomba subcutánea osmótica Alzet (DURECT Corporación Cupertino, CA), de acuerdo con cada biodisponibilidad durante 10-20 semanas. Los animales se pesan dos veces a la semana para ajustar las dosis al peso corporal en crecimiento. Si se escoge la bomba osmótica para la administración del tratamiento, la dosis del fármaco se calcula con base en el peso corporal promedio estimado esperado de los animales para su edad durante el período de duración de la bomba (6 semanas) . Las bombas son reimplantadas si es necesario, con el protocolo de anestesia apropiado.

Pruebas de comportamiento

25 Cada tres o cuatro semanas, los animales son sometidos a una prueba de comportamiento. Cada prueba es conducida por el mismo investigador en el mismo cuarto y a la misma hora del día; esta homogeneidad se mantiene a lo largo de todo el experimento. Todos los tratamientos son ciegos para el investigador. La "prueba de barra" y la "fuerza de sujeción" se han usado principalmente para acceder al rendimiento a lo largo del estudio. El programa de la prueba de barra puede cambiar a medida que crece el animal (para evitar la desviación debida, por ejemplo, al aprendizaje). La prueba de la fuerza de sujeción permite la detección de diferencias sutiles en el rendimiento de sujeción que parece estar compuesto de la fuerza muscular, estado de sensibilidad (por ejemplo, las sensaciones táctiles al dolor pueden cambiar los valores medidos de la fuerza), componente conductual ("motivación"). Los valores difieren entre las patas delanteras y traseras y dependen en gran medida de la edad de los animales.

30 La prueba de fuerza de sujeción mide la fuerza con la cual un animal se sostiene en un elemento de sujeción con sus patas delanteras o sus patas traseras por separado. Un dinamómetro se coloca con un elemento de sujeción para medir la fuerza (Forcé Gauge FG-5000A). La rata es sostenida por el experimentador de una manera que sujeta el elemento de sujeción ya sea con sus patas delanteras o con sus patas traseras y tira suavemente a la rata hacia atrás hasta que libera el elemento de sujeción. La fuerza medida cuando el animal libera el elemento de sujeción se registra.

35 Dos ensayos sucesivos que miden las patas delanteras y dos ensayos sucesivos que miden la fuerza de las patas traseras por animal son procesados; sólo la puntuación máxima (una para las patas delanteras y una para las patas traseras) se anota (en N).

40 La prueba de la barra evalúa la capacidad de las ratas para sostenerse sobre una barra fija. Ratas Pmp22 que despliegan debilidad muscular presentan un déficit de rendimiento en esta prueba (Sereda et al., 1996). La rata se coloca sobre sus cuatro patas a la mitad de la barra (diámetro: 2,5 cm; longitud: 50 cm; 30 cm por encima de la mesa). Los ensayos se realizan consecutivamente; el número y la duración de los ensayos en los presentes experimentos han dependido de los lotes de animales. Esta variabilidad en la prueba ha sido introducida a fin de determinar el programa apropiado a la mejor detección de la deficiencia motora en las ratas CMT en el curso de los experimentos.

Los índices de rendimiento se registran en cada sesión:

45 - El número de ensayos necesarios para sostenerse durante 60 segundos (o 30 segundos para el lote 1, sesión 1 y 2) en la barra.

50 - El tiempo de sostenimiento en la barra (es decir, la latencia de caída) en cada ensayo y el promedio en la sesión. En los procedimientos experimentales en donde la sesión termina después de que la rata ha permanecido durante un tiempo de cese, es decir, 30 ó 60 seg, en la barra, se asigna un rendimiento del tiempo de cese (30 seg o 60 seg) a los ensayos no completados (por ejemplo, para el lote 8, para un animal que permanece en la barra menos de 10 seg en los ensayos 1, 2 y 3, después durante 60 seg en los ensayos 4 y 5, se asignan 60 seg a los ensayos 6 a 10).

- El número de caídas.

Evaluación de la salud general

5 Los pesos corporales, signos manifiestos (aspecto del pelo, postura el cuerpo, modo de andar, temblores, etc.) de los animales, son controlados a lo largo del experimento. Se usa la siguiente escala de calificación para el registro: 0 = normal, 1 = anormal.

Pruebas adicionales

Cuando es apropiado, las ratas son sometidas a una evaluación electrofisiológica y medición histológica.

Resultados

10 El Metimazol mejoró los rendimientos de la prueba de barra a lo largo del procedimiento de tratamiento (figura 6), mientras que el compuesto PXT25, que se presenta aquí sólo para fines de comparación, apenas mostró alguna mejora.

De manera similar, la Pilocarpina mejoró los rendimientos de la prueba de barra a lo largo del procedimiento de tratamiento (figura 6).

15 Los rendimientos motores fueron en promedio 3 veces menos exitosos en diferentes ratas con CMT tratadas con placebo en comparación con el grupo de tipo silvestre (WT). El tratamiento con metimazol o pilocarpina permitió la mejora de los animales en esta prueba, y se volvió estadísticamente significativo tan pronto como después de 8 semanas de la alimentación forzada. Este efecto es muy demostrativo a las 16 semanas de tratamiento (figura 7). Los animales tuvieron significativamente mejor rendimiento en comparación con el grupo de placebo y recuperaron un nivel de rendimiento que no difiere de manera más significativa de aquel del grupo de placebo WT.

20 La amplitud del potencial medida en la porción distal de la cola se encontró que fue significativamente disminuida en el grupo de placebo TG, lo cual puede reflejar una pérdida axonal importante que a su vez se debe a la desmielinización. Este parámetro electrofisiológico resulta ser significativamente mejorado tras un tratamiento con metimazol (figura 8), mientras que la velocidad de conducción nerviosa (NCV) no fue significativamente afectada.

25 Esta observación permite a los inventores de la presente suponer que la acción de metimazol puede prevenir la pérdida de axones, aun cuando el estado de mielinización de los nervios periféricos no es mensurablemente mejorado. El efecto de la pilocarpina parece ser fundamentalmente el mismo, aun cuando debido a la variabilidad intra-grupo la diferencia con el parámetro del grupo placebo no alcanzó la significancia estadística. En CMT1A, la amplitud del potencial de acción del nervio sensorial (SNAP) fue más reducida y la duración de SNAP más prolongada que en CMT2. La reducción del potencial de acción del músculo compuesto (CMAP) y las amplitudes de SNAP en CMT1A es probablemente un efecto combinado de la desmielinización y la disfunción axonal.

30 Al final del estudio se ha realizado un análisis morfométrico. La medición de los tejidos de la para trasera revela que los nervios ciáticos y los músculos soleos son significativamente reducidos en las ratas hembras con CMT tratadas con placebo en comparación con las ratas WT de control. Estas deficiencias parecen ser completamente corregidas por el tratamiento con metimazol: las masas absolutas de los músculos y los nervios son incluso más altos que en las ratas WT de control, mientras que el peso corporal entero es más bien disminuido en el grupo de metimazol comparativamente con el grupo de placebo (no se muestran los datos).

40 Estos datos muestran que, *in vivo*, los compuestos de esta invención permiten el tratamiento efectivo de CMT. Además, cabe notar que las primeras dosis que se mostró que eran activas para cada fármaco son una cuarta parte (metimazol) y la mitad (pilocarpina) de la dosis equivalente a la dosis usada en humanos para las indicaciones canónicas.

8. Esquema terapéutico, dosis y vías de administración

A continuación, se describen las dosis para dos combinaciones (que difieren en las vías de administración) en humanos.

(1) Compuesto F y compuesto D

45 1- Administrado oralmente como una composición farmacéutica individual: compuesto D de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg y compuesto F de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 50 mg cada día oralmente durante varios meses, y las dosis más preferidas para ambos fármacos en la composición varían de 0,1 a 5 mg por unidad (por día).

50 2 - Administrado en forma concomitante oralmente durante varios meses: compuesto F de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 mg una vez a la semana (la dosis más preferida es de hasta 50 mg a la semana), compuesto D de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg diariamente (la dosis más preferida para este fármaco es de 0,1 a 5 mg por día).

3 - Administrado en forma concomitante durante varios meses: compuesto D de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg cada día oralmente (la dosis más preferida para este fármaco es de 0,1 a 5 mg por día), y compuesto F como un parche para la piel que libera el fármaco preferiblemente a un régimen de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2 mg por día.

5 (2) Compuesto A y compuesto F

1- Administrado en forma crónica, oralmente, dos veces o tres veces al día, como una composición farmacéutica individual en forma de cápsulas o gotas que deben ser disueltas en la bebida (preferiblemente, en leche): la dosis diaria total preferida de compuesto F es de 0,1 a aproximadamente 5 mg y compuesto A de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 g.

10 2 - Administrado en forma concomitante durante varios meses: compuesto F una vez a la semana de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 mg una vez a la semana (la dosis más preferida es de hasta 50 mg a la semana), y compuesto A dos veces al día en una bebida, la dosis diaria total de compuesto A es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 g.

15 3 - Administrado en forma secuencial y concomitante durante tratamientos a largo plazo: primero como un bolo individual de compuesto F (aproximadamente 200 a 600 mg) oralmente, después en combinación concomitantemente: compuesto F como un parche para la piel que libera el fármaco** (muy preferiblemente a un régimen de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2 mg por día) y compuesto A dos veces al día durante 7 días en agua para berber, después sin compuesto A durante 14 días, después compuesto A durante 7 días dos veces al día en agua para beber (la dosis diaria total preferida de compuesto A es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 g) etc., por intermitencia.

*la dosis de este fármaco en cualquier combinación entre aquellas descritas en la presente invención puede diferir significativamente en las formulaciones propuestas para el tratamiento de hombres o mujeres.

** el mismo esquema terapéutico que el compuesto F y el compuesto A (3) pero en vez del parche para la piel se puede usar administración rectal/vaginal de dosis baja de compuesto F.

25 **Bibliografía**

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

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

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

35 Basta-Kaim A, Budziszewska B, Jaworska-Feil L, Tetich M, Leśkiewicz M, Kubera M, Lasoń W. Chlorpromazine inhibits the glucocorticoid receptor-mediated gene transcription in a calcium-dependent manner. *Neuropharmacology.* 2002; 43(6):1035-1043.

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

40 Bogoyevitch MA, Ketterman AJ, Sugden PH. Cellular stresses differentially activate c-Jun N-terminal protein kinases and extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem.* 1995; 270(50):29710-29717.

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

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

45 Chen XR, Besson VC, Palmier B, Garcia Y, Plotkine M, Marchand-Leroux C. Neurological recovery-promoting, anti-inflammatory, and anti-oxidative effects afforded by fenofibrate, a PPAR alpha agonist, in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007; 24 (7): 1119-1131.

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

Constable AL, Armati PJ. DMSO induction of the leukotriene LTC₄ by Lewis rat Schwann cells. *J Neurol Sci* 1999;

- 162 (2): 120-126.
- Devaux JJ, Scherer SS. Altered ion channels in an animal model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *J Neurosci*. 2005; 25(6): 1470-1480.
- 5 Diep QN, Benkirane K, Amiri F, Cohn JS, Endemann D, Schiffrin EL. PPAR alpha activator fenofibrate inhibits myocardial inflammation and fibrosis in angiotensin II-infused rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2004; 36 (2): 295-304.
- Dracheva S, Davis KL, Chin B, Woo DA, Schmeidler J, Haroutunian V. Myelin-associated mRNA and protein expression deficits in the anterior cingulate cortex and hippocampus in elderly schizophrenia patients. *Neurobiol Dis*. 2006 Mar;21(3):531-540.
- 10 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.
- Fortun J, Dunn WA Jr, Joy S, Li J, Notterpek L. Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. *J Neurosci*. 2003; 23(33): 10672-10680.
- Fortun J, Li J, Go J, Fenstermaker A, Fletcher BS, Notterpek L. Impaired proteasome activity and accumulation of ubiquitinated substrates in a hereditary neuropathy model. *J Neurochem* 2005; 92:1531-1541.
- 15 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.
- 20 Galvez AS, Ulloa JA, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros LF, Lavandero S. Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis: differential effects of sorbitol and mannitol. *J Biol Chem*. 2003; 278(40):38484-38494.
- Groyer G, Eychenne B, Girard C, Rajkowski K, Schumacher M, Cadepond F. Expression and functional state of the corticosteroid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in Schwann cells. *Endocrinology*. 2006; 147 (9):4339-4350.
- 25 Kantamneni S, Correa SA, Hodgkinson GK, Meyer G, Vinh NN, Henley JM, Nishimune A. GISP: a novel brain-specific protein that promotes surface expression and function of GABA(B) receptors. *J Neurochem*. 2007; 100 (4):1003-17.
- Khajavi M, Shiga K, Wiszniewski W, He F, Shaw CA, Yan J, Wensel TG, Snipes GJ, Lupski JR. Oral curcumin mitigates the clinical and neuropathologic phenotype of the Trembler-J mouse: a potential therapy for inherited neuropathy. *Am J Hum Genet*. 2007; 81(3): 438-453.
- Kobsar I, Hasenpusch-Theil K, Wessig C, Müller HW, Martini R. Evidence for Macrophage-Mediated Myelin Disruption in an Animal Model for Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 1A. *J. Neurosci Res* 2005; 81:857-864.
- 35 Lange CA, Shen T et al. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *PNAS USA*. 2000; 97: 1032-1037.
- Le-Niculescu H, Kurian SM, Yehyaw N, Dike C, Patel SD, Edenberg HJ, Tsuang MT, Salomon DR, Nurnberger JI Jr, Niculescu AB. Identifying blood biomarkers for mood disorders using convergent functional genomics. *Mol Psychiatry*. 2008 Feb 26. [publicado en línea antes de imprimirse].
- 40 Li WW, Le Goascogne C, Ramaugé M, Schumacher M, Pierre M, Courtin F. Induction of type 3 iodothyronine deiodinase by nerve injury in the rat peripheral nervous system. *Endocrinology*. 2001; 142 (12):5190-5197.
- Lupski JR, Wise CA, Kuwano A, Pentao L, Parke JT, Glaze DG, Ledbetter DH, Greenberg F, Patel PI. Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet*. 1992; 1(1): 29-33.
- 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.
- 45 Melcangi RC, Cavarretta IT, Ballabio M, Leonelli E, Schenone A, Azcoitia I, Miguel García-Segura L, Magnaghi V. Peripheral nerves: a target for the action of neuroactive steroids. *Brain Res Rev*. 2005; 48(2): 328-338.
- Mercier G, Turque N, Schumacher M. Rapid effects of triiodothyronine on immediate-early gene expression in Schwann cells. *Glia*. 2001; 35(2):81-89.
- Meyer Zu Horste G. , Nave K-A. Animal models of inherited neuropathies. *Curr. Opin. Neurol*. 2006; 19(5): 464-473.

- Meyer zu Horste G, Prukop T, Liebetanz D, Mobius W, Nave KA, Sereda MW. Antiprogestosterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Ann Neurol*. 2007; 61 (1): 61-72.
- Miller AL, Garza AS, Johnson BH, Thompson EB. Pathway interactions between MAPKs, mTOR, PKA, and the glucocorticoid receptor in lymphoid cells. *Cancer Cell Int*. 2007; 28:7:3
- 5 Muja N, Blackman SC, Le Breton GC, DeVries GH. Identification and functional characterization of thromboxane A2 receptors in Schwann cells. *J Neurochem*. 2001; 78(3):446-456.
- Muller DL, Unterwald EM. In Vivo Regulation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase (ERK) and Protein Kinase B (Akt) Phosphorylation by Acute and Chronic Morphine. *JPET* 2004; 310:774-782.
- 10 Nambu H, Kubo E, Takamura Y, Tsuzuki S, Tamura M, Akagi Y. Attenuation of aldose reductase gene suppresses high-glucose-induced apoptosis and oxidative stress in rat lens epithelial cells. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008; 82(1): 18-24.
- Nave KA, Sereda MW, Ehrenreich H. Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies—from basic to clinical research. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007; 3(8): 453-464.
- 15 Niemann S., Sereda M.W., Rossner M., Stewart H., Suter U. , Meinck H.M., Griffiths I.R., Nave K-A. The "CMT rat": peripheral neuropathy and dysmyelination caused by transgenic overexpression of PMP22. *Ann. N.- Y. Acad. Sci*. 1999; 883:254-261.
- Notterpek L, Shooter EM, Snipes GJ. Upregulation of the endosomal-lysosomal pathway in the trembler-J neuropathy. *J Neurosci*. 1997;17 (11):4190-4200.
- 20 Obrietan K, van den Pol AN. GABAB receptor-mediated inhibition of GABAA receptor calcium elevations in developing hypothalamic neurons. *J Neurophysiol*. 1998; 79 (3):1360-1370.
- Ogata T, Iijima S, Hoshikawa S, Miura T, Yamamoto S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Opposing extracellular signal-regulated kinase and Akt pathways control Schwann cell myelination. *J Neurosci*. 2004; 24 (30):6724-6732.
- Ohsawa Y, Murakami T, Miyazaki Y, Shirabe T, Sunada Y. Peripheral myelin protein 22 is expressed in human central nervous system. *J Neurol Sci*. 2006; 247 (1):11-15.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 Roux KJ, Amici SA, Notterpek L. The temporospatial expression of peripheral myelin protein 22 at the developing blood-nerve and blood-brain barriers. *J Comp Neurol*. 2004; 474 (4):578-588.
- Sancho S, Young P, Suter U. Regulation of Schwann cell proliferation and apoptosis in PMP22-deficient mice and mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 2001; 124(Pt 11): 2177-2187.
- Schumacher M, Guennoun R, Mercier G, Désarnaud F, Lacor P, Bénavides J, Ferzaz B, Robert F, Baulieu EE. Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. *Brain Res Rev*. 2001; 37(1-3): 343-359.
- 45 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.
- Stirnweiss J, Valkova C, Ziesché E, Drube S, Liebmann C. Muscarinic M2 receptors mediate transactivation of EGF

- receptor through Fyn kinase and without matrix metalloproteases. *Cell Signal*. 2006; 18 (8):1338-1349.
- Suter U, Scherer SS. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat. Rev. Neurosci*. 2003; 4: 714-726.
- Suter U, Welcher AA, Ozcelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U, Billings-Gagliardi S, Sidman RL, Shooter EM. Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature*. 1992; 356(6366): 241-244.
- 5 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.
- 10 Tu H, Rondard P, Xu C, Bertaso F, Cao F, Zhang X, Pin JP, Liu J. Dominant role of GABAB2 and Gbetagamma for GABAB receptor-mediated-ERK1/2/CREB pathway in cerebellar neurons. *Cell Signal*. 2007; 19 (9):1996-2002.
- Uht RM, Anderson CM, Webb P, Kushner PJ. Transcriptional activities of estrogen and glucocorticoid receptors are functionally integrated at the AP-1 response element. *Endocrinology*. 1997 Jul;138(7):2900 -2908.
- Ulzheimer JC, Peles E, Levinson SR, Martini R. Altered expression of ion channel isoforms at the node of Ranvier in P0-deficient myelin mutants. *Mol Cell Neurosci*. 2004; 25(1): 83-94.
- 15 Vallat JM, Sindou P, Preux PM, Tabaraud F, Milor AM, Couratier P, LeGuern E, Brice A. Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *AnnNeurol*. 1996; 39(6): 813-817.
- Walter IB. Nuclear triiodothyronine receptor expression is regulated by axon-Schwann cell contact. *Neuroreport*. 1993; 5(2): 137-140.
- 20 Walter IB, Deruaz JP, de Tribolet N. Differential expression of triiodothyronine receptors in schwannoma and neurofibroma: role of Schwann cell-axon interaction. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1995; 90 (2):142-149.
- Welch WJ, Brown CR. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones*. 1996; 1(2):109-115.
- 25 Woodhams PL, MacDonald RE, Collins SD, Chessell IP, Day NC. Localisation and modulation of prostanoid receptors EP1 and EP4 in the rat chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pain*. 2007; 11(6):605-613.

Lista de secuencias

<110> Pharnext

5 <120> Nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de la CMT y trastornos relacionados

<130> B660EPpcl

<140> EP12196650.1

10 <141> 2010 05 18

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador delantero_rata PMP22

<400> 1

25 ggaaacgcga atgaggc 17

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador reverso_rata PMP22

35 <400> 2

gttctgttg gtttgctt 19

<210> 3

<211> 17

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador delantero_RPL13A

45 <400> 3

ctgccctcaa ggttggtg 17

<210> 4

50 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Cebador reverso_RPL13A

<400> 4

cttcttcttc cggtaatgga t 21

60 <210> 5

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 703 508 T3

<220>
<223> sonda FRET_Pmp22_ marcada con fluoresceína

5 <400> 5
gctctgagcg tgcattaggt ac 22

<210> 6
<211> 19
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda FRET_Rp113A_ marcada con fluoresceína

15 <400> 6
tcgggtggaa gtaccagcc 19

<210> 7
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda FRET_Pmp22_ marcada con rodamina

25 <400> 7
agggaggag gaaggaaacc agaaa 25

<210> 8
30 <211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda FRET_Rp113A_ marcada con rodamina

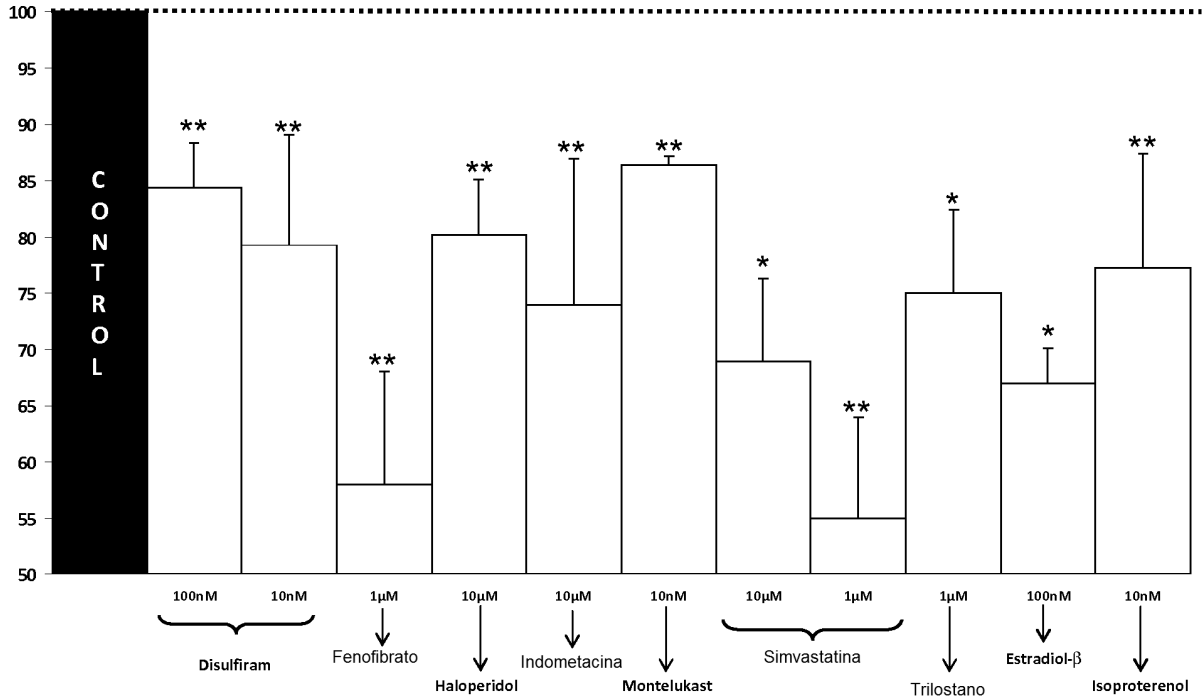
35 <400> 8
tgacagctac tctggaggag aaacggaa 28

40

REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición farmacéutica que comprende D-Sorbitol o Baclofeno, o una sal de los mismos, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, o un trastorno relacionado seleccionado entre el síndrome de Dejerine-Sottas (DSS) y neuropatía hipomielinizante congénita (CHN).
- 5 2.- La composición para el uso según la reivindicación 1, que comprende D-Sorbitol o Baclofeno, o una sal de los mismos, como el único agente activo.
- 3.- La composición para el uso según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la composición se formula para su administración oral.
- 10 4.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición comprende formas de dosis unitarias de D-Sorbitol o Baclofeno, o una sal de los mismos.
- 5.- La composición para el uso según las reivindicaciones 1 a 3, que comprende de 1 a 50 g de D-Sorbitol, o una sal del mismo, para una administración diaria oral y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 6.- La composición para el uso según las reivindicaciones 1 a 3, que comprende de 2 a 20 mg de Baclofeno, o una sal del mismo, para una administración diaria oral y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 7.- La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el uso en el tratamiento de CMT1A.
- 8.- Una composición farmacéutica que comprende naltrexona, o una sal de la misma, para el uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con una expresión anormal de PMP22 seleccionada entre CMT1A, el síndrome de Dejerine-Sottas (DSS) y la neuropatía hipomielinizante congénita (CHN).
- 20 9.- La composición para el uso según la reivindicación 8, que comprende de 1 a 20 mg de naltrexona, o una sal de la misma, para una administración diaria oral y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10.- La composición para el uso según las reivindicaciones 8 o 9, que comprende naltrexona, o una sal de la misma, como el único agente activo.

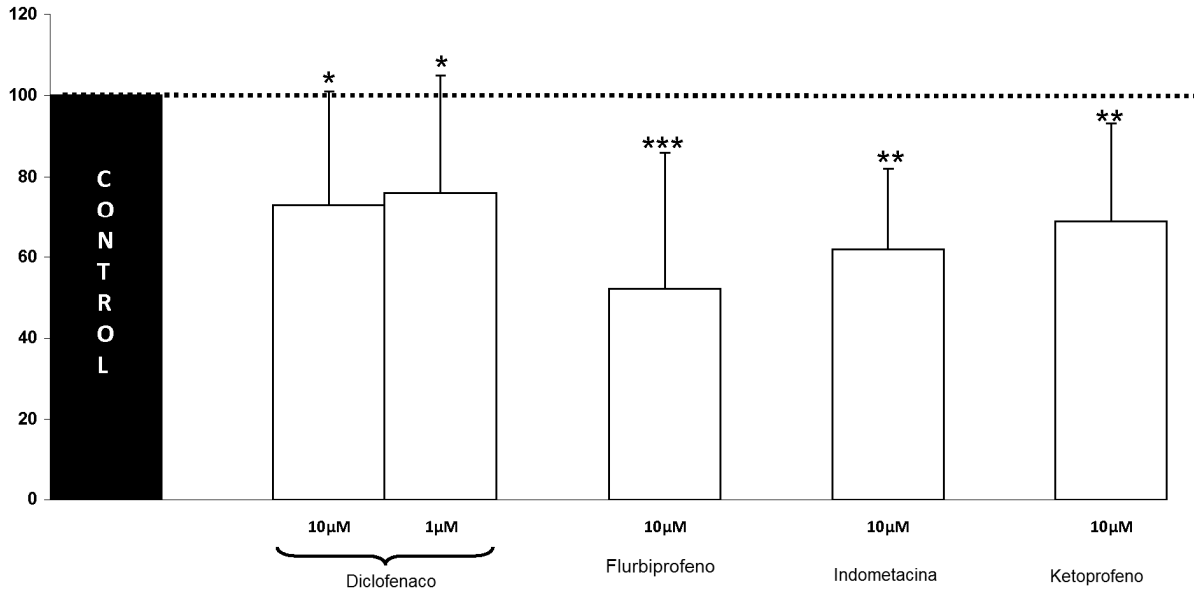
% de nivel de ARNm de PMP22



*:p<0.01; **:p<0.001=prueba t de Student significativamente diferente del control (sin fármaco)

Fig 1

% de nivel de ARNm de PMP22



*:p<0.01; **:p<0.001=prueba t de Student significativamente diferente del control (sin fármaco)

Fig 2

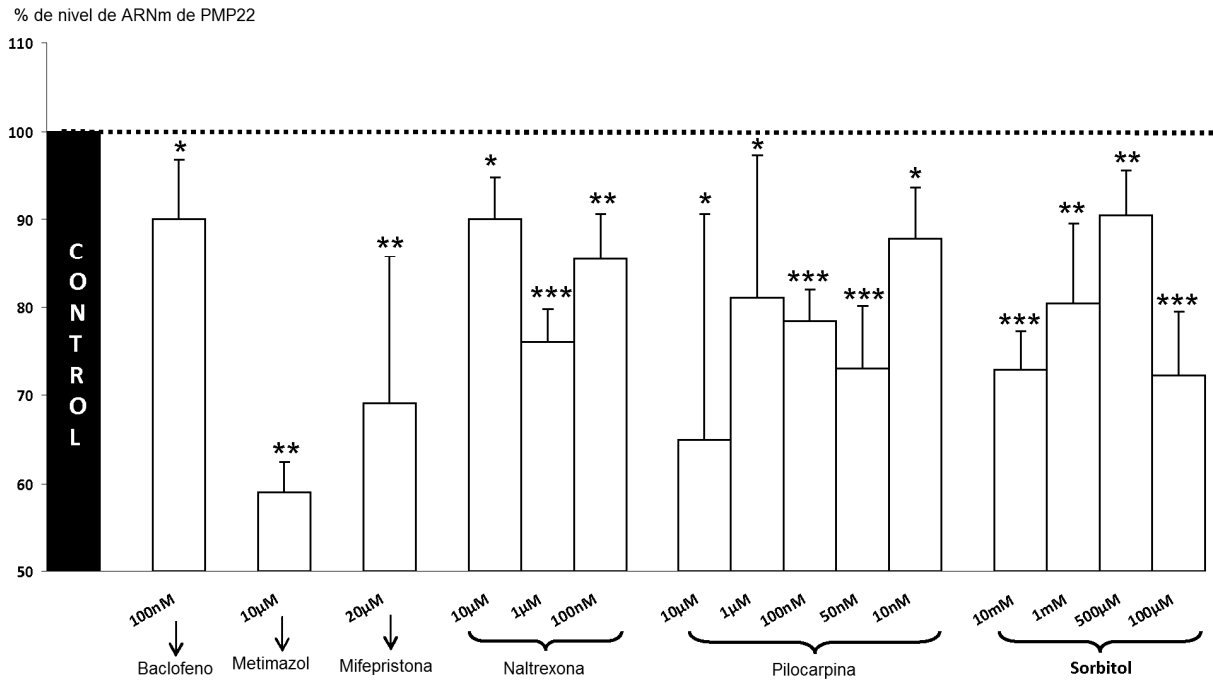
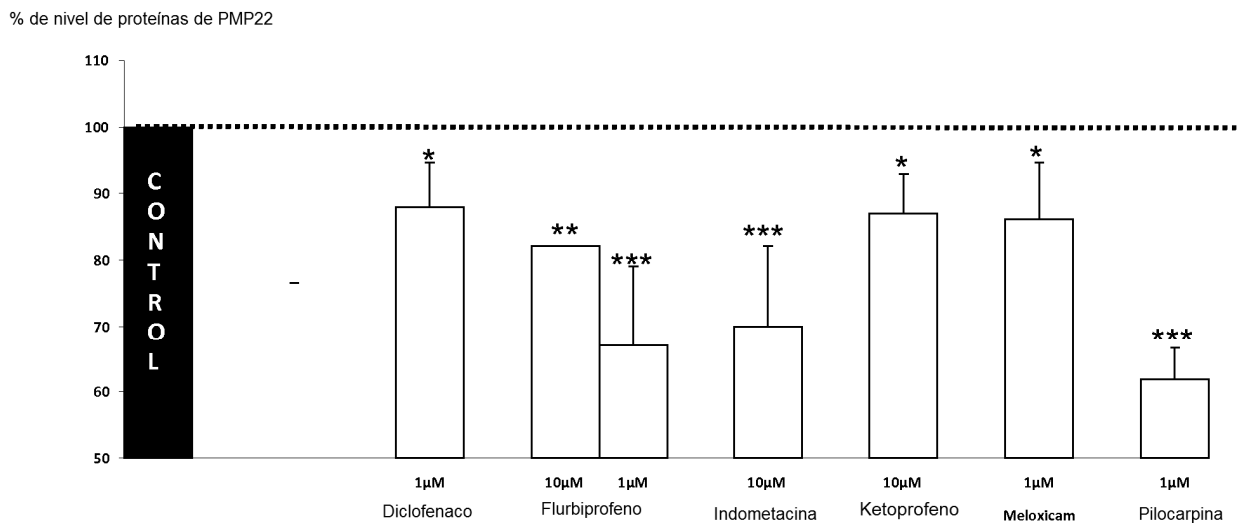
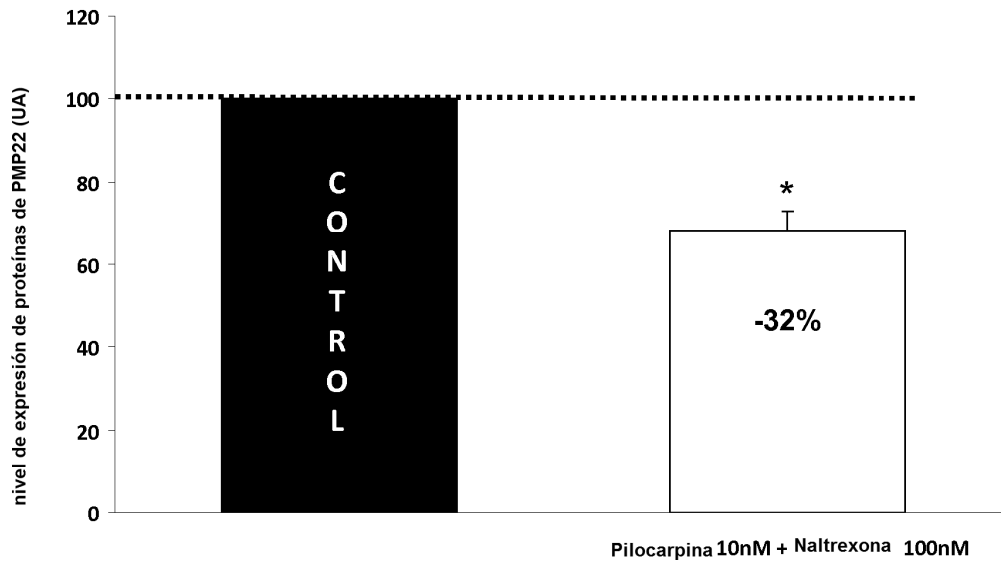


Fig 3



*:p<0.01; **:p<0.001; ***:p<0.0001: prueba t de Student significativamente diferente del control (sin fármaco)

Fig. 4



*:p<0.01;prueba t de Student significativamente diferente el control (sin fármaco)

Fig.5

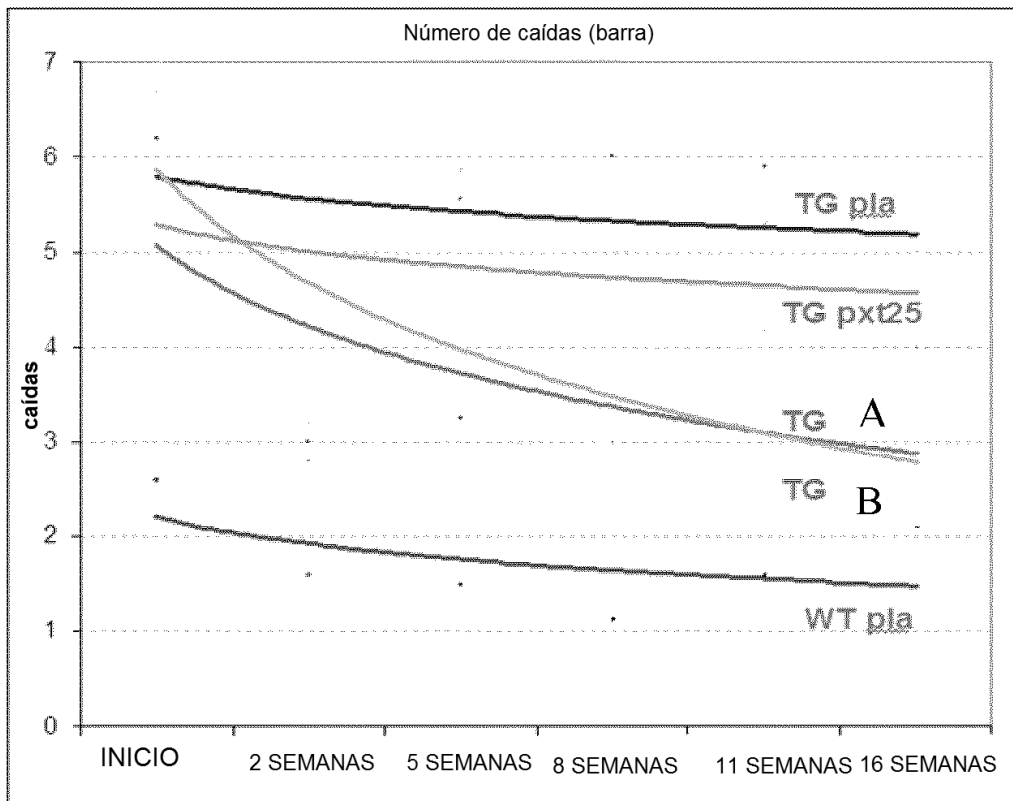


Fig. 6

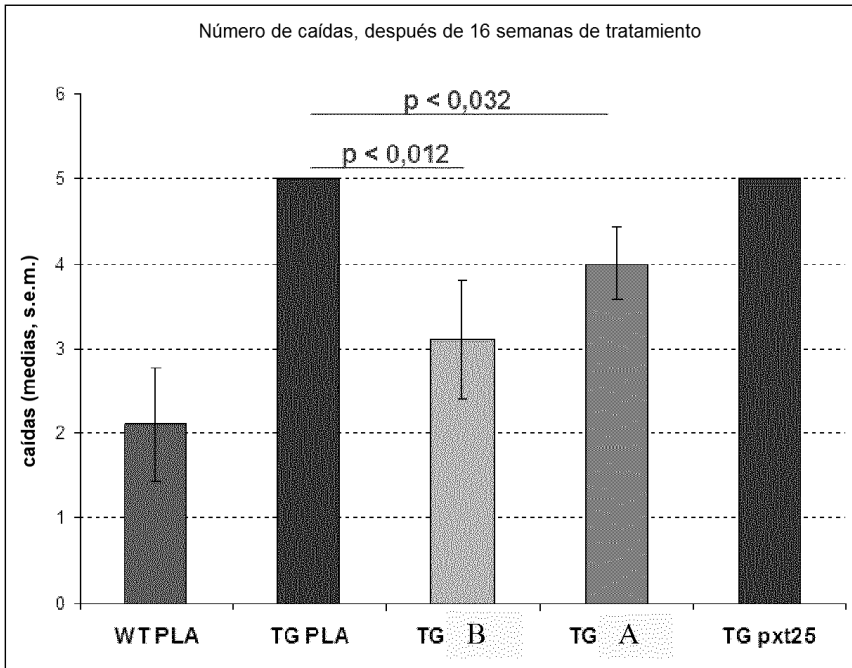


Fig. 7

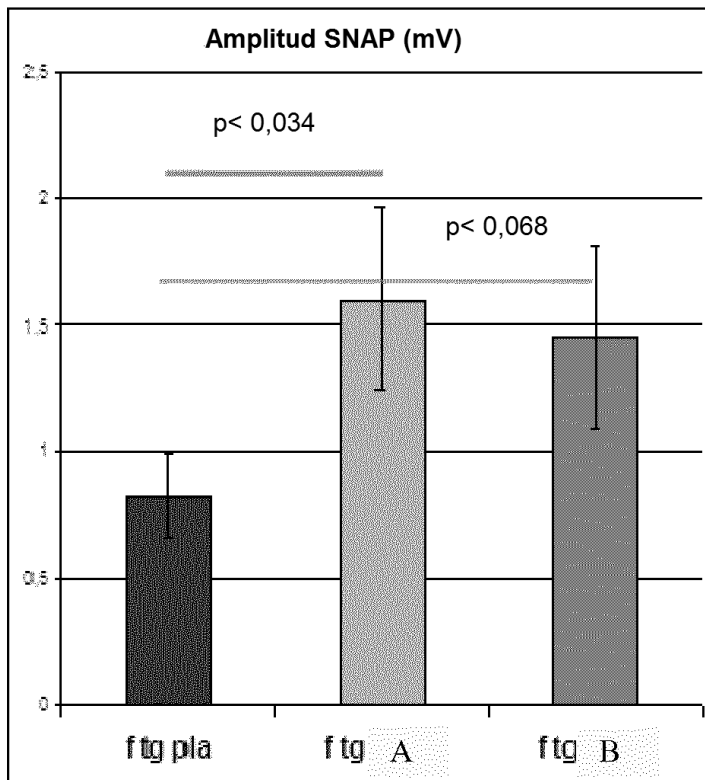


Fig. 8