

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 373**

51 Int. Cl.:

A61K 31/047 (2006.01)

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 31/485 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.02.2015 PCT/EP2015/053700**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15124763**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2015 E 15709428 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3110411**

54 Título: **Nuevas composiciones para tratar lesiones neuronales mecánicas**

30 Prioridad:

24.02.2014 US 201414187841

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

20.07.2020

73 Titular/es:

**PHARNEXT (100.0%)
11-13 Rue René Jacques
92130 Issy-les-Moulineaux, FR**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 774 373 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevas composiciones para tratar lesiones neuronales mecánicas

La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento de neuropatías traumáticas o traumatismos neuronales mecánicos.

5 La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ("CMT") es una polineuropatía periférica genética huérfana. Afecta a aproximadamente 1 de cada 2500 individuos, esta enfermedad es el trastorno hereditario más común del sistema nervioso periférico. Su inicio normalmente se produce durante la primera o segunda década de la vida, aunque se puede detectar en la infancia. El curso de la enfermedad es crónico con degeneración neuromuscular gradual. La enfermedad es invalidante con casos de dolor neurológico acompañante y de discapacidad muscular extrema. La CMT
10 es una de las patologías genéticas mejor estudiadas con aproximadamente 30 000 casos en Francia. Mientras que la mayoría de los pacientes con CMT albergan una duplicación de un fragmento del cromosoma 17 que contiene un gen de mielina: PMP22 (forma CMT1A), han sido implicados dos docenas de genes en las diferentes formas de la CMT. Por consiguiente, aunque de origen monogénico, esta patología manifiesta heterogeneidad clínica debido a posibles genes moduladores. Los genes mutados en los pacientes con CMT se agrupan alrededor de vías moleculares estrechamente conectadas que afectan a la diferenciación de las células de Schwann o de las neuronas o cambian la interacción de estas células en los nervios periféricos.

La extracción de datos públicamente disponibles, que describen mecanismos moleculares y manifestaciones patológicas de la enfermedad de CMT1A, nos permitió priorizar algunos módulos celulares funcionales-regulación transcripcional del gen de PMP22, plegamiento/degradación de la proteína PMP22, proliferación y apoptosis de las células de Schwann, muerte de las neuronas, 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.

La solicitud de patente internacional nº PCT/EP2008/066457 describe un método para identificar candidatos a fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth mediante la construcción de un modelo dinámico de la patología y la orientación de las vías celulares funcionales que son relevantes en la regulación de la enfermedad de CMT.

La solicitud de patente internacional nº PCT/EP2008/066468 describe composiciones para el tratamiento de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth que comprenden al menos dos compuestos seleccionados del grupo de múltiples candidatos a fármacos.

Compendio de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar nuevas combinaciones terapéuticas para tratar neuropatías traumáticas o un traumatismo neuronal mecánico, que utiliza combinaciones de fármacos particulares.

El objeto de esta invención se refiere a una composición como se define en las reivindicaciones. Más particularmente, la invención se refiere a una composición que comprende baclofeno, sorbitol y naltrexona, o sales, enantiómeros o racematos de los mismos, para uso en promover o mejorar la regeneración nerviosa en un sujeto que padece una neuropatía traumática o un traumatismo neuronal mecánico.

En la presente memoria se describe una composición que comprende baclofeno, sorbitol y un compuesto seleccionado de pilocarpina, metimazol, mifepristona, naltrexona, rapamicina, flurbiprofeno y ketoprofeno, sales o profármacos de los mismos, para la administración simultánea, por separado o secuencial a un sujeto mamífero.

En la presente memoria se describe una composición que comprende baclofeno, sorbitol y naltrexona, para la administración simultánea, por separado o secuencial a un sujeto mamífero.

En la presente memoria se describe una composición como se ha descrito anteriormente que comprende además uno o varios excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables (es decir, una composición farmacéutica).

45 En la presente memoria se describe el uso de una combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un traumatismo neuronal mecánico o una neuropatía traumática.

En la presente memoria se describe un método para tratar una neuropatía traumática o un traumatismo neuronal mecánico, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición como se ha definido anteriormente.

En la presente memoria se describe un método para preparar una composición farmacéutica, comprendiendo el método mezclar los compuestos anteriores en un excipiente o vehículo apropiado.

En la presente memoria se describe un método para promover o mejorar la regeneración nerviosa en un sujeto que padece una neuropatía traumática o un traumatismo neuronal mecánico, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

- 5 En la presente memoria se describe un método para promover la regeneración nerviosa en un sujeto que tiene una neuropatía traumática, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

10 En la presente memoria se describe un método para promover o mejorar la regeneración nerviosa en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

En la presente memoria se describe un método para promover o mejorar la mielinización nerviosa en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

- 15 En la presente memoria se describe un método para restaurar la morfología del axón, el crecimiento o la función electrofisiológica en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

La invención es particularmente adecuada para tratar sujetos que tienen neuropraxia, axonometsis o neurotmesis, así como en sujetos que tienen una lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal o una lesión mecánica de los nervios periféricos.

- 20 Cualquiera de los diversos usos o métodos de tratamiento descritos en la presente memoria también puede incluir una etapa opcional para diagnosticar a un paciente que tiene el traumatismo mecánico.

25 A este respecto, en la presente memoria también se describe un método para tratar una lesión nerviosa mecánica, comprendiendo el método (1) evaluar si un sujeto tiene lesión nerviosa mecánica y (2) tratar al sujeto que tiene lesión nerviosa mecánica con una cantidad eficaz de una combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente, dicho tratamiento da como resultado la regeneración nerviosa. La determinación de si un sujeto tiene una lesión nerviosa mecánica se puede hacer mediante diversos ensayos conocidos per se en la técnica.

La invención se puede utilizar en cualquier sujeto mamífero, particularmente sujetos humanos.

Leyenda de las figuras

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

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

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

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

- 45 Figura 5. Efecto positivo sobre los andares de ratas macho del tratamiento de 3 y 6 semanas (gráfica izquierda y derecha respectivamente) con la composición de la Mezcla 1 (las barras blancas representan andares fluidos; las barras grises representan andares no fluidos); las barras negras representan ratas con una grave incapacidad para andar. Las estadísticas se realizan con el ensayo de Student bilateral).

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

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

5 Figura 8. Efecto protector sobre ratas macho de la Mezcla 1 sobre la neuropatía inducida por oxaliplatino (las barras blancas representan ratas de tipo salvaje tratadas con placebo; las barras negras representan ratas de tipo salvaje tratadas con el producto de referencia gabapentina; las barras grises representan ratas de tipo salvaje tratadas con la Mezcla 1. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. Las estadísticas se realizan con el ensayo de Student bilateral).

Figura 9. Disminución significativa de la expresión de ARN de pmp22 en animales transgénicos tratados en comparación con ratas transgénicas PMP22, observada después de 9 semanas de tratamiento con la dosis 3 de la Mezcla 7 (MPZ como gen de referencia, Sereda et al. 1996) ($p = 0,0015$). También se ha confirmado la integración transgénica y la sobreexpresión del gen pmp22; el ARN de pmp22 en ratas PMP22 transgénicas se sobreexpresó 1,8 veces en comparación con sus controles de compañeros de camada de tipo salvaje ($p < 10^{-4}$). Se realizó la extracción de ARN de pmp22 en nervios ciáticos de ratas macho de 16 semanas de edad ($n = 18$ para el tipo salvaje, $n = 20$ para las ratas transgénicas y $n = 18$ para TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7). El análisis estadístico se realizó utilizando el ensayo de la t de Welch.

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

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

Figura 12. La fuerza de agarre de grupos de animales de tipo salvaje, transgénicos con placebo y transgénicos tratados con la dosis 3 de la Mezcla 7 se modelizó diariamente durante 9 semanas utilizando un modelo de Cox con un estimador de la varianza de tipo sándwich sobre todos los tiempos después del tratamiento (3, 6 y 9 semanas) y se compararon con la de las TG con placebo de referencia aplicando un ensayo de rango logarítmico al 5% de nivel de significancia. Los valores de p correspondientes estaban presentes en las curvas de Kaplan-Meier. Se observó una disminución significativa de la fuerza de agarre de las patas delanteras de las ratas transgénicas con placebo (línea simple negra, $n = 21$) en comparación con la de las ratas WT (línea simple gris, $p = 1,45 \cdot 10^{-5}$, $n = 19$). El tratamiento con la dosis 3 de la Mezcla 7 aumentó significativamente la fuerza de las patas delanteras (línea discontinua negra; $p = 0,03$, $n = 18$).

Figura 13. Un ensayo de correlación de Pearson mostró una correlación significativa entre el tiempo de latencia a la caída en el ensayo de la barra (después de 9 semanas de tratamiento) y el nivel de expresión de ARN de pmp22: $p = 1,6 \cdot 10^{-4}$ (WT, TG con placebo y TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7 analizadas juntas); $p = 0,07$ (TG con placebo y TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7 analizadas juntas). Cuanto menor era la expresión de ARN de pmp22, mejores fueron los rendimientos del ensayo de la barra. Las ratas macho tenían 16 semanas de edad ($n = 18$ para ratas WT, círculos blancos; $n = 20$ para TG con placebo, círculos negros y $n = 18$ para TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7, triángulos blancos).

Figura 14. Un ensayo de correlación de Pearson mostró una correlación significativa entre el tiempo de latencia a la caída en el ensayo de la barra (después de 9 semanas de tratamiento) y la velocidad de conducción del nervio sensible (NCV): $p = 1,34 \cdot 10^{-6}$ (WT, TG con placebo y TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7 analizadas juntas) y $p = 0,04$ (TG con placebo y TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7 analizadas juntas). Cuanto mayor era la velocidad de conducción, mejores fueron los rendimientos en el ensayo de la barra. Las ratas macho tenían 16 semanas de edad ($n = 18$ para ratas WT, círculos blancos; $n = 20$ para TG con placebo, círculos negros y $n = 18$ para TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7, triángulos blancos).

Figura 15. El tratamiento con la Mezcla 7 (dosis3) de ratones con el nervio aplastado restaura la fisiología del nervio y mejora la integridad axonal y de la mielina. A) Un tratamiento oral de 3 semanas con la Mezcla 7 aumentó la amplitud del CMAP (nervio ciático/gastrocnemio) de ratones macho con nervio ciático aplastado. ($n = 10$ para cada grupo sham, aplastamiento/vehículo y aplastamiento/mezcla 7). B) Un tratamiento oral de 6 semanas con la mezcla 7 mejoró significativamente el tamaño del calibre del axón. C) La distribución de la relación de G (relación del diámetro axonal interno al diámetro externo total-axonal y de la mielina-) según el diámetro del axón en ratones aplastados mostró hipermielinización de los axones más pequeños e hipomielinización de los axones más grandes. Un tratamiento oral

de 6 semanas con la mezcla 7 mejoró significativamente la distribución de la relación de G de los ratones aplastados (B) y C), n=6 para cada grupo) (ensayo-t. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. Todos los datos se muestran como media + e.e.m.).

5 Figura 16. La Mezcla 7 mejoró significativamente (P<0,05) las discapacidades de la neuropatía en pacientes con CMT1A en un experimento de 12 meses (media ± e.e.m). En el grupo tratado con la Mezcla 7 (línea continua), la ONLS mejoró en más del 10% en comparación con la puntuación del valor de referencia, mientras que en el grupo con placebo (línea discontinua), la ONLS disminuyó aproximadamente un 5% en comparación con la puntuación del valor de refencia.

10 Figura 17. El tratamiento con la Mezcla 7 de ratones con nervios aplastados restaura el comportamiento funcional. A) Los ratones operados no pueden colocar correctamente su pata afectada para realizar movimientos normales, dando como resultado una disminución de la relación de la superficie de apoyo. B) La Mezcla 7 (baclofeno (BCL) 600 µg/kg, naltrexona (NTX) 70 µg/kg, D-sorbitol (SRB) 21 mg/kg), después de 13 días de tratamiento, puede normalizar completamente este defecto funcional, mientras que los fármacos individuales no tienen efecto sobre la relación de la superficie de apoyo (C), D), E)). n=10 para cada grupo. (Los datos se muestran como media + e.e.m. * p<0,05, ** p<0,01 frente al vehículo aplastado (ensayo-t); ns: no significativo).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos enfoques terapéuticos para tratar una neuropatía traumática o un traumatismo neuronal mecánico. La invención describe nuevas combinaciones de fármacos que permiten una corrección eficaz de tales enfermedades y se pueden utilizar en cualquier sujeto mamífero.

20 Dentro del contexto de esta solicitud, "CMT" incluye CMT1A, CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1X, CMT2A, CMT2B, CMT2D, CMT2E, CMT2-P0, CMT4A, CMT4B1, CMT4B2, CMT4D, CMT4F, CMT4 o AR-CMT2A, o ART más preferiblemente CMT1a.

25 Dentro del contexto de la presente solicitud, el término "trastorno relacionado con la CMT" designa otras enfermedades asociadas con la expresión anómala de PMP22 que conduce a la mielinización anómala y pérdida de neuronas. El término "trastorno relacionado con la CMT" incluye más particularmente enfermedad de Alzheimer (EA), demencia senil de tipo EA (DSTA), enfermedad de Parkinson, demencia de cuerpos de Lewis, demencia vascular, autismo, deterioro cognitivo leve (DCL), deterioro de la memoria asociado con la edad (DMAE) y problemas asociados con el envejecimiento, parkinsonismo post-encefalítico, esquizofrenia, depresión, enfermedad bipolar y otros trastornos del estado de ánimo, enfermedad de Huntington, enfermedades de las neuronas motoras, incluida la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, glaucoma, síndrome de Guillain-Barré, distrofia axonal de Gracile, neuropatías, incluidas las neuropatías idiopáticas, neuropatía diabética, neuropatía tóxica, incluida la neuropatía inducida por tratamientos farmacológicos, neuropatías y demencia provocadas por VIH, radiación, metales pesados o estados de deficiencia de vitaminas o neuropatías traumáticas (p. ej., como resultado de un traumatismo neuronal mecánico), neurodegeneración basada en priones, incluida la enfermedad de Creutzfeld-Jakob (ECJ), encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), GSS, IFF, y síndrome de Kuru y Alper.

35 Dentro del contexto de la invención, los "traumatismos neuronales mecánicos" se refieren a un daño físico directo al nervio, o en el sistema nervioso central (SNC) o en el sistema nervioso periférico (SNP). Los daños en el SNP se pueden clasificar según la etapa del traumatismo neuronal. La presente invención es adecuada para tratar lesiones nerviosas clasificadas desde neurapraxia (afección donde solo se deteriora la capacidad de señalización del nervio), axonotmesis (lesión que implica daños a los axones, sin deteriorar los tejidos conectivos circundantes de los nervios), y también neurotmesis (lesión que daña tanto los axones como los tejidos circundantes). Los traumatismos neuronales mecánicos pueden tener un origen accidental o ser el resultado de una cirugía o de otras afecciones como, por ejemplo, la incontinencia urinaria asociada al parto.

40 Los daños al SNC incluyen lesiones de la médula espinal, así como lesiones cerebrales traumáticas. Las lesiones cerebrales traumáticas pueden ser o primarias (es decir, como resultado directo del trauma) o lesiones secundarias (es decir, que son las consecuencias del trauma). Las lesiones de la médula espinal se pueden clasificar según el alcance de las discapacidades sensoriales y motoras, según lo establecido en Las Normas Internacionales para la Clasificación Neurológica de Lesiones de la Médula Espinal (Kirshblum et al., 2011).

45 Como se utiliza en la presente memoria, "tratamiento" de un trastorno incluye la terapia, prevención, profilaxis, retraso o reducción del dolor provocado por el trastorno. El término tratamiento incluye en particular el control de la progresión de la enfermedad y los síntomas asociados. En particular, el tratamiento de una CMT o neuropatía relacionada según la invención incluye una prevención o retraso o reducción o mejora en un deterioro motor, autonómico y/o sensorial producido por tales enfermedades. Los síntomas motores incluyen contracción incontrolable, debilidad de la fasciculación o falta de respuesta completa del (de los) músculo(s) inervado(s) por los nervios lesionados. Los síntomas autónomos pueden afectar el sistema cardiovascular, sudomotor, termorregulador, urinario, gastrointestinal y/o reproductivo. Los síntomas sensoriales incluyen dolor, entumecimiento o una pérdida de la sensibilidad en las áreas inervadas por los nervios lesionados.

La "regeneración nerviosa" incluye la promoción de la mielinización, el crecimiento axonal y/o la restauración o de las características morfológicas o funcionales del nervio.

Además, el término "compuesto" designa los compuestos químicos como los nombrados específicamente en la solicitud, así como cualquier composición farmacéuticamente aceptable con sal, hidrato, éster, éter, isómeros, racemato, conjugados, profármacos aceptables de los mismos. Los compuestos enumerados en esta solicitud también se pueden identificar con su número CAS correspondiente.

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

Compuestos adicionales utilizados en la invención son acetazolamida (CAS 59-66-5) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; albuterol (CAS 18559-94-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; amilorida (CAS 2016-88-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; aminoglutetimida (CAS 125-84-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; amiodarona (CAS 1951-25-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; aztreonam (CAS 78110-38-0) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; baclofeno (CAS 1134-47-0) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; balsalazida (CAS 80573-04-2) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; betaína (CAS 107-43-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; betanecol (CAS 674-38-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; bicalutamida (CAS 90357-06-5) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; bromocriptina (CAS 25614-03-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; bumetanida (CAS 28395-03-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; buspirona (CAS 36505-84-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; carbacol (CAS 51-83-2) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; carbamazepina (CAS 298-46-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; carbimazol (CAS 22232-54-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; cevimeлина (CAS 107233-08-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; ciprofloxacina (CAS 85721-33-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; clonidina (CAS 4205-90-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; curcumina (CAS 458-37-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; ciclosporina A (CAS 59865-13-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; diazepam (CAS 439-14-5) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; diclofenaco (CAS 15307-86-5) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; dinoprostona (CAS 363-24-6) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; disulfiram (CAS 97-77-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; D-sorbitol (CAS 50-70-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; dutasterida (CAS 164656-23-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; estradiol (CAS 50-28-2) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; exemestano (CAS 107868-30-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; felbamato (CAS 25451-15-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; fenofibrato (CAS 49562-28-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; finasterida (CAS 98319-26-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; flumazenil (CAS 78755-81-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; flunitrazepam (CAS 1622-62-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; flurbiprofeno (CAS 5104-49-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; furosemida (CAS 54-31-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; gabapentina (CAS 60142-96-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; galantamina (CAS 357-70-0) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; haloperidol (CAS 52-86-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; ibuprofeno (CAS 15687-27-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; isoproterenol (CAS 7683-59-2) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; ketoconazol (CAS 65277-42-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; L-carnitina (CAS 541-15-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; liotironina (T3) (CAS 6893-02-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; litio (CAS 7439-93-2) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; losartan (CAS 114798-26-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; loxapina (CAS 1977-10-2) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; meloxicam (CAS 71125-38-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metaproterenol (CAS 586-06-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metaraminol (CAS 54-49-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metformina (CAS 657-24-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metacolina (CAS 55-92-5) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metimazol (CAS 60-56-0) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metilergonovina (CAS 113-42-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metoprolol (CAS 37350-58-6) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; metirapona (CAS 54-36-4) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; miconazol (CAS 22916-47-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; mifepristona (CAS 84371-

65-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; nadolol (CAS 42200-33-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; naloxona (CAS 465-65-6) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; naltrexona (CAS 16590-41-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; norfloxacina (CAS 70458-96-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; pentazocina (CAS 359-83-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; fenoxibenzamina (CAS 59-96-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; fenilbutirato (CAS 1821-12-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; pilocarpina (CAS 54-71-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; pioglitazona (CAS 111025-46-8) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; prazosina (CAS 19216-56-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; propiltiouracilo (CAS 51-52-5) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; raloxifeno (CAS 84449-90-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; rapamicina (CAS 53123-88-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; rifampina (CAS 13292-46-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; simvastatina (CAS 79902-63-9) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; espirolactona (CAS 52-01-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; tacrolimus (CAS 104987-11-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; tamoxifeno (CAS 10540-29-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; trehalosa (CAS 99-20-7) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; trilostano (CAS 13647-35-3) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados; ácido valproico (CAS 99-66-1) y sus posibles sales, enantiómeros, profármacos y derivados.

El término "combinación" designa un tratamiento en donde se co-administran varios fármacos a un sujeto para producir un efecto biológico. En una terapia combinada, los fármacos se pueden administrar juntos o por separado, al mismo tiempo o secuencialmente. Además, los fármacos se pueden administrar a través de diferentes vías y protocolos.

En la presente memoria se describen la identificación y actividades de combinaciones de fármacos particulares que proporcionan un tratamiento eficaz para las neuropatías traumáticas y los traumatismos neuronales mecánicos. Más específicamente, en la presente memoria se describen nuevas combinaciones ternarias que proporcionan un efecto significativo in vitro e in vivo en la regeneración nerviosa.

A este respecto, en la presente memoria se describe una composición que comprende baclofeno, sorbitol y un compuesto seleccionado de pilocarpina, metimazol, mifepristona, naltrexona, rapamicina, flurbiprofeno y ketoprofeno, sales, enantiómeros, racematos o profármacos de los mismos.

También en la presente memoria se describe una composición que comprende baclofeno, sorbitol y un compuesto seleccionado de pilocarpina, metimazol, mifepristona, naltrexona y ketoprofeno.

También se describe en la presente memoria una composición que comprende naltrexona, baclofeno y sorbitol, para administración simultánea, por separado o secuencial a un sujeto mamífero.

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

En la presente memoria se describe una composición que comprende:

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

para la administración simultánea, por separado o secuencial a un sujeto mamífero.

En la presente memoria se describe una composición que comprende:

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

para la administración simultánea, por separado o secuencial a un sujeto mamífero.

El modulador de PMP22 puede ser cualquier compuesto que module la vía de PMP22 en una célula y produzca o contribuya esencialmente a la normalización de la organización de mielina y/o la inhibición de la pérdida de neuronas. El modulador de PMP22 se puede seleccionar de acetazolamida, albuterol, amilorida, aminoglutetimida, amiodarona, aztreonam, baclofeno, balsalazida, betaína, betanecol, bicalutamida, bromocriptina, bumetanida, buspirona, carbacol, carbamazepina, carbimazol, cevimelina, ciprofloxacina, clonidina, curcumina, ciclosporina A, diazepam, diclofenaco, dinoprostona, disulfiram, D-sorbitol, dutasterida, estradiol, exemestano, felbamato, fenofibrato, finasterida, flumazenilo, flunitrazepam, flurbiprofeno, furosemida, gabapentina, galantamina, haloperidol, ibuprofeno, isoproterenol, ketoconazol, ketorofeno, L-carnitina, liotironina (T3), litio, losartán, loxapina, meloxicam, metaproterenol, metaraminol,

metformina, metacolina, metimazol, metilergonovina, metoprolol, metirapona, miconazol, mifepristona, nadolol, naloxona, naltrexona, norfloxacin, pentazocina, fenilbutirato, pilocarpina, pioglitazona, prazosina, propiltiouracilo, raloxifeno, rapamicina, rifampina, rimvastatina, espirolactona, tacrolimus, tamoxifeno, trehalosa, trilostano, sales de ácido valproico o profármacos de los mismos.

5 Más particularmente, el compuesto (c) se puede seleccionar de pilocarpina, metimazol y baclofeno. A este respecto, la composición más preferida de esta descripción comprende:

(a) rapamicina

(b) mifepristona, y

(c) un compuesto seleccionado de pilocarpina, metimazol y baclofeno,

10 para la administración simultánea, por separado o secuencial a un sujeto mamífero.

Ejemplos específicos de tales composiciones incluyen composiciones que comprenden:

- rapamicina, mifepristona y pilocarpina,
- rapamicina, mifepristona y baclofeno,
- rapamicina, mifepristona y metimazol o
- 15 • rapamicina, naltrexona y metimazol.

La sección experimental muestra que estas combinaciones de fármacos particulares pueden corregir eficazmente la expresión de PMP22 in vitro para restaurar la mielinización normal y la integridad de las neuronas, y así mejorar la CMT en animales in vivo. Los resultados también muestran que estas combinaciones pueden proteger a los animales de neuropatías inducidas por quimioterapia o traumáticas. Como resultado, estas composiciones se pueden utilizar para prevenir o reducir la neuropatía inducida por quimioterapia, permitiendo así que los pacientes reciban quimioterapia durante períodos más largos. También se ilustra en la sección experimental las propiedades promotoras de la regeneración nerviosa de las composiciones de la invención. De hecho, los inventores han demostrado una actividad neurotrófica de las combinaciones de la invención que se caracteriza por una promoción del crecimiento del axón y de la mielinización, que da como resultado una restauración significativa de la transmisión de los impulsos nerviosos al músculo. En consecuencia, las composiciones de la invención se pueden utilizar para mejorar y/o acelerar la recuperación de cualquier traumatismo neuronal, o de origen genético, químico o mecánico (p. ej., traumático).

25 En la presente memoria se describe una composición que comprende naltrexona, baclofeno y un inhibidor distinto de PMP22 como se ha definido anteriormente.

30 En la presente memoria se describe una composición como se ha descrito anteriormente que comprende además uno o varios excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables (es decir, una composición farmacéutica).

En la presente memoria se describe un método para promover la regeneración nerviosa en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto o una combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

35 En la presente memoria se describe una composición como se ha descrito anteriormente para tratar la CMT o un trastorno relacionado con la CMT.

En la presente memoria se describe el uso de una combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la CMT o un trastorno relacionado con la CMT.

40 En la presente memoria se describe un método para tratar la CMT o un trastorno relacionado con la CMT, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición como se ha definido anteriormente.

En la presente memoria se describe un método para preparar una composición farmacéutica, comprendiendo el método mezclar los compuestos anteriores en un excipiente o vehículo apropiado.

45 En la presente memoria se describe un método para tratar la CMT1A en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

En la presente memoria se describe un método para tratar la neuropatía tóxica en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

En la presente memoria se describe un método para tratar la ELA en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

5 En la presente memoria se describe un método para tratar una neuropatía traumática en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

En una realización particular, el sujeto que necesita promover la regeneración nerviosa está padeciendo o ha padecido traumatismos mecánicos neuronales, por ejemplo, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal o lesiones de los nervios periféricos.

10 En la presente memoria se describe un método para mejorar y/o acelerar la recuperación de un traumatismo neuronal en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto o combinación de compuestos como se ha descrito anteriormente.

15 En una realización particular, el sujeto que necesita mejorar y/o acelerar la recuperación del traumatismo neuronal mecánico está padeciendo o ha padecido una lesión cerebral traumática, una lesión de la médula espinal o lesiones de los nervios periféricos.

La terapia según la invención se puede realizar como combinación de fármacos y/o conjuntamente con cualquier otra terapia. Se puede proporcionar en el hogar, el consultorio del médico, una clínica, un departamento de consultas externas de un hospital o en un hospital, de manera que el médico pueda observar los efectos de la terapia estrechamente y hacer cualquier ajuste necesario.

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

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

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

30

Formulación de composiciones farmacéuticas

35 La administración de cada fármaco de la combinación puede ser por cualquier medio adecuado que dé como resultado una concentración del fármaco que, combinada con el otro componente, pueda mejorar la afección del paciente (que se puede determinar, p. ej., in vitro por un efecto sobre la expresión elevada de PMP22 tras alcanzar los nervios periféricos).

Aunque es posible que los ingredientes activos de la combinación se administren como el producto químico puro, es preferible presentarlos como una composición farmacéutica, también denominada en este contexto como formulación farmacéutica. Composiciones posibles incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, tópica (incluye transdérmica, bucal y sublingual) o parenteral (incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica).

40 Más comúnmente, estas formulaciones farmacéuticas se prescriben al paciente en "envases para el paciente" que contienen un número de unidades de dosificación u otros medios para la administración de dosis unitarias medidas para uso durante un período de tratamiento distinto en un solo envase, normalmente un envase blíster. Los envases para el paciente tienen una ventaja sobre las recetas tradicionales, donde un farmacéutico divide el suministro al paciente de un producto farmacéutico desde un suministro a granel, ya que el paciente siempre tiene acceso al folleto contenido en el envase para el paciente, que normalmente falta en las recetas tradicionales. Se ha mostrado que la inclusión de un folleto mejora el cumplimiento del paciente con las instrucciones del médico. Por consiguiente, la invención incluye además una formulación farmacéutica, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, en combinación con material de envase adecuado para dichas formulaciones. En dicho envase para el paciente, el uso previsto de una formulación para el tratamiento de combinación se puede deducir mediante instrucciones, capacidades, provisiones, adaptaciones y/u otros medios para ayudar a utilizar la formulación lo más adecuadamente para el tratamiento. Tales medidas hacen que un envase para el paciente sea específicamente adecuado y adaptado para uso para el tratamiento con la combinación de la presente invención.

55 El fármaco puede estar contenido en cualquier cantidad apropiada en cualquier sustancia de vehículo adecuada, y puede estar presente en una cantidad del 1-99% en peso del peso total de la composición. La composición se puede proporcionar en una forma de dosificación que sea adecuada para la vía de administración oral, parenteral (p. ej.,

intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhalante, piel (parche) u ocular. Por consiguiente, la composición puede estar en forma de, p. ej., comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles que incluyen hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, apósitos, pociones, dispositivos de administración osmótica, supositorios, enemas, inyectables, implantes, pulverizadores o aerosoles.

5 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular según la práctica farmacéutica convencional (véase, p. ej., Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20ª 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).

10 Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden formular para liberar el fármaco activo sustancialmente de forma inmediata después de la administración o en cualquier momento o período de tiempo predeterminado después de la administración.

15 Las formulaciones de liberación controlada incluyen (i) formulaciones que crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un período de tiempo prolongado; (ii) formulaciones que después de un tiempo de desfase predeterminado crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un período de tiempo prolongado; (iii) formulaciones que mantienen la acción del fármaco durante un período de tiempo predeterminado manteniendo un nivel de fármaco eficaz relativamente constante en el cuerpo con la minimización concomitante de los efectos secundarios indeseables asociados con las fluctuaciones en el nivel plasmático de la sustancia farmacológica activa; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco, p. ej., por colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente al tejido u órgano enfermo o dentro de ellos; y (v) formulaciones que dirigen la acción del fármaco utilizando de vehículos o derivados químicos para administrar el fármaco a un tipo de célula diana particular.

20 La administración de fármacos en la forma de formulación de liberación controlada se prefiere especialmente en casos en los que el fármaco en combinación tiene (i) un índice terapéutico estrecho (es decir, la diferencia entre la concentración plasmática que conduce a efectos secundarios perjudiciales o reacciones tóxicas y la concentración plasmática que conduce a un efecto terapéutico es pequeña; en general, el índice terapéutico, IT, se define como la relación entre la dosis letal mediana (DL50) y la dosis eficaz mediana (DE50)); (ii) una ventana de absorción estrecha en el tracto gastrointestinal; o (iii) una semivida biológica muy corta, de manera que se requiera la dosificación frecuente durante un día para mantener el nivel plasmático a un nivel terapéutico.

30 Se puede seguir cualquiera de una serie de estrategias para obtener la liberación controlada en la que la velocidad de liberación supera a la velocidad de metabolismo del fármaco en cuestión. La liberación controlada se puede obtener mediante la selección apropiada de diversos parámetros e ingredientes de la formulación, que incluyen, p. ej., diversos tipos de composiciones y recubrimientos de liberación controlada. Por consiguiente, el fármaco se formula con excipientes apropiados en una composición farmacéutica que, tras la administración, libera el fármaco de manera controlada (composiciones de comprimidos o cápsulas de una sola o varias unidades, soluciones oleosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches, y liposomas).

Formas de dosificación sólida para uso oral

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

50 Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden estar recubiertos por técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. El recubrimiento se puede adaptar para liberar la sustancia farmacológica activa en un patrón predeterminado (p. ej., para lograr una formulación de liberación controlada) o se puede adaptar para no liberar la sustancia farmacológica activa hasta después del paso del estómago (recubrimiento entérico). El recubrimiento puede ser un recubrimiento de azúcar, un recubrimiento de película (p. ej., basado en hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona), o un recubrimiento entérico (p. ej., basado en copolímero de ácido metacrílico, acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato ftalato de polivinilo, goma laca y/o etilcelulosa). Se puede emplear un material de retardo del tiempo tal como, p. ej., monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones de comprimidos sólidos pueden incluir un recubrimiento adaptado para proteger la composición de cambios químicos no deseados (p. ej., degradación química antes de la liberación de la sustancia farmacológica

activa). El recubrimiento se puede aplicar sobre la forma de dosificación sólida de manera similar a la descrita en la Enciclopedia de Tecnología Farmacéutica.

5 Los fármacos se pueden mezclar en el comprimido o se pueden dividir. Por ejemplo, un primer fármaco está contenido en el interior del comprimido, y un segundo fármaco está en el exterior, de modo que una parte sustancial del segundo fármaco se libera antes de la liberación del primer fármaco.

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

Las composiciones de liberación controlada para uso oral se pueden, p. ej., construir para liberar el fármaco activo controlando la disolución y/o la difusión de la sustancia farmacológica activa.

15 La liberación controlada por disolución o difusión se puede lograr mediante el recubrimiento apropiado de un comprimido, cápsula, píldora o formulación granulada de fármacos, o incorporando el(los) fármaco(s) en una matriz apropiada. Un recubrimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de recubrimiento mencionadas anteriormente y/o, p. ej., goma laca, cera de abejas, glycowax, cera de ricino, cera de carnauba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, palmitostearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido dl-poliláctico, acetato butirato de celulosa, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, vinilpirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metacrilato de metilo, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3 butilenglicol, metacrilato de etilenglicol y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de la matriz también puede incluir, p. ej., metilcelulosa hidratada, cera de carnauba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, tristearato de glicerilo, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, cloruro de polivinilo, polietileno y/o fluorocarbono halogenado.

25 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 o cápsula flotante (es decir, un comprimido o cápsula que, tras la administración oral, flota sobre la parte superior del contenido gástrico durante un cierto periodo de tiempo). Una formulación de comprimido flotante del (de los) fármaco(s) se puede preparar granulando una mezcla del (de los) fármaco(s) con excipientes y el 20-75% p/p de hidrocoloides, tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. Los gránulos obtenidos se pueden comprimir en comprimidos. En contacto con el jugo gástrico, el comprimido forma una barrera de gel sustancialmente impermeable al agua alrededor de su superficie. Esta barrera de gel participa en el mantenimiento de una densidad menor que uno, permite así que el comprimido permanezca flotante en el jugo gástrico.

Líquidos para administración oral

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

40 Composiciones parenterales

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

50 Las composiciones para uso parenteral se pueden proporcionar en formas de dosificación unitarias (p. ej., en ampollas de una sola dosis) o en viales que contienen varias dosis y en los que se puede añadir un conservante adecuado (véase más adelante). La composición puede estar en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión o un dispositivo de administración para implantación o se puede presentar como un polvo seco para ser reconstituido con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Aparte del(de los) fármaco(s) activo(s), la composición puede incluir vehículos y/o excipientes parenteralmente aceptables adecuados. El(los) fármaco(s) activo(s) se puede(n) incorporar en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas o similares para la liberación controlada. La composición puede incluir agentes de suspensión, solubilizantes, estabilizantes, de ajuste del pH y/o agentes dispersantes.

55 Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden estar en la forma adecuada para inyección estéril. Para preparar dicha composición, el(los) fármaco(s) activo(s) adecuado(s) se disuelve(n) o suspende(n) en un vehículo líquido parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua,

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

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

Composiciones rectales

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

Composiciones percutáneas y tópicas

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

30 Los agentes emulsionantes pueden ser gomas de origen natural (p. ej., goma de acacia o goma de tragacanto)

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

35 Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para la administración tópica en la piel también se pueden utilizar en conexión con la administración tópica sobre o cerca de la parte del cuerpo que se va a tratar. Las composiciones se pueden adaptar para la aplicación directa o para la aplicación por medio de dispositivos especiales de administración de fármacos tales como vendajes o, alternativamente apósitos, almohadillas, esponjas, tiras u otras formas de material flexible adecuado.

Dosificaciones y duración del tratamiento

40 Se apreciará que los fármacos de la combinación se pueden administrar de forma concomitante, o en la misma formulación farmacéutica o en una diferente o de forma secuencial. Si hay administración secuencial, el retraso en la administración de uno de los ingredientes activos no debería ser tal como para perder el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. Un requisito mínimo para una combinación según esta descripción es que la combinación debe estar prevista para el uso combinado con el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. El uso previsto de una combinación se puede deducir mediante capacidades, provisiones, adaptaciones y/u otros medios para ayudar a usar la combinación según la invención.

50 Las cantidades terapéuticamente eficaces de los fármacos que son objeto de esta invención se pueden utilizar juntas para la preparación de un medicamento útil para reducir el efecto del aumento de la expresión del gen PMP22; la restauración de la mielinización normal e integridad nerviosa, la prevención o reducción del riesgo de desarrollar la enfermedad de CMT, la detección o retraso de la progresión de la enfermedad de CMT una vez que se ha manifestado clínicamente y la prevención o reducción del riesgo de un primer o posterior caso de un evento neuropático.

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

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

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

10 La cantidad de cada fármaco en la combinación preferida para una dosis unitaria dependerá de varios factores, que incluye la vía de administración, el peso corporal y la edad del paciente, la gravedad del daño neuropático producido por la enfermedad de CMT o el riesgo de potenciales efectos secundarios considerando el estado general de salud de la persona que se va a tratar.

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

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

Por ejemplo,

- 20 • para rapamicina, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 µg/kg por día, normalmente de 1 a 50 µg/kg, por ejemplo entre 5 y 30 µg/kg/día.
- para mifepristona, de aproximadamente 1 a aproximadamente 300 µg/kg por día, normalmente de 10 a 200 µg/kg, por ejemplo entre 10 y 80 µg/kg/día.
- 25 • para la naltrexona, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 µg/kg por día, normalmente de 1 a 50 µg/kg, por ejemplo entre 1 y 20 µg/kg/día.
- para pilocarpina, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 µg/kg por día, normalmente de 1 a 50 µg/kg, por ejemplo entre 1 y 20 µg/kg/día.
- para baclofeno, de aproximadamente 1 a aproximadamente 300 µg/kg por día, normalmente de 10 a 200 µg/kg, por ejemplo entre 20 y 100 µg/kg/día.
- 30 • para metimazol, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 µg/kg por día, normalmente de 1 a 50 µg/kg, por ejemplo entre 1 y 20 µg/kg/día.
- para sorbitol, de aproximadamente 17 µg/kg a aproximadamente 17 mg/kg por día, normalmente de 167 µg/kg a 7 mg/kg por día, por ejemplo entre 333 µg/kg por día y 3,5 mg/kg por día.

Normalmente, las dosis administradas corresponden a las aplicadas para un ser humano de 60 kg.

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

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

Los siguientes ejemplos se dan para fines de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

A. Preparación de combinaciones de fármacos

45 Se prepararon las siguientes combinaciones de fármacos, siendo las mezclas 2-6 las combinaciones de fármacos de referencia:

ES 2 774 373 T3

	Molécula	Dosis
Mezcla 1	sorbitol	2,1 mg/kg/día
	S-baclofeno(-)	60 µg/kg/día
	naltrexona	7 µg/kg/día

	Molécula	Dosis
Mezcla 2	rapamicina	15 µg/kg/día
	mifepristona	40 µg/kg/día

	Molécula	Dosis
Mezcla 3	rapamicina	15 µg/kg/día
	mifepristona	40 µg/kg/día
	pilocarpina	7 µg/kg/día

	Molécula	Dosis
Mezcla 4	rapamicina	15 µg/kg/día
	mifepristona	40 µg/kg/día
	baclofeno	60 µg/kg/día

	Molécula	Dosis
Mezcla 5	rapamicina	15 µg/kg/día
	mifepristona	40 µg/kg/día
	metimazol	4,2 µg/kg/día

	Molécula	Dosis
Mezcla 6	rapamicina	15 µg/kg/día
	naltrexona	7 µg/kg/día
	metimazol	4,2 µg/kg/día

	Molécula	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
Mezcla 7	sorbitol	10,5 mg/kg/día	2,1 mg/kg/día	1,05 mg/kg/día
	(RS)-baclofeno	0,3 mg/kg/día	60 µg/kg/día	30 µg/kg/día
	naltrexona	35 µg/kg/día	7 µg/kg/día	3,5 µg/kg/día

B. Experimentos in vitro

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

1.1 Cultivo celular

5 1.1.1: Células de Schwann primarias de rata disponibles comercialmente

Se descongelan viales de cultivo primario de células de Schwann (CS) de rata (Sciencell nº R1700) y se siembran a la densidad de 10 000 células/cm² en "medio de células de Schwann de Sciencell" (medio basal de Sciencell nº R1701) en matraces de 75 cm² previamente recubiertos con poli-L-lisina. El medio de cultivo está compuesto de medio basal, 5% de suero bovino fetal (3H-Biomedical AB nº 1701-0025), 1% de suplemento de crecimiento para células de Schwann (3H Biomedical AB nº 1701-1752), 1% de gentamicina (Sigma nº G1397) y 10 µM de forskolina (Sigma nº F6886) para promover su proliferación.

Después de alcanzar la confluencia (4 a 10 días dependiendo del lote de células), las células de Schwann se purifican mediante agitación suave o mediante inmunopanning con thy 1.1 que permite el aislamiento de las CS de los fibroblastos adherentes para producir cultivos que son al menos 95% puros. Luego se cuentan las CS (método azul de triptano) y se siembran en un matraz de 75 cm² previamente recubierto con poli-L-lisina en el mismo medio de CS. En la confluencia, las células se lavan, se tripsinizan (tripsina-EDTA diluido 1x de Invitrogen nº 1540054), se diluyen en PBS (sin calcio ni magnesio) se cuentan y se siembran en placas de 12 pocillos (140 000 células/pocillo) en medio de células de Schwann de Sciencell con 5% de FBS, 1% de suplemento de crecimiento celular (CGS), 40 µg/mL de gentamicina y 4 µM de forskolina.

20 1.1.2 Células de Schwann primarias de ratas hechas a medida

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

La piel dorsal se elimina de la pata trasera y del torso inferior. Se aísla el nervio ciático y se transfiere a una placa de cultivo que contiene Leibovitz enfriado con hielo (L15, Invitrogen nº 11415) complementado con una solución del 1% de penicilina/estreptomicina (50 UI/mL y 50 µg/mL, respectivamente; Invitrogen nº 15070) y 1% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma A6003). Ambos nervios por rata se transfieren en un tubo de 15 mL que contiene L15 enfriado con hielo. Luego se elimina el medio L15 y se sustituye por 2,4 mL de DMEM (Invitrogen nº 21969035) con 10 mg/mL de colagenasa (Sigma nº A6003). Los nervios se incuban en este medio durante 30 minutos a 37°C. Luego se elimina el medio y ambos nervios se disocian con tripsina (10% de tripsina EDTA 10x, Invitrogen nº 15400054) diluida en PBS sin calcio ni magnesio (Invitrogen nº 2007-03) durante 20 minutos a 37°C. La reacción se detiene por adición de DMEM que contiene ADNasa I grado II (0,1 mg/mL de Roche diagnostic nº 104159) y suero de ternera fetal (10% de FCS, Invitrogen nº 10270). La suspensión celular se trituró con una pipeta de 10 mL y se pasó a través de un filtro en un tubo de 50 mL (unidades de filtro de 13 mm Swinnex, Millipore, con filtros de malla de nylon de 20 µm, Fisher). La suspensión celular se centrifuga a 350 g durante 10 min a temperatura ambiente (TA) y los sedimentos se suspenden en DMEM con 10% de FCS y 1% de penicilina/estreptomicina. Las células se cuentan (método de azul de triptano) y se siembran en placas de cultivo de tejido primario de 100 mm de Falcon a la densidad de 5 10⁵ a 10⁶ células/placa.

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

Después de 8 días de cultivo (4 a 10 días dependiendo de los lotes de células), las células de Schwann alcanzan la confluencia y el cultivo, que contiene una gran cantidad de fibroblastos contaminantes, se purifica por el método de inmunopanning con thy1.1. Después de esta purificación, las células se suspenden en medio de crecimiento a 10 000 células/cm² en matraces de 75 cm² previamente recubiertos con poli-L-lisina. Una vez que alcanzan la confluencia,

las células se lavan, se tripsinizan (tripsina-EDTA), se cuentan y siembran en placas de 12 pocillos (100 000 células/pocillo).

1.1.3 Incubación de fármacos

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

10 24 horas después, el medio se sustituye por un medio definido (DMEM-F12) complementado con 1% de insulina-transferrina-selenio-X (ITS, Invitrogen nº 51300), 16 µg/mL de putrescina (Sigma nº P5780), 0,02 µg/mL de corticosterona y 50 µg/mL de gentamicina. En esta etapa, ni la progesterona ni la forskolina están presentes en el medio.

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

15 Se añaden los fármacos a un medio definido compuesto por DMEM-F12 con 1% de insulina-transferrina-selenio-X (ITS, Invitrogen nº 51300), 16 µg/mL de putrescina, 0,02 µg/mL de corticosterona, 10 nM de progesterona y 50 µg/mL de gentamicina. La ausencia de forskolina durante la estimulación con fármacos evita la saturación de adenilato ciclasa.

1.2. Purificación de células de Schwann por inmunopanning con Thy1.1

20 Para prevenir la contaminación del cultivo con fibroblastos, se purifican las células de Schwann utilizando el protocolo de inmunopanning con el clon Thy1.1 (ATCC TIB-103™).

25 Se preparan las placas de Petri de 100 mm para bacterias previamente recubiertas con anticuerpo como sigue: estas placas se lavan tres veces con PBS y se tratan con 20 mL de solución de Tris HCl 50 mM, pH 9,5, con 10 µg/mL de anticuerpo IgM MU anti-ratón de cabra (Jackson ImmunoResearch nº 115-005-020) durante la noche a 4°C; luego se lavan 3 veces con PBS y se tratan con una solución de PBS con 0,02% de BSA y el 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 añadirse las suspensiones celulares.

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

35 La suspensión celular se incuba en la placa de Petri recubierta con Thy 1.1 durante 45 minutos a 37°C con agitación suave cada 15 minutos para evitar la unión no específica. La mayoría de las células de fibroblastos que expresan Thy1.1 se adhieren a la placa. Al final de la incubación, la suspensión celular se recupera y se centrifuga. Esta suspensión celular contiene en teoría solo células de Schwann. Las células se centrifugan y el sedimento celular se suspende en medio de crecimiento con 10 µM de forskolina a 16 000 células/cm² en un matraz T de 75 cm² tratado con poli-L-lisina.

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

40 La RT-PCR cuantitativa se utiliza para comparar los niveles de ARNm de PMP22 después de la estimulación con fármacos, en relación con el ARNm de L13A ribosómico constitutivo en el cultivo primario de células de Schwann de rata.

45 Después de lavar con PBS esterilizado frío, se extraen los ARN totales de cada muestra celular y se purifican de las CS utilizando el micro kit Qiagen RNeasy (Qiagen nº 74004). Los ácidos nucleicos se cuantifican por el espectrofotómetro Nanodrop utilizando 1 µL de muestra de ARN. La integridad del ARN se determina a través de un aparato BioAnalyzer (Agilent).

Los ARN se transcriben de forma inversa en ADNc según el protocolo estándar. Los moldes de ADNc para la amplificación por PCR se sintetizan a partir de 200 ng de ARN total utilizando la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen nº 18064-014) durante 60 minutos a 42°C en presencia de oligo(dT), en un volumen final de 20 µL.

50 Los ADNc se someten a amplificación por PCR utilizando el sistema «LightCycler® 480» (Roche Molecular Systems Inc.). Cada ADNc se diluye cinco veces antes de utilizarse para la amplificación por PCR. 2,5 µL de estos ADNc entran a la solución de reacción de PCR (volumen final de 10 µL). Los experimentos preliminares garantizaron que la

cuantificación se hizo en la fase exponencial del proceso de amplificación para ambas secuencias y que la expresión del gen de referencia fue uniforme en las diferentes condiciones de cultivo.

La reacción de PCR se realiza mediante amplificación de 500 nM de cebador directo de PMP22 de rata (NM_017037), 5-GGAAACGCGAATGAGGC-3 (SEQ ID NO: 1) y 500 nM de cebador inverso 5-GTTCTGTTTGGTTTGGCTT-3 (SEQ ID NO: 2) (amplificación de 148 pb). Un fragmento de 152 pb de ARN ribosómico RPL13A (NM_173340) se amplifica en paralelo en reacciones separadas para la normalización de los resultados utilizando 500 nM de cebador directo 5-CTGCCCTCAAGGTTGTG-3 (SEQ ID NO: 3) y 500 nM de cebador inverso 5-CTTCTTCTCCGGTAATGGAT-3 (SEQ ID NO: 4).

Utilizamos química de FRET para realizar el análisis por RT-Q-PCR. Las sondas de FRET están compuestas de 0,3 µM de Pmp22-FL-5-GCTCTGAGCGTGCATAGGGTAC (SEQ ID NO: 5) o Rpl13A-FL-5-TCGGGTGGAAGTACCAGCC (SEQ ID NO: 6), marcados en su extremo 3' con un colorante de fluoróforo donante (Fluoresceína). 0,15 µM de sondas Red640 se definen como sigue: Pmp22-red-5'-AGGGAGGGAGGAAGGAAACCAGAAA (SEQ ID NO: 7) o Rpl13A-red-5'-TGACAGCTACTCTGGAGGAGAAACGGAA (SEQ ID NO: 8), marcadas en su extremo 5' con un colorante fluoróforo aceptador (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).

Se utilizan 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 determinando la relación entre los productos generados a partir del gen PMP22 diana y el patrón interno endógeno RPL13A.

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

8 horas, 24 horas y 48 horas después de la incubación de los fármacos, los sobrenadantes se recuperan, se centrifugan y se congelan. Se separan las CS con tripsina-EDTA. Tan pronto como la mayoría de las células están en suspensión, la tripsina se neutraliza utilizando DMEM con 10% de FCS.

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

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

Las células se centrifugan a 7000 rpm durante 5 minutos y los sedimentos se suspenden en una solución de permeabilización (AbCys nº de Reactivo B BUF09B) y se marcan con anticuerpo PMP22 primario (Abcam nº ab61220, 1/50) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, las células se centrifugan a 7000 rpm durante 5 minutos y los sedimentos celulares se lavan una vez en PBS. Se añade un anticuerpo secundario, acoplado a Alexa Fluor 488 (IgG anti-conejo de cabra, Molecular Probes nº A11008, 1/100), durante una hora a temperatura ambiente. Luego, las células se centrifugan a 7000 rpm durante 5 minutos y los sedimentos celulares se lavan una vez en PBS. El marcaje se aumenta añadiendo un anticuerpo terciario acoplado a Alexa Fluor 488 (IgG anti-cabra de pollo, Molecular Probes nº A21467, 1/100) durante una hora de incubación, a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavan una vez en PBS. Se realiza el control sin ningún anticuerpo (células no marcadas) para determinar el nivel de autofluorescencia y se adapta la sensibilidad de los fotomultiplicadores. Se realiza el control tanto con anticuerpos secundarios como terciarios pero sin anticuerpo primario, para evaluar la unión no específica de los anticuerpos.

La adquisición y el análisis de datos se realizan con un citómetro FACS Array y el software FACS Array (Becton Dickinson) en 5000 células. Se analizan la dispersión frontal (FSC) correlacionada con el volumen celular (tamaño) y la dispersión lateral (SSC) que depende de la complejidad interna de las células (granularidad). Para la expresión de PMP22, el análisis se realiza dentro de las células totales y se calcula el porcentaje de células positivas. Las células positivas son células con intensidad de fluorescencia más alta que el control con el anticuerpo secundario.

Para cuantificar el número de CS, las células en el medio de control se analizan utilizando anticuerpos anti-proteína S100.

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

1.5. Incubación y actividad de fármacos

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

Estos experimentos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

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

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

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

10 El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de 3 compuestos de ensayo (+/-baclofeno, naltrexona y sorbitol) y la Mezcla 7 (una mezcla de estos 3 fármacos) sobre el proceso de mielinización. El efecto de los 3 compuestos de ensayo y su mezcla sobre la mielinización se evalúa evaluando la expresión de la proteína básica de mielina (MBP) en presencia de ácido ascórbico.

2.1 Materiales y métodos

Las ratas hembras embarazadas de 15 de gestación se mueren por dislocación cervical. Los embriones se eliminan del útero y están en una etapa de desarrollo fetal similar.

15 2.1.1 Genotipado

Un trozo de cada cabeza de embrión (3 mm³) se coloca en un tubo de 2 mL libre de ADNasa. El ADN se extrae con el kit de PCR de tejido SYBR Green Extract-N-Amp (Sigma, ref XNATG-1KT). Se colocaron ciento veinte µL de solución de extracción (Kit Sigma, ref. XNATG-1KT) sobre cada trozo de cabeza de embrión. Las cabezas se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al final de esta incubación, las cabezas se incuban durante 5 minutos a 95°C en la solución de extracción. Inmediatamente después de esta última incubación, se añaden 100 µL de solución neutralizante, cada extracto de ADN se diluye a 1/40 con agua ultrapura estéril (Biosolve, ref: 91589) y se conserva a +4°C hasta el uso. El genotipado de embriones hembra (H) y macho (M) se realiza durante la disección del GRD, con el kit Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem, 4385612). El sexo de cada embrión se determina utilizando el gen SRY macho. Los cebadores de SRY son suministrados por Pharnext (SRY-F (SEQ ID NO: 9): 5'-GAGAGAGGCACAAGTTGGC-3'; SRY-R (SEQ ID NO: 10): 5'-GCCTCCTGGAAAAAGGGCC-3'). Los cebadores de SRY se diluyen a 3 µM en agua ultrapura estéril (Biosolve, ref: 91589). Se prepara una mezcla para PCR con agua ultrapura (4 µL por muestra), cebador a 3 µM (2 µL por muestra) y mezcla maestra (10 µL por muestra). En una placa de 96 pocillos de PCR, se depositan 16 µL de mezcla de PCR en cada pocillo. Se añaden cuatro µL de cada ADN diluido según un depósito plano. La PCR se ejecuta utilizando el sistema 7500 fast RT-PCR (Applied Biosystem), con el siguiente programa:

Comienzo: 95°C-20 seg

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

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

- 35 Los resultados para cada muestra se comparan con el control negativo (agua ultrapura) y con el control positivo (TG/Macho y WT/Hembra), para concluir sobre el genotipo de cada embrión.

2.1.2 Co-cultivos de neuronas sensoriales y de células de Schwann

Se cultivan ganglios de la raíz dorsal de rata como han descrito anteriormente Cosgaya et al. 2002 y Rangaraju et al. 2008.

Cada embrión se dispone en una placa de Petri con numeración (35 mm de diámetro). Se corta la cabeza de embrión, se coloca en un tubo de 1,5 mL libre de ADNasa; el ADN se extrae con el kit de tejido Extract-N-Amp Tissue (Sigma Aldrich). El genotipado (macho (M) y hembra (H), tipo salvaje y PMP22 transgénico) se realiza con el kit Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem). Este genotipado se realiza en paralelo a la disección de los ganglios de la raíz dorsal (GRD), de manera que al final de la disección, solo se hace un tipo de cultivo (GRD de macho transgénico). Se recoge el GRD de cada embrión, se coloca en medio de Leibovitz enfriado con hielo (L15, Invitrogen). Al final de la disección, los GRD de TGM se unen y disocian mediante tripsinización (tripsina EDTA, 0,05%; Invitrogen) durante 20 minutos a 37°C. La reacción se detiene mediante la adición de DMEM que contiene 10% de suero fetal bovino (FBS) en presencia de ADNasa I (Roche). La suspensión se tritura con una pipeta de 10 mL. Luego, las células se centrifugan a 350 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de células disociadas se resuspende en medio neurobasal (Invitrogen) que contiene 2% de B27 (Invitrogen), 1% de penicilina-estreptomicina (Invitrogen), 1% de L glutamina y 50 ng/mL de FCN (Sigma). Este medio es el medio neuronal. Se cuentan las células viables en un citómetro de Neubauer utilizando el ensayo de exclusión con azul de tripano (Sigma) y se siembran en base a 10 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos (Greiner) tratadas con poli-L-lisina. Las placas se mantienen a 37°C en una incubadora humidificada, en una atmósfera de aire (95%)-CO₂ (5%). La mitad del medio de cultivo neuronal estándar se cambia cada dos días. Los cultivos se mantienen en medio neurobasal estándar durante 7 días para permitir que las células de Schwann pueblen las neuritas de las neuronas sensoriales. El día 7, los cultivos se alimentan con medio neuronal estándar complementado o no con 50 µg/mL de ácido ascórbico para iniciar la formación y mielinización de la lámina basal.

2.1.3. Incubación de fármacos

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

- (RS)-baclofeno
- naltrexona
- D-sorbitol
- Mezcla 7=la combinación de los 3 compuestos individuales.

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

		Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	Dosis 4	Dosis 5	Dosis 6	Dosis 7
Fármacos individuales	naltrexona	5 µM	1 µM	200 nM	40 nM	8 nM	1,6 nM	320 pM
	D-sorbitol	500 µM	100 µM	20 µM	4 µM	800 nM	160 nM	32 nM
	(RS)-baclofeno	5 µM	1 µM	200 nM	40 nM	8 nM	1,6 nM	320 pM
Mezcla 7	naltrexona	5 µM	1 µM	200 nM	40 nM	8 nM	1,6 nM	320 pM
	D-sorbitol	500 µM	100 µM	20 µM	4 µM	800 nM	160 nM	32 nM
	(RS)-baclofeno	5 µM	1 µM	200 nM	40 nM	8 nM	1,6 nM	320 pM

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

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

2.1.4 Protocolo de tinción

Después de 5, 9, 10, 11 y 13 días de incubación, las células se fijan por una solución fría de etanol (95%) y ácido acético (5%) durante 10 minutos. Las células se permeabilizan y se bloquean con PBS que contiene 0,1% de saponina

y 10% de suero de cabra durante 15 minutos. Luego, las células se incuban con un marcador específico de mielina: el anticuerpo policlonal anti-proteína básica de mielina (MBP) (Sigma 118K0431).

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

2.1.5. Procesamiento de datos

Por pocillo, se toman 20 imágenes utilizando InCell Analyzer™ 1000 (GE Healthcare) con un aumento de 20x. Todas las imágenes se toman en las mismas condiciones. El análisis de la longitud total de axones mielinizados se hizo automáticamente (longitud y área alrededor de los axones) utilizando el software Developer (GE Healthcare). Todos los valores se expresarán como media \pm e.e. de la media. Los análisis estadísticos se hacen en diferentes condiciones (ANOVA seguido del ensayo PLSD de Fisher cuando se permita).

2.2. Resultados

Efecto sinérgico de fármacos en la eficacia de la Mezcla 7

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

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

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

C. Experimentos in vivo en el modelo animal de CMT

Ensayamos los compuestos para el efecto terapéutico en un modelo de rata.

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

Las ratas se tratan crónicamente con fármacos, alimentación forzada o se inyectan por la bomba subcutánea osmótica Alzet (DURECT Corporation Cupertino, CA), dependiendo de la biodisponibilidad de cada fármaco durante 3 o 6 semanas. En todos los experimentos in vivo realizados, la Mezcla 7 se administra por sonda.

Los animales se pesan dos veces a la semana para ajustar las dosis al peso corporal en crecimiento. Si se elige la bomba osmótica para la administración del tratamiento, las dosis del fármaco se calculan en base al peso corporal medio estimado de los animales que se espera para su edad durante el período de duración de la bomba (6 semanas). Las bombas se vuelven a implantar si es necesario, con el protocolo de anestesia apropiado.

Ensayos de comportamiento

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

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

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

Se procesan dos experimentos sucesivos que miden la fuerza de las patas delanteras y dos experimentos sucesivos que miden la fuerza de las patas traseras por animal; solo se observa la puntuación máxima (una para las patas delanteras y otra para las patas traseras) (en N).

El ensayo de la barra

- 5 El ensayo de la barra evalúa la capacidad de las ratas para sujetarse en una barra fija. Las ratas con Pmp22 que muestran debilidad muscular presentan un déficit de rendimiento en este ensayo (Sereda et al, 1996). La rata se coloca sobre sus cuatro patas en el centro de la barra (diámetro: 2,5 cm; longitud: 50 cm; 30 cm por encima de la mesa). Los experimentos se realizan consecutivamente; el número y la duración de los experimentos en nuestros experimentos han estado dependiendo de los lotes de los animales. Se ha introducido esta variabilidad en el ensayo para determinar el programa apropiado para la mejor detección de la deficiencia motora en las ratas con CMT en el transcurso de los experimentos.

Los índices de rendimiento se registran en cada sesión:

- El número de experimentos necesarios para mantenerse durante 60 seg (o 30 seg para el lote 1, sesiones 1 y 2) sobre la barra.
- 15 • El tiempo pasado sobre la barra (es decir, la latencia a la caída) en cada experimento y el promedio en la sesión. En los procedimientos experimentales donde la sesión finaliza después de que la rata ha permanecido durante un tiempo de corte, es decir, 30 o 60 s, sobre la barra, se asigna un rendimiento del tiempo de corte (30 s o 60 s) a los experimentos no completados (p. ej.: para el lote 8, para un animal que permanece sobre la barra menos de 10 seg en los experimentos 1, 2 y 3, luego durante 60 seg en los experimentos 4 y 5, se asignan 60 s a los experimentos 6 a 10).
- 20 • El número de caídas.

Evaluación general de salud

Se monitorizaron durante el experimento los pesos corporales, signos evidentes (aspecto del pelaje, postura corporal, andares, temblor, etc.) de los animales. La escala de calificación se utiliza para registrar: 0=normal, 1=anormal.

25 Los andares

Cada rata se observa en una nueva jaula para ratas (dimensiones 55 x 33 x 18 cm) sin arena durante cinco minutos. Se evalúan los andares de las ratas con 4 parámetros:

- Puntuación 0: andares normales (fluido)
- Puntuación 1: andares anormales (no fluido o la rata tiene una leve cojera)
- 30 • Puntuación 2: incapacidad moderada (la rata arrastra una pata y puede ponerla recta y caminar)
- Puntuación 3: incapacidad grave (la rata arrastra sus patas traseras o ambas, pero no puede ponerlas rectas).

Ensayo del plano inclinado

- 35 El aparato de deslizamiento tenía un plano de Plexiglás de 30 x 50 cm que se podía inclinar a un ángulo desde 0° (horizontal) hasta 60°. Cada rata se colocó inicialmente sobre el plano inclinado en ángulo de 25° en la posición cabeza hacia arriba (orientación cabeza hacia arriba); se realizan dos experimentos separados durante 1 min. 30 minutos después, se realiza el mismo experimento en un plano inclinado en ángulo de 35°, luego en un plano inclinado en ángulo de 40°. Durante este tiempo la rata se devolvió a su jaula. El plano se limpia después de cada experimento.

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

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

Ensayos adicionales

- 45 Cuando sea apropiado, las ratas se someten a evaluación electrofisiológica, medición histológica y se cuantifica el nivel de expresión del ARN de pmp22 en el nervio ciático.

Cuantificación del ARN de pmp22 en el nervio ciático por RT-PCR cuantitativa

El ARN total se aisló de los nervios ciáticos izquierdos utilizando Qiazol (ref. N° 79306, Qiagen GmbH, Alemania) seguido por el método de purificación de una sola etapa con el RNeasy Mini Kit (ref. N° 74106, Qiagen GmbH, Alemania) descrito por el protocolo del fabricante (Qiagen-RNeasy Fibrous tissue Handbook). La contaminación de ADN se eliminó mediante digestión con ADNasa I libre de ARNasa utilizando el kit libre de ADN (Qiagen-Rnase-free DNase set 1500 Kunits, ref N° 1023460).

Se estiman las concentraciones de ARN por NanoDrop ND-1000 y se hizo un ensayo de control de calidad por Agilent RNA 6000 nano chips en el bioanalizador Agilent 2100.

Transcripción inversa y PCR en tiempo real: se realizó la RT-PCR cuantitativa (RT-Q-PCR) como sigue: se transcribieron 80 ng de ARN total de forma inversa utilizando la transcriptasa inversa SuperScript™ II (Invitrogen, Carlsbad, CA) con Oligo(dT)12-18 (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen de reacción de 20 µL.

Se realizó la PCR en tiempo real con un sistema de termociclador rápido (LightCycler® 480 II, 384-Well, Roche, Suiza). Las amplificaciones se realizan en un volumen total de 10 µL con concentración de cebadores optimizada entre 130 nM y 1 µM. Los cebadores y el molde se complementan con LightCycler® 480 SYBR Green I Master (2× conc. Roche, Cat. Ref. N° 04 887 352 001). Los nucleótidos, MgCl₂, ADN polimerasa de Taq y el tampón están incluidos en la mezcla. Un protocolo de amplificación incorporó una incubación inicial a 95° C durante 10 minutos para la activación de la ADN polimerasa de Taq seguido de 45 ciclos, con una desnaturalización de 95°C durante 10 segundos, recocado a 60°C durante 40 segundos y extensión a 72°C durante 10 segundos (la detección del producto fluorescente se realizó al final del período de extensión a 72°C mediante un modo de adquisición sencillo) y finalizó mediante un ciclo de curva de fusión con desnaturalización a 95°C durante 5 segundos, recocado a 63°C durante 60 segundos y 95°C (desde 63°C hasta 95°C, la tasa de rampa es 0,11 °C/s y la detección del producto fluorescente fue continua). Para confirmar la especificidad de la amplificación, el producto de PCR de cada par de cebadores se sometió a un análisis de curvas de fusión. La cuantificación relativa se realizó basándose en el punto de cruce (valor Cp) para cada una de las muestras de la PCR. El punto al que la fluorescencia de una muestra sube por encima de la fluorescencia de fondo se denomina "punto de cruce (Cp)" de la muestra. Se utilizó el gen de la proteína cero de la mielina (MPZ) de *Rattus norvegicus* para la normalización (Sereda et al. 2006). Las secuencias de los cebadores (sintetizadas por Eurofins MWG Operon, Alemania) utilizadas para el análisis RT-Q-PCR son:

PMP22-delantero: 5'-TG TACCACATCCGCCTTGG-3' (SEQ ID NO: 11) y

PMP22-inverso: 5'-GAGCTGGCAGAAGAAGAACAGGAAC-3' (SEQ ID NO: 12).

MPZ-delantero: 5'-TGTTGCTGCTGTTGCTCTTC-3' (SEQ ID NO: 13) y

MPZ-inverso: 5'-TTGTGAAATTTCCCTTCTCC-3' (SEQ ID NO: 14).

Resultados

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

La Mezcla 1 mejora la puntuación de los andares de las ratas transgénicas después de 3 y 6 semanas de tratamiento como se muestra en la figura 5.

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

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

La Mezcla 7 (dosis 3) disminuye significativamente la expresión de ARN del gen pmp22 en el nervio ciático de ratas transgénicas con pmp22 (Figura 9).

Los rendimientos de las ratas con pmp22 tratadas con la Mezcla 7 (dosis 2 y dosis 3) se mejoran en el ensayo de plano inclinado a 35° (Figura 10). Más específicamente, el 29 y el 33% de las ratas pertenecen al grupo de buen rendimiento, en comparación con el 5% para el grupo TG con placebo y el 29 y el 11% de las ratas pertenecen al grupo de bajo rendimiento en comparación con el 60% para el grupo TG con placebo. El valor de p (frente a las TG con placebo) es igual a 0,0152 para las ratas TG tratadas con la dosis 2 de la Mezcla 7 y el valor de p es igual a 0,002 para las ratas TG tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7 (frente a las TG con placebo).

La dosis 3 de la Mezcla 7 aumenta significativamente el tiempo de latencia a la caída de ratas con pmp22 en el ensayo de la barra después de 9 semanas de tratamiento (Figura 11): línea discontinua negra, $p=4,56 \cdot 10^{-2}$, $n=18$. También se observa una diferencia significativa entre ratas TG con placebo (línea sencilla negra, $n=20$) y ratas WT con placebo (línea sencilla gris, $p=3,82 \cdot 10^{-7}$, $n=18$).

La Figura 12 ilustra la mejora de la fuerza de agarre de las ratas con pmp22 tratadas con la dosis 3 de la Mezcla 7.

La Figura 13 muestra la correlación significativa entre el tiempo de latencia en el ensayo de la barra (después de 9 semanas de tratamiento con la dosis 3 de la Mezcla 7) y el nivel de expresión de ARN de pmp22.

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

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

Tabla 3

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

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

- 10 D. Efecto in vivo en un modelo de neuropatía tóxica

Los tratamientos o regímenes con fármacos se administran por vía oral desde el día anterior a la primera inyección intraperitoneal de 3 mg/kg de oxaliplatino (D-1) hasta el día anterior al último día de ensayo (D16). A los animales que pertenecen al grupo tratado con oxaliplatino se les administra diariamente agua destilada (10 mL/kg). A los animales se les administra el tratamiento ensayado y agua destilada diariamente durante la mañana, mientras que el oxaliplatino se administra por la tarde.

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

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

- 25 El ensayo se hace utilizando el ensayo de la acetona 2 horas después de la administración de la referencia. La sustancia de referencia es gabapentina, 100 mg/kg, per os (una vez al día x 4 días de ensayo).

Ensayo de la acetona

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

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

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

Fuente de gabapentina: Zhejiang Chiral Medicine Chemicals, China

Fuente de oxaliplatino: Sigma, Francia

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

E. Efecto in vivo en un modelo de ELA

5 Modelo animal

Hemos elegido el modelo de rata SOD1^{G93A} (generado por Howland et al) para imitar la patología de la esclerosis lateral amiotrófica. Este modelo sobreexpresa el gen SOD1 mutado en la médula espinal, en muchas regiones cerebrales así como en tejidos periféricos. El inicio de la enfermedad de la neurona motora de este modelo es aproximadamente a los 115 días; aparece como los andares anormales de la extremidad trasera. En pocos días, surge la parálisis de la extremidad trasera.

10

Procedimientos experimentales

Obtuvimos colonias cruzando ratas SOD1^{G93A} reproductoras con ratas hembra Sprague Dawley. Las ratas SOD1^{G93A} heterocigóticas se identifican con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN de la cola con cebadores específicos para hSOD1 [1]. Los animales se mantienen en una sala con iluminación (luces encendidas entre las 05:00 y 19:00 h) y temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) controladas, y se les da libre acceso a alimento y agua. Todos los procedimientos con animales en el presente estudio se llevan a cabo de acuerdo con las pautas estándares de cuidado de animales.

15

La medición del peso corporal se realizó cada semana y los ensayos de comportamiento comenzaron a una edad de 60 días y continuaron hasta el punto final. Los tratamientos se administran cada día por vía oral o subcutánea a partir de la edad de 5 semanas.

20 1. Ensayo de observación: caracterización del aspecto general

Cada rata se observó en una nueva jaula para ratas (dimensiones 55 x 33 x 18 cm) sin arena durante cinco minutos. Se registran cinco parámetros diferentes:

Los andares

- puntuación 0: andares normales (fluido)
- puntuación 1: andares anormales (no fluido o la rata tiene una leve cojera)
- puntuación 2: incapacidad moderada (la rata arrastra una pata y puede ponerla recta y caminar)
- puntuación 3: incapacidad grave (la rata arrastra sus patas traseras o ambas, pero no puede ponerlas rectas)

25

El aspecto del pelaje

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

30

El temblor

- puntuación 0: sin temblor
- puntuación 1: temblor

La posición del cuerpo

- puntuación 0: normal
- puntuación 1: anormal (aplanado o arqueando la espalda)

35

La posición de las patas traseras

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

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

Este ensayo evalúa la capacidad de las ratas para enderezarse dentro de los 30 seg de haber sido giradas sobre cualquier lado (reflejo de enderezamiento) (Gale et al.).

Se utilizó un sistema de puntuación no paramétrico siguiendo estos criterios (Matsumoto et al. Thonhoff et al.):

- puntuación 0: la rata no puede enderezarse por sí misma desde cualquier lado dentro de los 30 seg
- puntuación 1: la rata no puede enderezarse por sí misma desde solo un lado dentro de los 30 seg
- 5 •puntuación 2: la rata puede enderezarse por sí misma desde ambos lados dentro de los 30 seg pero no puede mantenerse de pie en la jaula; siempre está arrastrando algunas partes del cuerpo
- puntuación 3: la rata puede enderezarse por sí misma desde ambos lados dentro de los 30 seg, no puede mantenerse de pie en la jaula pero no está arrastrando ninguna parte del cuerpo
- puntuación 4: la rata puede enderezarse por sí misma desde ambos lados dentro de los 30 seg, puede mantenerse de pie en la jaula pero tiene déficits funcionales visibles
- 10 •puntuación 5: la rata puede enderezarse por sí misma desde ambos lados dentro de los 30 seg, puede mantenerse de pie en la jaula y sin déficits funcionales visibles.

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

3. Ensayo del plano inclinado: caracterización del déficit motor

- 15 El aparato de deslizamiento tenía un plano de plexiglás de 30 x 50 cm que se podía inclinar a un ángulo desde 0° (horizontal) hasta 60°. Se colocó cada rata inicialmente sobre el plano inclinado en ángulo de 25° en la posición cabeza hacia arriba (orientación cabeza hacia arriba); se realizan dos experimentos separados por 1 min. 30 minutos después, se realiza el mismo experimento en un plano inclinado en ángulo de 35°, luego en un plano inclinado en ángulo de 40°. Durante este tiempo la rata se devolvió a su jaula. El plano se limpia después de cada experimento.

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

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

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

- 25 Se colocó una malla de alambre en contacto con una caja en la parte superior (a un ángulo de 70°) y el borde de una mesa en la parte inferior. Cada rata se colocó en la parte inferior de la malla de alambre y se motivó a ascender colocando a sus compañeros de camada en la caja en la parte superior. Cada rata se entrenó una vez a la semana (3 experimentos).

El parámetro registrado fue el tiempo de latencia para alcanzar la parte superior de la malla de alambre.

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

La actividad locomotora se midió en una caja de Plexiglás (45 x 45 x 30 cm, Acti-Track de BIOSEB, Lyon, Francia) con 16 rayos de fotocélulas siguiendo los dos ejes, 1 y 5 cm por encima del suelo.

- 35 Se evaluó la actividad espontánea y exploratoria de cada rata durante 3 horas. Se registran 4 parámetros (la distancia total recorrida, el número de retrocesos, el porcentaje de distancia recorrida y el tiempo pasado en el centro del campo abierto).

F. Efecto in vivo en un modelo de traumatismos neuronales mecánicos: aplastamiento del nervio ciático

- 40 El aplastamiento del nervio ciático es ampliamente aceptado como un modelo válido para la evaluación de la regeneración nerviosa. En este modelo, el daño nervioso da como resultado una interrupción rápida de la función nerviosa, como lo demuestra la medida de los potenciales de acción muscular evocados (CMAP) generados a través de la estimulación del nervio ciático lesionado.

La lesión nerviosa se caracteriza por una conducción nerviosa más baja de la señal que da como resultado en una latencia aumentada en la generación del CMAP y en un potencial de fuerza de acción deteriorado dando como resultado una amplitud y duración disminuidas. Esto da como resultado una marcada disfunción de los andares.

1. Aplastamiento nervioso

- 45 Los ratones CD-1 (Charles River, animales no enfermos) se anestesiaron utilizando isoflurano (2,5-3% en aire). Se afeitó el muslo derecho y se expuso el nervio ciático a la mitad del muslo y se aplastó (5 mm proximal a la bifurcación

del nervio ciático) durante 10 segundos dos veces con microforceps (Holtex, P35311) con una rotación de 90° entre cada aplastamiento. Para los animales operados sham, se expusieron los nervios ciáticos pero no se aplastaron. Finalmente, se aseguró la incisión de la piel con clips para heridas. La primera administración de la dosis 3 de la Mezcla 7 se realizó 30 minutos después del aplastamiento. Se realizó la administración desde el día 1 hasta el día 42, una vez al día. En los días de ensayo, los ratones se trataron (10 mL/kg) 1,5 h antes del registro del CMAP. Para los experimentos de soporte de peso, a los animales se les administró la Mezcla 7, baclofeno 600 µg/kg, naltrexona 70 µg/kg, D-sorbitol 21 mg/kg y el ensayo se realizó el día 13.

2. Medidas electrofisiológicas

Se realizaron los registros electrofisiológicos 30 días después del aplastamiento utilizando un electromiógrafo Keypoint (EMG) (Medtronic, Francia). Se anestesiaron los ratones con isoflurano al 2,5-3% y se utilizaron electrodos de aguja monopolares subcutáneos tanto para la estimulación como el registro. Se administraron pulsos de ondas cuadradas supramaximales (12,8 mA) de 0,2 ms para estimular el nervio ciático (lado proximal del aplastamiento). Se estimuló el nervio ciático derecho (ipsilateral) con un pulso único aplicado en la muesca ciática. Se registró el CMAP mediante electrodos de aguja colocados en el músculo gastrocnemio. Se determinó la amplitud (µV) del potencial de acción, que refleja el nivel de denervación y reinervación de los músculos (Figura 15, panel A).

3. Análisis morfométricos

Cuarenta y dos días después del aplastamiento, se extrajo el nervio tibial de 6 ratones por grupo (descrito anteriormente) para realizar un análisis morfométrico como sigue: se obtuvo una imagen compuesta de la sección nerviosa completa de cada muestra utilizando un microscopio óptico (Nikon optiphot-2) equipado con una cámara digital (Nikon DS-Fil). Se realizaron los análisis morfométricos con imágenes digitales utilizando el software Image-Pro Plus (Media Cybernetics Inc., EE. UU.), que calcula los tamaños de píxel axonal y de mielina después de la individualización de cada fibra mielinizada a través del nivel de gris de la vaina de mielina teñida de azul de toluidina. Esto permitió la determinación del calibre del axón (Figura 15, panel B) y la relación G, que es la relación entre el diámetro axonal interno y el diámetro externo de la fibra neuronal (es decir, espesor axón + mielina). El equilibrio entre la relación g y el diámetro del axón es indicativo de la mielinización de las neuronas (Figura 15, panel C).

4. Extremidad trasera, soporte de peso

Se evaluó la distribución de peso de los animales (ratones CD1) en las cuatro extremidades el día 13 utilizando el ensayo de soporte dinámico de peso (BioSeb, Francia). Este ensayo de discapacidad consiste en una medición continua de todos los puntos de presión aplicados por un animal que se mueve libremente, lo que permite una evaluación cuantitativa del desequilibrio de peso causado por la lesión nerviosa. Se colocó cada ratón en una jaula de 11 x 11 x 22 cm con una red de células de sensor de 44 x 44 en el suelo. La presión aplicada en las células de sensor por las patas de los animales se registró a una frecuencia de 10 Hz durante un período de 5 minutos. Se determinaron los umbrales de detección de presión y superficie automáticamente para cada animal mediante el software Dynamic Weight bearing 1.3.2 h (Bioseb, Francia). Después de la atribución manual de cada punto de presión a la pata correspondiente, se calculó el peso medio aplicado en cada pata para la relación de superficie. Se evaluó finalmente la disfunción unilateral de los andares a través del peso de la pata trasera ipsi/contralateral y la relación de superficie (Figura 17, panel A).

5. Resultados

Se observa una mejora significativa de la amplitud de CMAP (alrededor del 84%, Figura 15, panel A) en comparación con los animales aplastados no tratados y esto tan pronto como a las 3 semanas de tratamiento, mostrando así una restauración funcional acelerada de los nervios. El análisis morfométrico también muestra un aumento significativo del calibre del axón (alrededor del 30% después de 6 semanas de tratamiento, Figura 15, panel B), que es la firma de la promoción del crecimiento nervioso. Tal mejora en las características morfológicas y electrofisiológicas de los nervios caracteriza una regeneración nerviosa que se desencadena por la mezcla 7.

También se observa una normalización de la mielinización del axón tras el tratamiento con la composición de la invención. Un estado de mielinización normal se caracteriza por una mielinización casi uniforme de los axones, que se caracteriza por una relación G constante independientemente del diámetro del axón (Figura 15, panel C, línea horizontal negra). La lesión nerviosa por un aplastamiento, como se ha mencionado anteriormente, da como resultado una alteración significativa de la mielinización de los axones. Cuarenta y dos días desde un aplastamiento, se observa una hipermielinización de axones pequeños (diámetro bajo) junto con una hipomielinización de axones grandes en comparación con los animales sham; que da como resultado una correlación positiva entre la relación G y el diámetro del axón (Figura 15, panel C, línea punteada negra con una pendiente positiva).

Tras el tratamiento con la Mezcla 7, se observa una normalización de la mielinización del axón 42 días desde el aplastamiento (Figura 15, panel C, línea gris) que se ilustra mediante una distribución de la relación G según el diámetro del axón que muestra una pendiente intermedia en comparación con el animales sham (línea negra) y animales aplastados no tratados (línea negra punteada).

Estos resultados subrayan el alto potencial de las composiciones de la invención para mejorar y/o acelerar la recuperación de un traumatismo neuronal, actuando sobre las vainas de mielina (para las neuronas mielinizadas) o las funciones electrofisiológicas y/o la integridad de los axones.

5 Como se muestra en la Figura 17 (panel B), la Mezcla 7 también es eficaz para restaurar el comportamiento funcional de los ratones aplastados, mientras que los fármacos por sí solos no muestran ningún efecto sobre la discapacidad motora inducida por el aplastamiento nervioso (paneles C, D, E), lo que subraya así la eficacia particular de la terapia de combinación baclofeno-sorbitol-naltrexona.

Por lo tanto, las composiciones de la invención son particularmente eficientes para corregir lesiones nerviosas a través de la promoción de la regeneración nerviosa.

10 G. Efecto in vivo de la composición de la invención evaluada en un experimento clínico

Los efectos positivos de las composiciones de la invención sobre la enfermedad de CMT fueron experimentos clínicos confirmados registrados como EudraCT 2010-023097-40 y como NCT10401257 en la base de datos ClinicalTrials.gov. Este experimento fue de un año, un estudio doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo de fase 2.

15 El objetivo principal del estudio era evaluar la seguridad y la tolerabilidad de la Mezcla 7 en pacientes que padecen la enfermedad de CMT. Los objetivos secundarios apuntaban a un análisis exploratorio de la eficacia de la Mezcla 7 para ser utilizada para la organización de estudios adicionales en pacientes.

1. Métodos

Pacientes, aleatorización y cegamiento

20 Se evaluaron los sujetos potencialmente elegibles en las visitas de detección que incluyeron notablemente la confirmación del genotipo CMT1A, que registra la puntuación de la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth (CMTNS, Shy et al. 2005), escala de limitaciones generales de neuropatía (ONLS, Graham et al. 2006) para determinar el diagnóstico de CMT1A.

25 Los pacientes femeninos y masculinos, de entre 18 y 65 años, diagnosticados con CMT1A según el análisis clínico y la confirmación por genotipado, con debilidad en al menos la dorsiflexión del pie y una puntuación de la neuropatía de Charcot Marie Tooth (CMTNS) de ≤ 20 se asignaron aleatoriamente en una proporción 1:1:1:1 para recibir diariamente durante un año Placebo o la Mezcla 7 ((RS)-baclofeno: 6 mg/día, naltrexona: 0,7 mg/día, D-sorbitol: 210 mg/día). Se utilizó un esquema de aleatorización por bloques, estratificado por centro de estudio. Todos los investigadores y pacientes desconocían la distribución del tratamiento.

Seguridad, tolerabilidad, cumplimiento

30 La seguridad de la mezcla durante el estudio que incluye la visita de seguimiento 1 mes después del último día de la administración de la Mezcla 7, se monitorizó en base a los informes de eventos adversos de los pacientes y los ensayos de laboratorio. El cumplimiento se monitorizó en cada visita (1, 3, 9 y 12 meses) mediante el conteo de botellas vacías devueltas y la medición del volumen. La duración media (DE) en general de la exposición fue de 11,69 (1,53) meses y fue similar entre los grupos, y el cumplimiento medio (DE) con el fármaco del estudio fue del 97,3 (9,41)%.

Ensayos de electrofisiología

Se realizaron los estudios de conducción nerviosa utilizando técnicas estándar a una temperatura de la piel de 32°C. Se analizaron tanto las funciones sensoriales como las motoras en los nervios mediano y cubital de la extremidad superior no dominante.

40 Para los parámetros motores (amplitud del potencial de acción muscular compuesta (CMAP, en milivoltios) y latencia motora distal (DML, en milisegundos)), se estimuló el nervio mediano en la muñeca, la fosa antecubital y se registraron las respuestas sobre el abductor pollicis brevis. Se estimuló el nervio cubital en la muñeca y debajo del codo, y se registraron las respuestas sobre el abductor digiti minimi.

45 Para los parámetros sensoriales (amplitud del potencial de acción del nervio sensorial (SNAP, en milivoltios) y la velocidad de conducción sensorial (SCV, en metros por segundo)), se utilizó un método antidrómico y se estimularon los nervios mediante electrodos de anillo colocados en la muñeca. Para el nervio mediano, el electrodo activo se colocó en la base del segundo dedo y el electrodo de referencia entre los metacarpianos cuarto y el quinto del segundo dedo. Para el nervio cubital, el electrodo activo se colocó en la base del quinto dedo y el electrodo de referencia entre los metacarpianos cuarto y el quinto del quinto dedo.

50 La puntuación de la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth (CMTNS)

La CMTNS fue propuesta y validada por Shy et al (2005) para proporcionar una medida única y confiable de la gravedad de CMT²². Actualmente es la única medida de resultado específico de CMT (aunque no específico de

5 CMT1A). La CMTNS es una escala de 36 puntos basada en 9 ítems que comprende 5 de deterioro (síntomas sensoriales, sensibilidad al pinchar, vibración, fuerza de brazos y piernas), 2 de limitaciones de actividad (síntomas motores de brazos y piernas) y 2 de electrofisiología (amplitudes del CMAP cubital y del SNAP). Las puntuaciones más altas indican un empeoramiento de la función, y la puntuación clasifica la discapacidad como leve (0-10), moderada (11-20) y severa (21-36).

La escala de limitaciones generales de neuropatía (ONLS)

10 La ONLS se obtuvo y mejoró de la ODSS por Graham y Hughes (2006) para medir las limitaciones en las actividades cotidianas de las extremidades superiores (valoradas en 5 puntos) y las extremidades inferiores (valoradas en 7 puntos)²³. La puntuación total va desde 0 (=sin discapacidad) a 12 (=discapacidad máxima). Aunque el funcionamiento de los pacientes con neuropatía periférica puede estar influenciado por otros factores además de su capacidad física, la ONLS mide la capacidad percibida del paciente para moverse y realizar la vida normal, y por consiguiente se espera que esté asociado con la calidad de vida.

Análisis estadísticos

15 Los análisis estadísticos se realizaron con R versión 3.0.1 o posterior (<http://cran.r-project.org>). Se evaluaron de forma preliminar la distribución de datos y la variación dentro del grupo para guiar las variedades metodológicas (Markowski et al. 1990; Sawilowski y Blair; Vickers, 2005). Asumiendo datos como Missing At Random (MAR, Little & Rubin, 2002), la imputación de datos perdidos se realizó mediante un enfoque de modelo mixto considerado la técnica más adecuada para intentar tratar estudios longitudinales (Chakraborty & Gu, 2009). Se compararon los resultados sin imputación de datos perdidos para fines de sensibilidad. Los ensayos estadísticos se llevaron a cabo a un nivel de significancia del 20 5%.

Análisis poblacional

Se llevaron a cabo todos los análisis en el conjunto de análisis completo en un intento de tratar la base, incluyendo todos los pacientes aleatorizados que se sabe que tomaron al menos una dosis de la Mezcla 7 y proporcionaron al menos una medición de la eficacia post-basal.

25 Análisis basal

Las características de los pacientes al inicio se compararon descriptivamente entre los grupos y se ensayaron mediante el ensayo exacto de Fisher o el análisis de varianza (ANOVA).

Análisis de seguridad y tolerabilidad

30 Los análisis de seguridad y tolerabilidad se basaron en los eventos adversos emergentes del tratamiento descritos y otra información de seguridad (ensayos de laboratorio, signos vitales y ECG). La incidencia de eventos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) se comparó descriptivamente entre los grupos y se probó mediante un ensayo exacto de Fisher.

Análisis de la eficacia

35 Se evaluaron las diferencias entre los grupos mediante el análisis de covarianza (ANCOVA) en valores transformados logarítmicamente ajustando para los valores de referencia. Las estimaciones se proporcionaron como cambio porcentual medio sobre el valor de referencia. Este análisis se realizó de forma independiente en los diferentes resultados de eficacia. Debido a la multiplicidad de resultados, la importancia del efecto del tratamiento en los dos resultados principales CMTNS y ONLS se ensayó mediante el ensayo de OLS de O'Brien (O'Brien, 1984; Logan & Tamhane, 2006). Este análisis se repitió para los otros resultados de eficacia (DML, SCV). Se definieron los pacientes 40 que respondieron a la terapia como pacientes que no empeoraron durante el tratamiento de 12 meses. El deterioro se evaluó por el porcentaje de cambio del valor de referencia promediado sobre la CMTNS y la ONLS. Se compararon las proporciones de pacientes que respondieron en cada grupo utilizando un modelo de regresión logística. Se dedujeron los riesgos relativos de las 36 estimaciones Odds-Ratio. Los ensayos estadísticos para el análisis de eficacia fueron de una cola. El enfoque de una cola se justificó sobre motivos clínicos (la hipótesis nociva poco probable tanto 45 en eficacia como en seguridad debido a las dosis extremadamente bajas de compuestos utilizados comercialmente en dosis mucho más altas) y la eficiencia estadística (Lewis et al. 2013; Parikh et al. 2011; De Jager et al. 2010).

2. Resultados

Seguridad y tolerabilidad.

50 Los resultados de seguridad y tolerabilidad de la Mezcla 7 fueron buenos, ya que la toma del tratamiento no indicó ninguna influencia en los resultados de los signos vitales (presión arterial, frecuencia cardíaca y peso), las mediciones del electrocardiograma y las anomalías de laboratorio (bioquímica y hematología). No hubo diferencias significativas en la incidencia de eventos adversos emergentes del tratamiento entre el grupo con placebo y la Mezcla 7 (47% y 31%, respectivamente). Además, la mayoría de los eventos adversos emergentes del tratamiento fueron leves y benignos.

Eficacia

El tratamiento con la Mezcla 7 conduce a una mejora en la CMTNS (Tabla 4, tendencia, $P < 0,20$) en comparación con el grupo con placebo. La puntuación de la ONLS también mejoró en el grupo de la Mezcla 7 en comparación con el placebo (Tabla 4, mejora del 14,4%, $P < 0,05$). De hecho, mientras que la puntuación ONLS disminuyó en el placebo después de un año (Figura 16, línea discontinua), aumentó significativamente en el grupo tratado con la Mezcla 7 (Figura 16, línea continua). La mejora en las puntuaciones de la condición global del paciente se confirma al considerar la mejora de la CMTNS y la ONLS en el grupo de la Mezcla 7 en comparación con el placebo, a través de la significancia de OLS de O'Brien ($P < 0,05$).

De manera interesante, la función de la mielina también mostró una mejora en el grupo de la Mezcla 7 en comparación con el placebo según lo evaluado por la velocidad de conducción sensorial y la latencia distal motora. La latencia motora distal (DML) disminuyó significativamente en el grupo de la Mezcla 7 en comparación con el placebo (Tabla 4, 8%, $P < 0,05$), y la velocidad de conducción sensorial (SCV) aumentó significativamente en el grupo de la Mezcla 7 en comparación con el placebo (Tabla 4, 26,6 %, $P < 0,001$). Estos resultados son consistentes con el impacto de la Mezcla 7 en las funciones de las células de Schwann y sostienen la eficiencia de las composiciones de la invención en la regeneración de las fibras nerviosas, como se observa en los estudios preclínicos in vitro e in vivo anteriores.

Tabla 4: Porcentaje medio de mejora, placebo versus tratamiento en cuatro ensayos (media \pm DE).

	% medio de mejora		
	Placebo n=19	Mezcla 7 n=19	Valor de P
CMTNS	2,6 \pm 17,5	7,7 \pm 18,4	0,16
ONLS	-5,3 \pm 19,3	12,3 \pm 28,4	0,043
DML (ms)	0,4 \pm 8,8	8,4 \pm 21,7	0,038
SCV (m/s)	3,4 \pm 11,0	30,5 \pm 10,0	0,00037

Finalmente, la proporción de pacientes que respondieron a la terapia, se definió como pacientes que no empeoraron durante el tratamiento de 12 meses, fue significativamente mayor en el grupo de la Mezcla 7 (79%, Riesgo relativo 1,66, $P = 0,01$).

Tabla 5: Placebo versus Mezcla 7, grupo de pacientes que respondieron. El número de pacientes es seguido por el porcentaje correspondiente entre paréntesis. El riesgo relativo es seguido por el rango del intervalo.

	Placebo n=19	Mezcla 7 n=19	Mezcla 7 versus Placebo	
			Riesgo relativo	Valor de P
Pacientes que respondieron	10 (52%)	15 (79%)	1,5 (1,03;1,77)	0,047

Al considerar las características basales (registradas al comienzo del estudio) entre pacientes que respondieron y pacientes que no respondieron, parece que los pacientes que respondieron fueron de forma global menos gravemente afectados por la enfermedad. No solo es útil para ralentizar la progresión de la enfermedad en pacientes en una etapa avanzada de la enfermedad, se podría esperar que las composiciones de la invención tengan un interés particular para ralentizar la enfermedad en pacientes débilmente afectados o en una etapa temprana de la enfermedad tal como los niños.

Bibliografía

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

- Amici SA, Dunn WA Jr, Notterpek L. Developmental abnormalities in the nerves of peripheral myelin protein 22-deficient mice. *J 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.
- 5 Basta-Kaim A, Budziszewska B, Jaworska-Feil L, Tetich M, Leśkiewicz M, Kubera M, Lason 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.
- 10 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.
- 15 Castellone MD, Teramoto H, Gutkind JS. Cyclooxygenase-2 and Colorectal Cancer Chemoprevention: The β -Catenin Connection. *Cancer Res.* 2006; 66(23):11085-11088.
- Chakraborty H. & Gu H. A mixed model approach for intent-to-treat analysis in longitudinal clinical trials with missing values. RTI Press Publ. MR-0009-09, (2009).
- 20 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.
- 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.
- 25 Constable AL, Armati PJ. DMSO induction of the leukotriene LTC₄ by Lewis rat Schwann cells. *J Neurol Sci* 1999; 162(2): 120-126.
- Cosgaya J. M., Chan J. R., Shooter E. M. The Neurotrophin Receptor p75NTR as a Positive Modulator of Myelination. *Science.* 2002; 298; 1245-1248.
- 30 De Jager J, Kooy A, Lehert P, Wulffelé MG, van der Kolk J, Bets D, Verburg J, Donker AJ, Stehouwer CD. Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. *BMJ* 340, c2181 (2010).
- Devaux JJ, Scherer SS. Altered ion channels in an animal model of Charcot-Marie-Tooth disease type IA. *J Neurosci.* 2005; 25(6): 1470-1480.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 Fortun J, Go JC, Li J, Amici SA, Dunn WA Jr, Notterpek L. Alterations in degradative pathways and protein aggregation in a neuropathy model based on PMP22 overexpression. *Neurobiol Dis.* 2006; 22(1):153-164.
- Fortun J, Verrier JD, Go JC, Madorsky I, Dunn WA, Notterpek L. The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of cytoplasmic chaperones. *Neurobiol Dis.* 2007; 25(2): 252-265.

- Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol*. 1985 Apr; 88(1):123-34.
- Galvez AS, Ulloa JA, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros LF, Lavandero S. Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis: differential effects of sorbitol and mannitol. *J Biol Chem*. 2003; 278(40):38484-38494.
- Graham RC & Hughes, RA. A modified peripheral neuropathy scale: the Overall Neuropathy Limitations Scale. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 77, 973-976 (2006).
- 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.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Feb 5; 99(3): 1604-9. Epub 2002 Jan 29.
- Kantamneni S, Corrêa SA, Hodgkinson GK, Meyer G, Vinh NN, Henley JM, Nishimune A. GISP: a novel brain-specific protein that promotes surface expression and function of GABA(B) receptors. *J Neurochem*. 2007;100(4):1003-17.
- Kirshblum SC, Burns SP, Biering-Sorensen F, Donovan W, Graves DE, Jha A, Johansen M, Jones L, Krassioukov A, Mulcahey MJ, Schmidt-Read M, Waring W. *The Journal of Spinal Cord Medicine* 2011; 34 (6):535-46.
- Khajavi M, Shiga K, Wiszniewski W, He F, Shaw CA, Yan J, Wensel TG, Snipes GJ, Lupski JR. Oral curcumin mitigates the clinical and neuropathologic phenotype of the Trembler-J mouse: a potential therapy for inherited neuropathy. *Am J Hum Genet*. 2007; 81(3): 438-453.
- Kobsar I, Hasenpusch-Theil K, Wessig C, Müller HW, Martini R. Evidence for Macrophage-Mediated Myelin Disruption in an Animal Model for Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 1A. *J. Neurosci Res* 2005; 81:857-864.
- Lange CA, Shen T et al. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *PNAS USA*. 2000; 97: 1032-1037.
- Le-Niculescu H, Kurian SM, Yehyaw N, Dike C, Patel SD, Edenberg HJ, Tsuang MT, Salomon DR, Nurnberger JI Jr, Niculescu AB. Identifying blood biomarkers for mood disorders using convergent functional genomics. *Mol Psychiatry*. 2008 Feb 26. [Epub ahead of print].
- Lewis RA, McDermott MP, Herrmann DN, Hoke A, Clawson LL, Siskind C, Feely SM, Miller LJ, Barohn RJ, Smith P, Luebke E, Wu X, Shy ME; Muscle Study Group. High-Dosage Ascorbic Acid Treatment in Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A: Results of a Randomized, Double-Masked, Controlled Trial. *JAMA Neurol*. 70, 981-7 (2013).
- 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.
- Little RJA & Rubin DB. *Statistical Analysis with Missing Data*. 408 (Wiley-Interscience, 2002).
- Logan BR & Tamhane AC. On O' Brien 's OLS and GLS tests for multiple endpoints. *Lect. Notes-Monograph Ser.* 47, 76-88 (2006).
- 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.
- Markowski CA & Markowski EP. Conditions for the Effectiveness of a Preliminary Test of Variance. *Am. Stat.* 44, 322-326 (1990).
- Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Okano H. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res*. 2006 Jan; 83(1):119-33.
- Mäurer M, Kobsar I, Berghoff M, Schmid CD, Carenini S, Martini R. Role of immune cells in animal models for inherited neuropathies: facts and visions. *J Anat*. 2002; 200(4): 405-414.
- Melcangi RC, Cavarretta IT, Ballabio M, Leonelli E, Schenone A, Azcoitia I, Miguel Garcia-Segura L, Magnaghi V. Peripheral nerves: a target for the action of neuroactive steroids. *Brain Res Rev*. 2005; 48(2): 328-338.
- Mercier G, Turque N, Schumacher M. Rapid effects of triiodothyronine on immediate-early gene expression in Schwann cells. *Glia*. 2001; 35(2):81-89.

- Meyer Zu Horste G., Nave K-A. Animal models of inherited neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.* 2006; 19(5): 464-473.
- Meyer zu Horste G, Prukop T, Liebetanz D, Mobius W, Nave KA, Sereda MW. Antiprogestosterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Ann Neurol.* 2007; 61 (1): 61-72.
- 5 Miller AL, Garza AS, Johnson BH, Thompson EB. Pathway interactions between MAPKs, mTOR, PKA, and the glucocorticoid receptor in lymphoid cells. *Cancer Cell Int.* 2007; 28:7:3
- Muja N, Blackman SC, Le Breton GC, DeVries GH. Identification and functional characterization of thromboxane A2 receptors in Schwann cells. *J Neurochem.* 2001; 78(3):446-456.
- Muller DL, Unterwald EM. In vivo Regulation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase (ERK) and Protein Kinase B (Akt) Phosphorylation by Acute and Chronic Morphine. *JPET* 2004; 310:774-782.
- 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 O'Brien P. Procedures for Comparing Samples with Multiple Endpoints. *Biometrics* 40, 1079-1087 (1984).
- 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.
- 25 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.
- Parikh PM, Vaid A, Advani SH, Digumarti R, Madhavan J, Nag S, Bapna A, Sekhon JS, Patil S, Ismail PM, Wang Y, Varadhachary A, Zhu J, Malik R. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study of single-agent oral talactoferrin in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer that progressed after chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 29, 4129-36 (2011).
- 30 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.
- 35 Rangaraju S, Madorsky I, Pileggi JG, Kamal A, Notterpek L. Pharmacological induction of the heat shock response improves myelination in a neuropathic model. *Neurobiology of Disease.* 2008; 32(105-115).
- Roa BB, Garcia CA, Suter U, Kulpa DA, Wise CA, Mueller J, Welcher AA, Snipes GJ, Shooter EM, Patel PI, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med.* 1993; 329(2): 96-101.
- 40 Robaglia-Schlupp A, Pizant J, Norreel JC, Passage E, Saberan-Djoneidi D, Ansaldi JL, Vinay L, Figarella-Branger D, Levy N, Clarac F, Cau P, Pellissier JF, Fontes M. PMP22 overexpression causes dysmyelination in mice. *Brain* 2002; 125(Pt 10): 2213-2221.
- 45 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.
- 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.
- Sawilowsky SS. & Blair RC. A more realistic look at the robustness and Type II error properties of the t test to departures from population normality. *Psychological Bulletin* 1992; 111(2): 352-360.
- 5 Schumacher M, Guennoun R, Mercier G, Désarnaud F, Lacor P, Bénavides J, Ferzaz B, Robert F, Baulieu EE. Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. *Brain Res Rev.* 2001; 37(1-3): 343-359.
- Sereda MW, Meyer zu Horste G, Suter U, et al. Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med* 2003; 9: 1533-1537.
- 10 Sereda MW, Nave KA. Animal models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A). *Neuromol Med* 2006; 8: 205-215.
- Shy ME, Blake J, Krajewski K, Fuerst DR, Laura M, Hahn AF, Li J, Lewis RA, Reilly M. Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability. *Neurology* 64, 1209-1214 (2005).
- 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.
- 15 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.
- Thonhoff JR, Jordan PM, Karam JR, Bassett BL, Wu P. Identification of early disease progression in an ALS rat model. *Neurosci Lett.* 2007 Mar 30; 415(3):264-8. Epub 2007 Jan 14.
- 20 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 17p 11.2 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 USA.* 2002; 99(1):483-488.
- 25 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.
- 30 Vallat JM, Sindou P, Preux PM, Tabaraud F, Milor AM, Couratier P, LeGuern E, Brice A. Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann Neurol.* 1996; 39(6): 813-817.
- Vickers AJ. Parametric versus non-parametric statistics in the analysis of randomized trials with non-normally distributed data. *BMC Med. Res. Methodol.* 5, 35 (2005).
- 35 Walter IB. Nuclear triiodothyronine receptor expression is regulated by axon-Schwann cell contact. *Neuroreport.* 1993; 5(2):137-140.
- Walter IB, Deruaz JP, de Tribolet N. Differential expression of triiodothyronine receptors in schwannoma and neurofibroma: role of Schwann cell-axon interaction. *Acta Neuropathol (Berl).* 1995; 90(2):142-149.
- Welch WJ, Brown CR. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones.* 1996;1(2):109-115.
- 40 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
- <120> Nuevas composiciones para tratar lesiones neuronales mecánicas
- 5 <130> B888PC02
- <140> US14/187,841
- <141> 24-02-2014
- 10 <160> 14
- <170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1
- <211> 17
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> cebador directo de PMP22 de rata
- <400> 1
- 25 gaaacgcga atgaggc 17
- <210> 2
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> cebador inverso de PMP22 de rata
- <400> 2
- 35 gttctgttg gtttgctt 19
- <210> 3
- <211> 17
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> cebador directo_RPL13A
- 45 <400> 3
- ctgcctcaa ggtgtg 17
- <210> 4
- <211> 21
- 50 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador inverso_RPL13A
- 55 <400> 4
- cttctcttc cgtaatga t 21
- <210> 5
- 60 <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>

<223> cebador directo_Pmp22-FL
 <400> 5
 gctctgagcg tgcataagggt ac 22
 5
 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> cebador directo_Rp113A-FL
 <400> 6
 15 tcgggtggaa gtaccagcc 19
 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso_Pmp22-rojo
 25 <400> 7
 agggaggag gaaggaaacc agaaa 25
 <210> 8
 <211> 28
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso_Rp113A-rojo
 35 <400> 8
 tgacagctac tctggaggag aaacggaa 28
 <210> 9
 40 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> SRY -Directo
 <400> 9
 gagagaggca caagttggc 19
 50 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> SRY - inverso
 <400> 10
 60 gcctcctgga aaaagggcc 19
 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 774 373 T3

<223> PMP22-directo
<400> 11
5 tgtaccacat cgccttgg 19
<210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10
<220>
<223> PMP22 - inverso
<400> 12
15 gagctggcag aagaacagga ac 22
<210> 13
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> MPZ - directo
25 <400> 13
tggtgctgct gttgcttctc 20
<210> 14
<211> 21
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> MPZ - inverso
35 <400> 14
ttgtgaaatt tccccttctc c 21

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende baclofeno, sorbitol y naltrexona, o sales, enantiómeros o racematos de los mismos, para uso en promover o mejorar la regeneración nerviosa en un sujeto que padece una neuropatía traumática o un traumatismo neuronal mecánico.
- 5 2. La composición para uso de la reivindicación 1, en donde la composición comprende baclofeno, D-sorbitol y naltrexona, o sales, enantiómeros o racematos de los mismos.
3. La composición para uso de la reivindicación 1 o 2, que comprende además un excipiente o vehículo farmacéuticamente adecuado.
- 10 4. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los compuestos se formulan con un polímero de elución de fármaco, una biomolécula, una micela 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.
5. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los compuestos se administran juntos o por separado, simultánea o secuencialmente.
- 15 6. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde mejorar la regeneración nerviosa comprende mejorar o acelerar la recuperación de dicho traumatismo neuronal o neuropatía traumática.
7. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde mejorar la regeneración nerviosa comprende mejorar la mielinización nerviosa o restaurar, al menos parcialmente, la morfología del axón, el crecimiento del axón o las funciones electrofisiológicas.
- 20 8. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el traumatismo neuronal mecánico es neurapraxia, axonotmesis o neurotmesis.
9. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el traumatismo neuronal mecánico consiste en lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal o una lesión mecánica de los nervios periféricos.

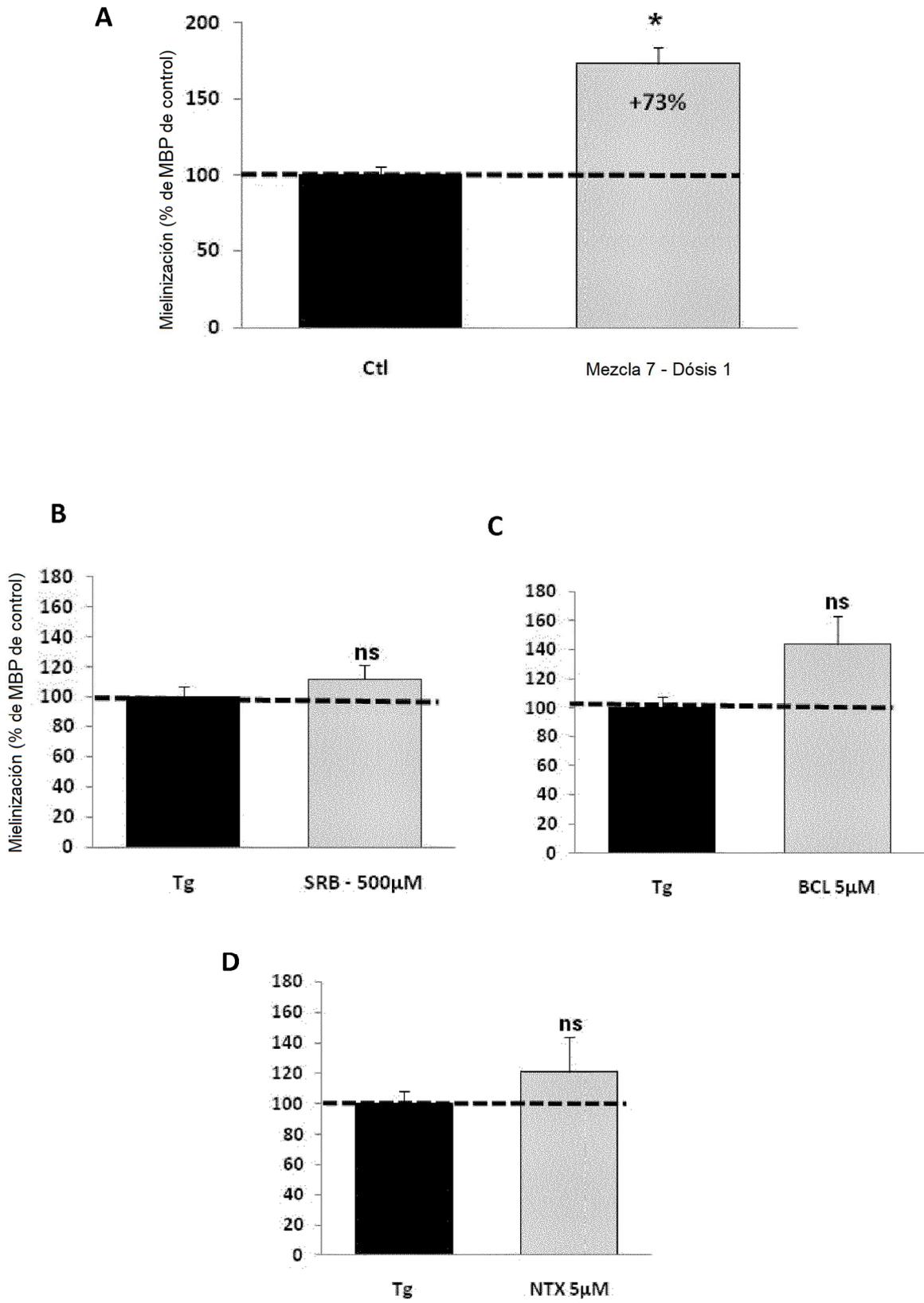


Figura 1

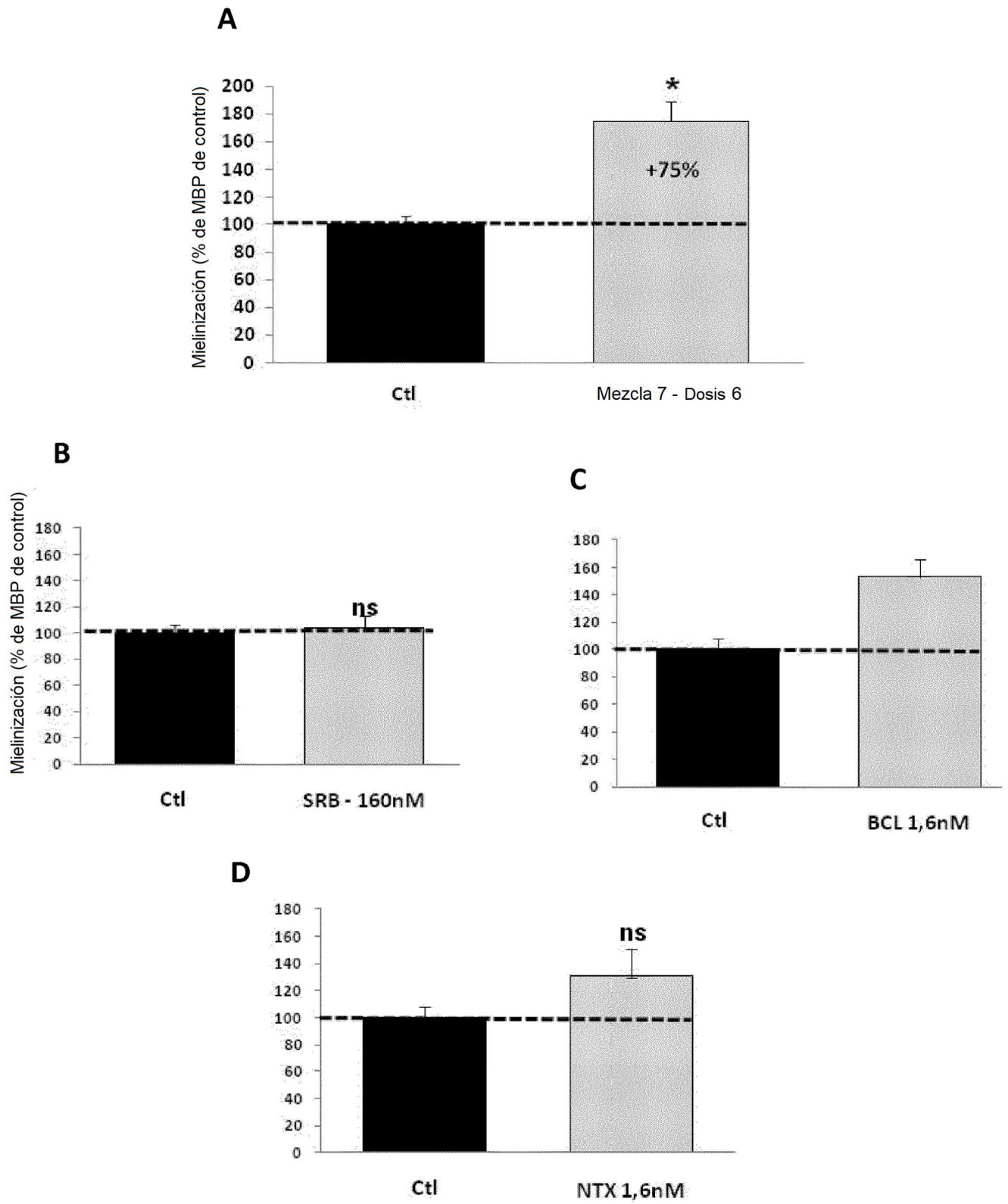


Figura 2

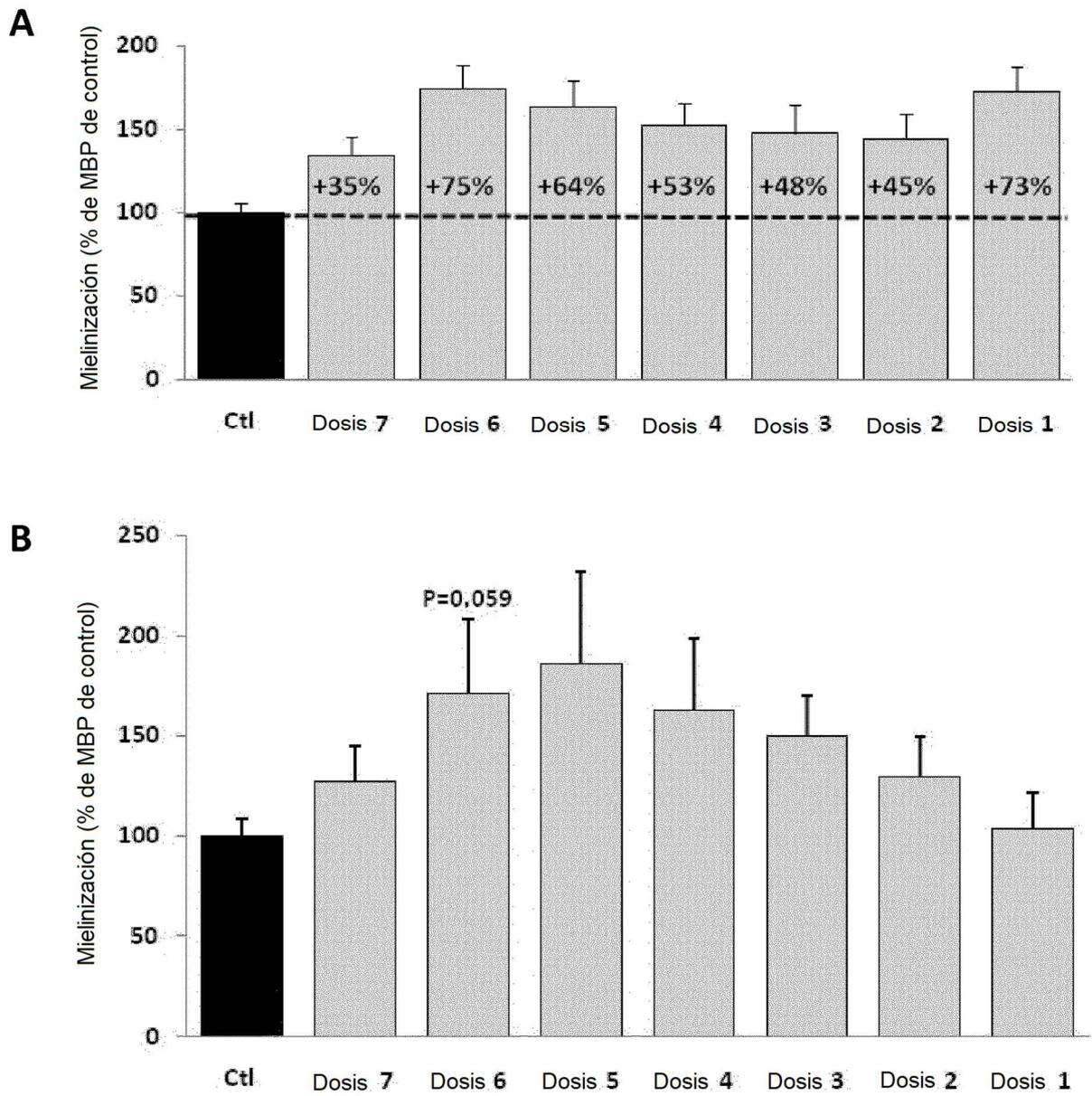


Figura 3

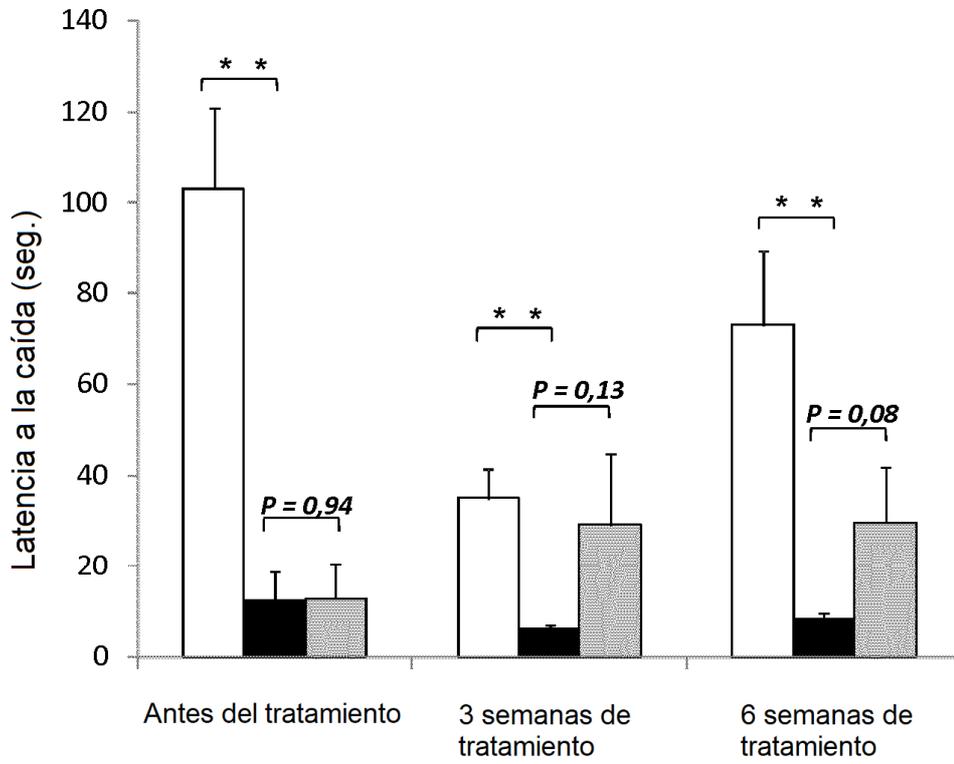


Figura 4

3 semanas de tratamiento - 10 semanas de edad

6 semanas de tratamiento - 13 semanas de edad

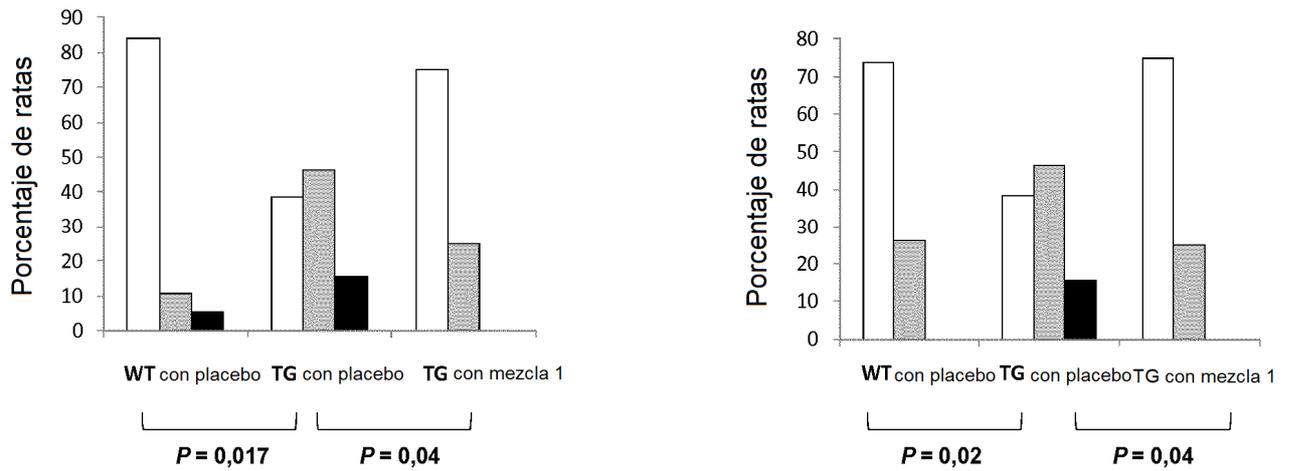


Figura 5

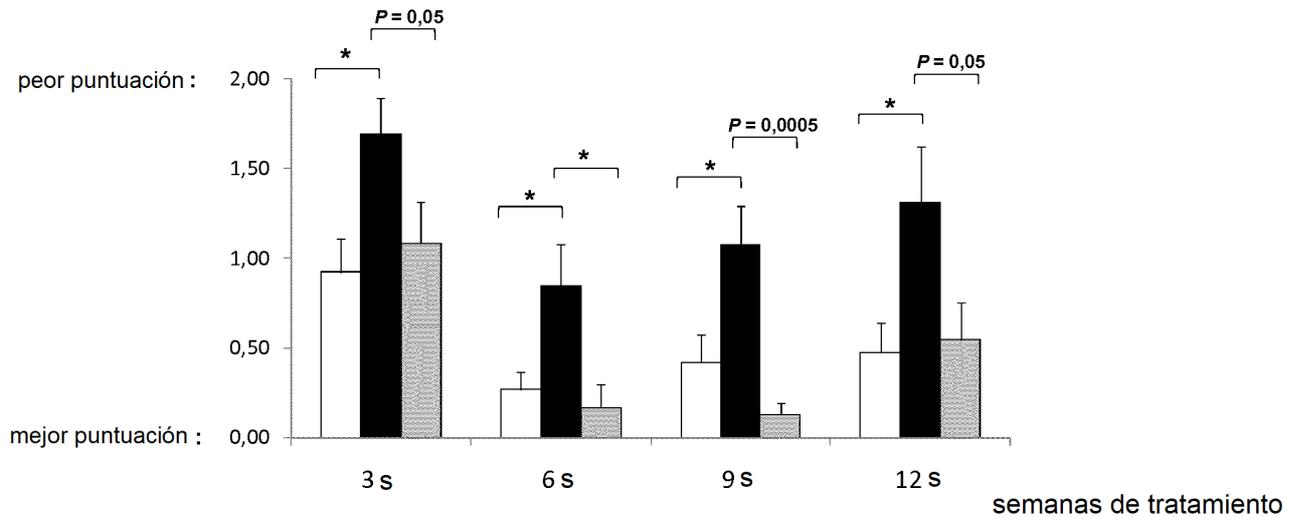


Figura 6

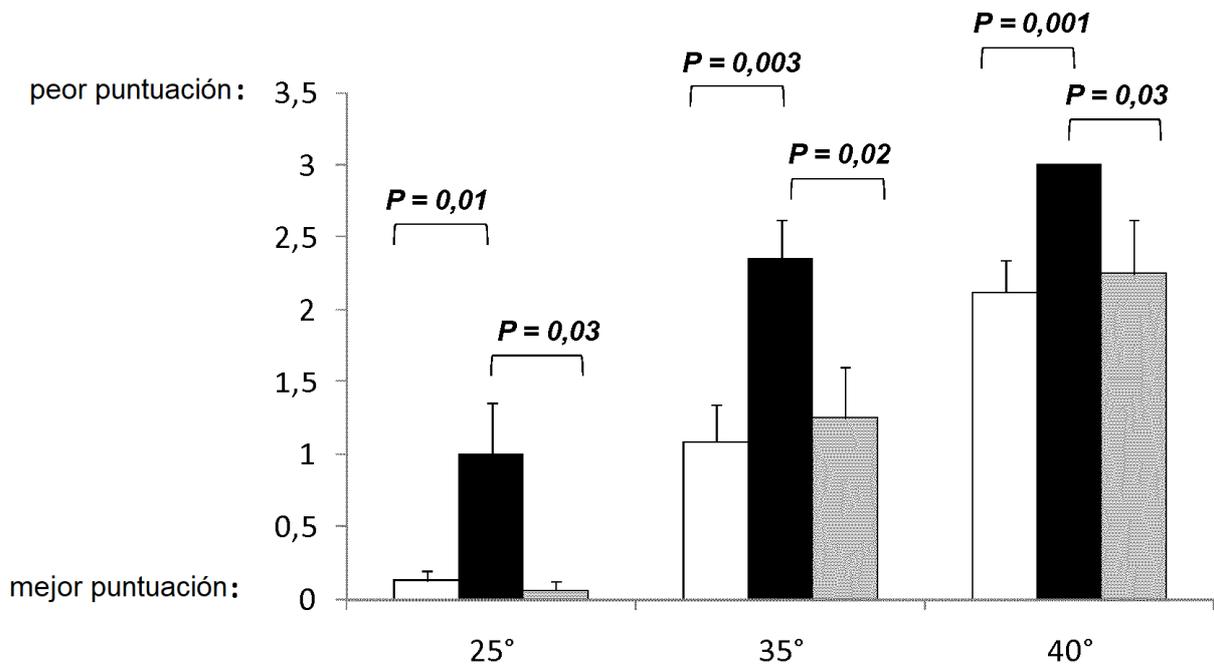


Figura 7

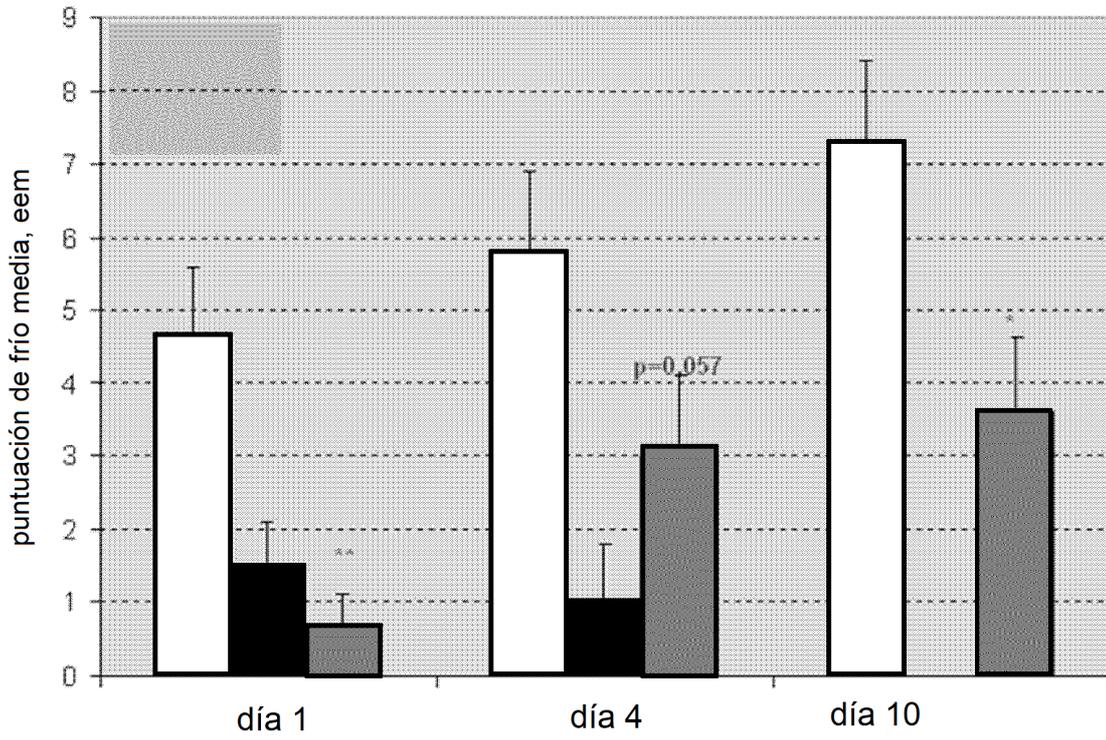


Figura 8

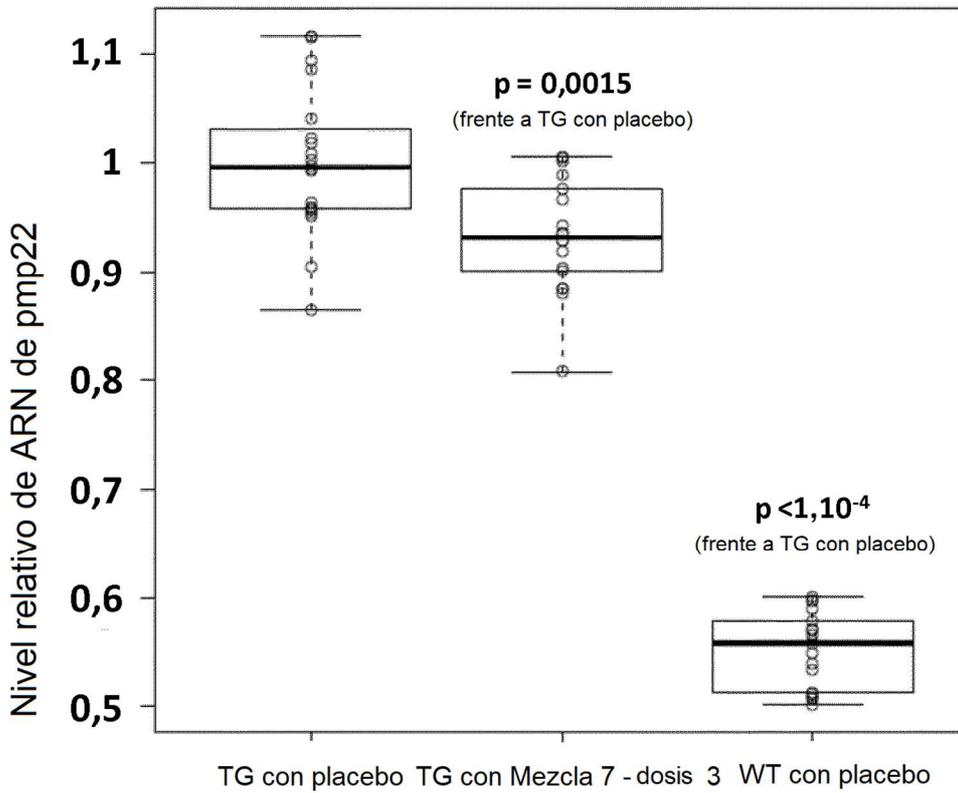


Figura 9

Grupos de rendimientos en el ensayo del plano inclinado

	Puntuación baja	Puntuación intermedia	Puntuación buena	Valor de p (frente a TG con placebo)
WT con placebo	11%	21%	68%	0,0003
TG con placebo	60%	35%	5%	-
Mezcla 7 - dosis 2	29%	41%	29%	0,0152
Mezcla 7 - dosis 3	11%	56%	33%	0,0020

Figura 10

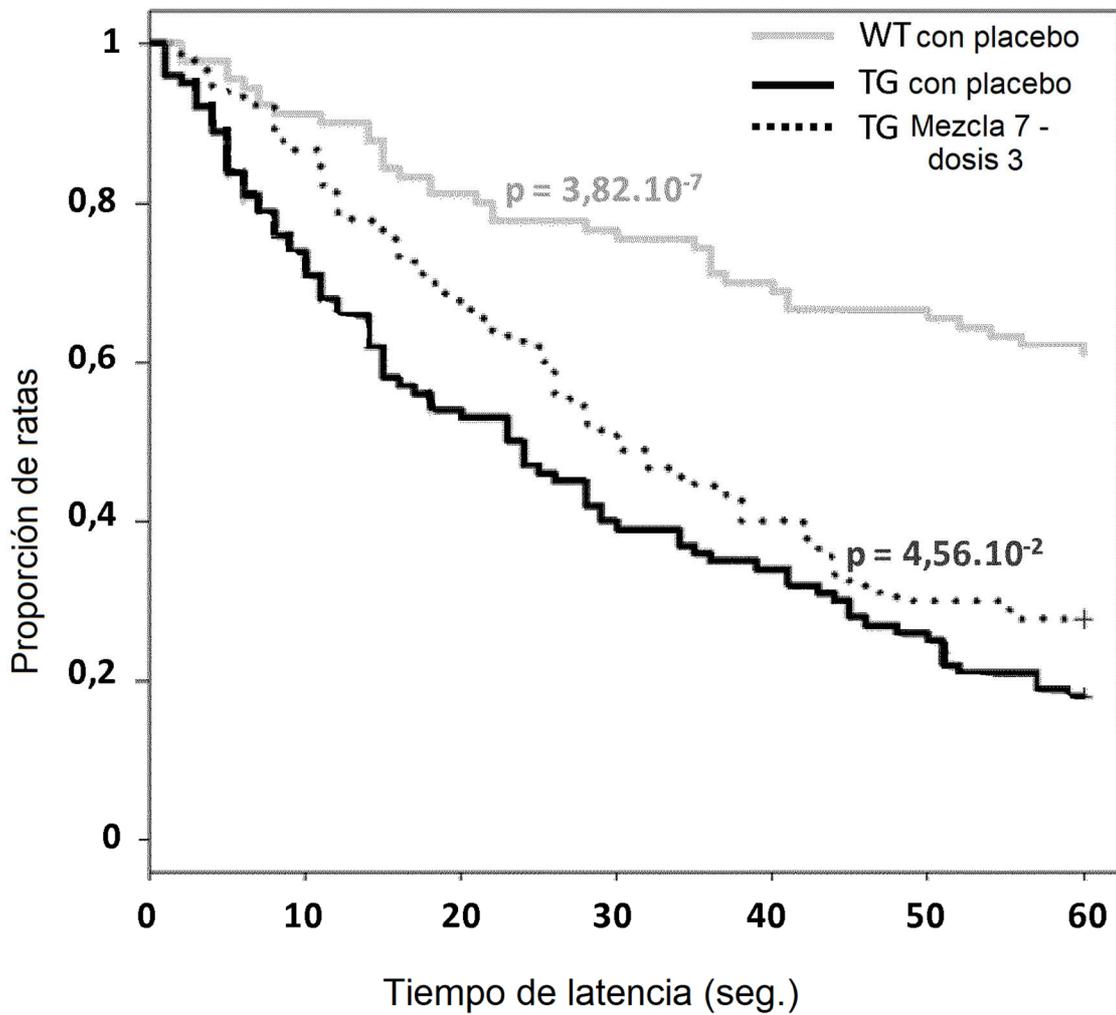


Figura 11

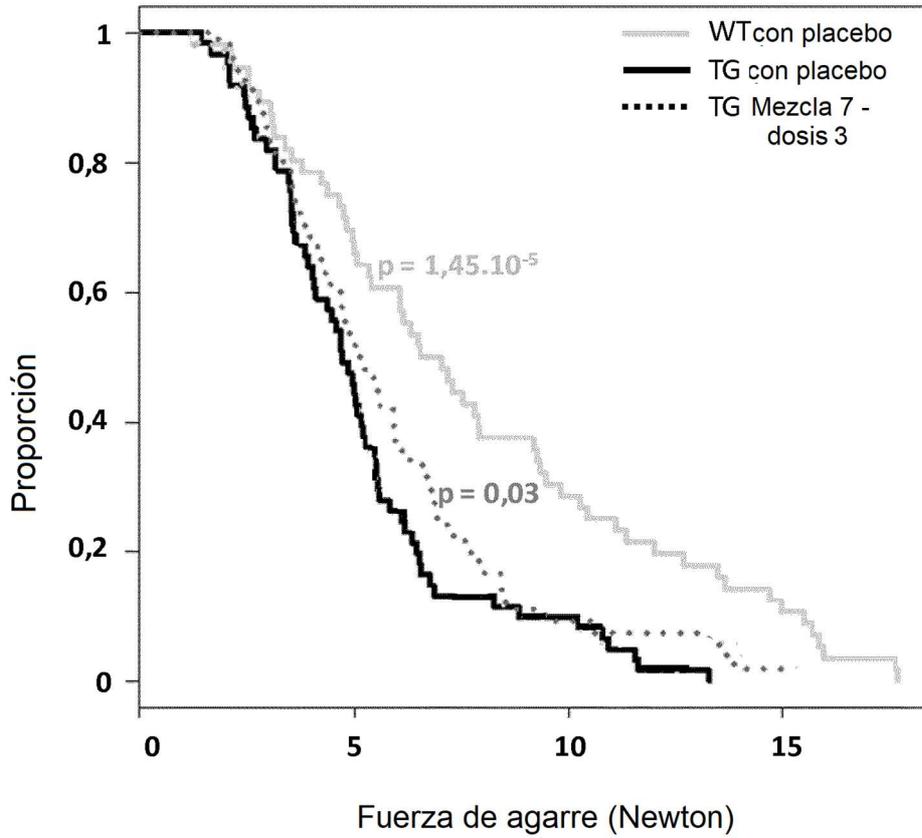


Figura 12

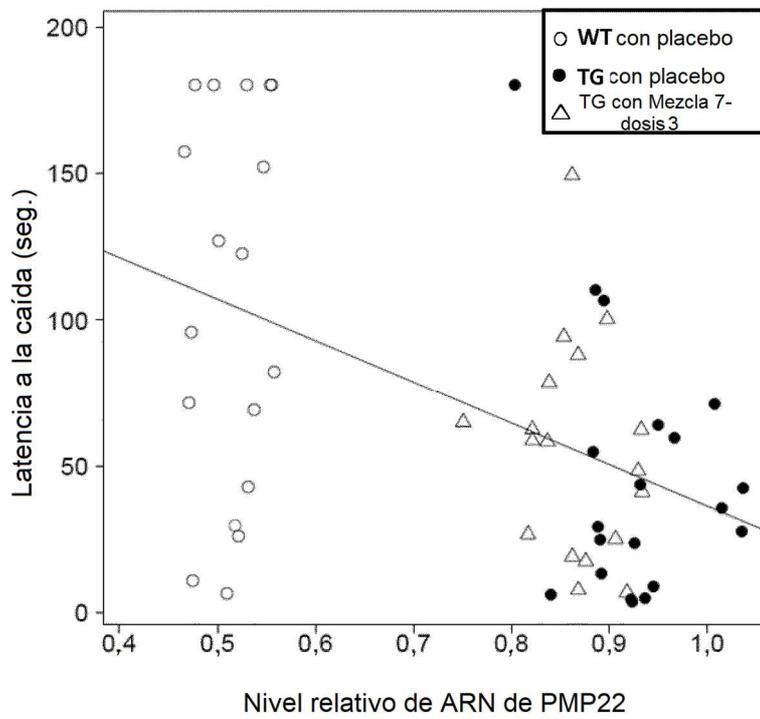


Figura 13

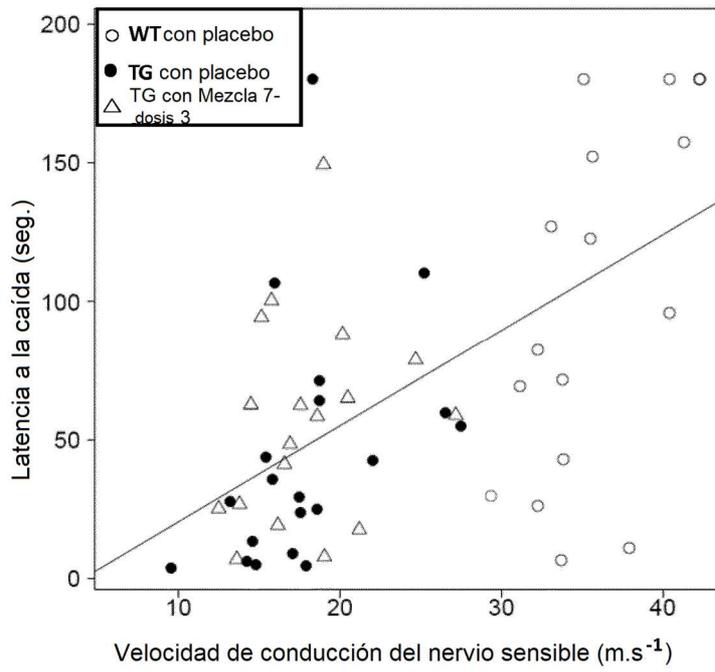


Figura 14

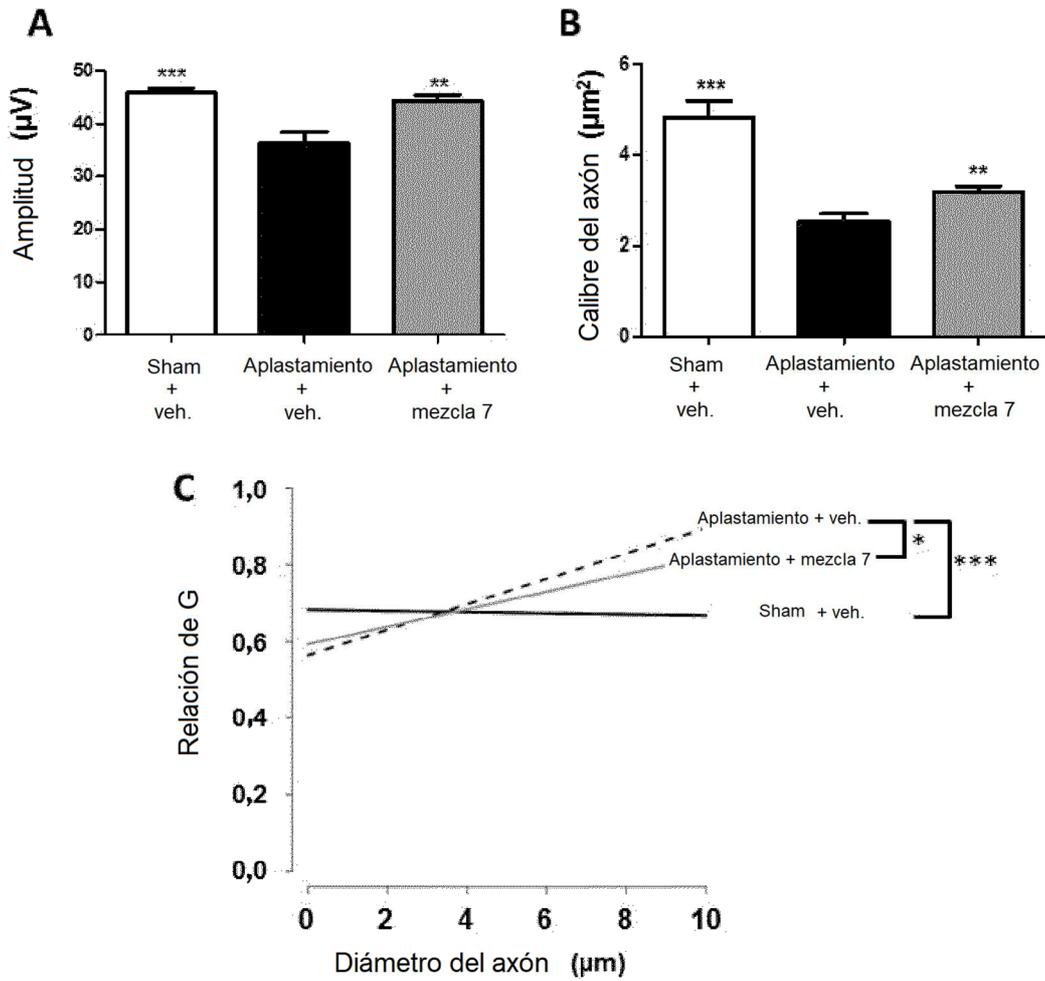


Figura 15

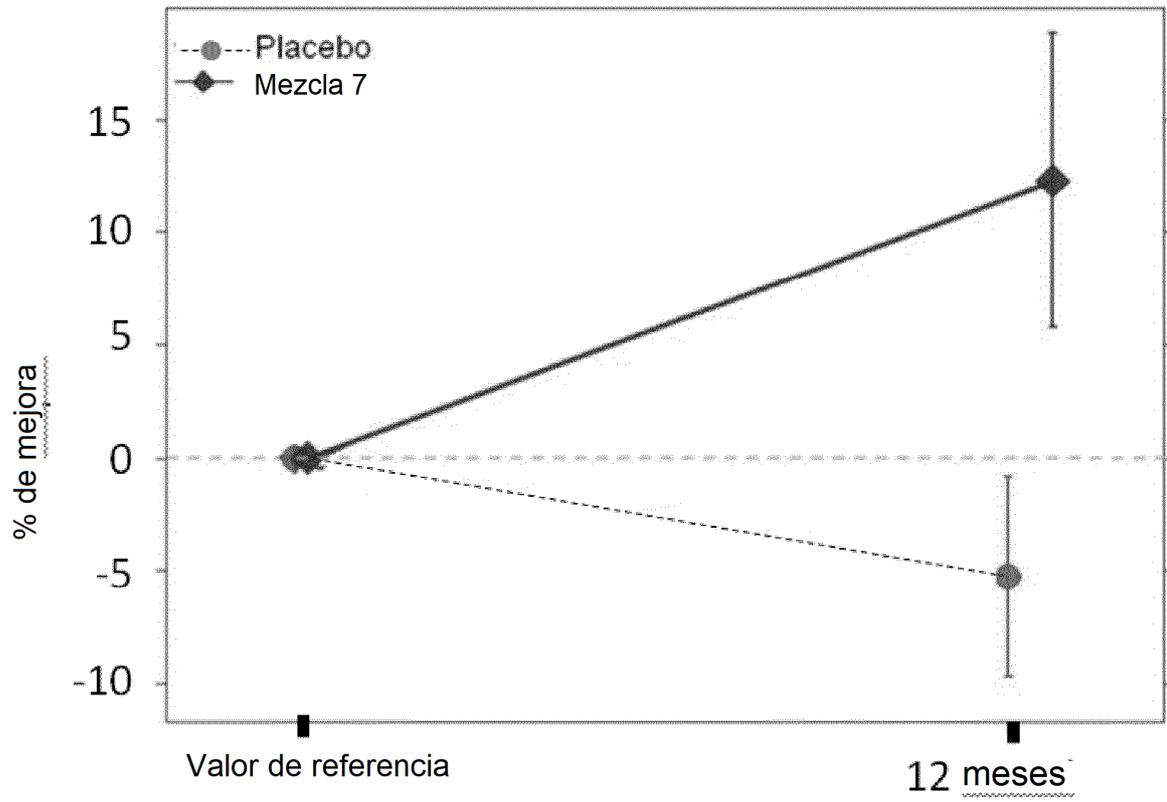


Figura 16

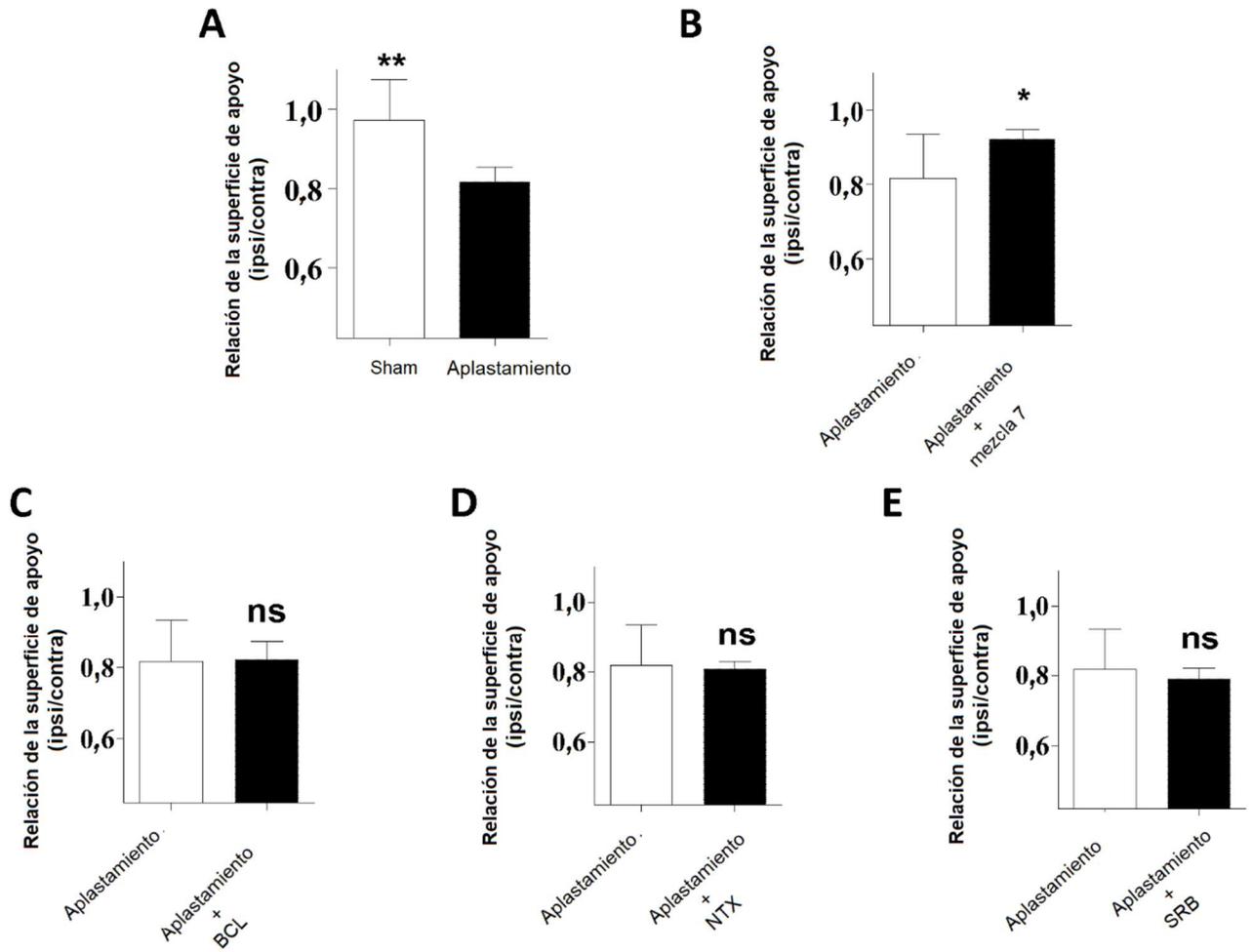


Figura 17