



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2307000 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/197 (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01)
A61K 31/4178 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.06.30
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.02.26
(86)	Europeisk søknadsnr	09765871.0
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.06.17
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.04.13
(30)	Prioritet	2008.06.18, EP, 08305280
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Pharnext, 11 Rue des Peupliers, 92130 Issy les Moulineaux, Frankrike
(72)	Oppfinner	COHEN, Daniel, 61 avenue des Courlis, F-78110 Le Vésinet, Frankrike CHUMAKOV, Ilya, 691 rue de la Noue, F-77000 Vaux Le Penil, Frankrike NABIROCHKIN, Serguei, 49 avenue de Sully Prud'homme, F-92290 Chatenay Malabry, Frankrike GUERASSIMENKO, Oxana, 22 rue de la Forêt, F-91490 Milly-la-foret, Frankrike CHOLET, Nathalie, 16C rue Charles Infroit, F-92190 Meudon, Frankrike
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Kombinasjon av pilokarpin og metimazol for behandling av Charcot- Marie-Tooth sykdom og relaterte lidelser
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 2 065 038 WO-A-00/20024 WO-A-2004/019938 WO-A-2009/068668 KELTNER J L ET AL: "Myotonic pupils in Charcot-Marie-Tooth disease. Successful relief of symptoms with 0.025% pilocarpine" ARCHIVES OF OPHTHALMOLOGY, XX, XX, vol. 93, no. 11, 1 January 1975 (1975-01-01), pages 1141-1148, XP008090277 ISSN: 0003-9950 BASSI S ET AL: "ENCEPHALO MYELITIS WITH THYRO TOXICOSIS" 1978, JOURNAL OF NEUROLOGY, VOL. 218, NR. 4, PAGE(S) 293-296 , XP009109119 ISSN: 0340-5354 the whole document COFFEY R J ET AL: "Familial trigeminal neuralgia and charcot-marie-tooth neuropathy - Report of two families and review" 1 January 1991 (1991-01-01), SURGICAL NEUROLOGY, LITTLE, BROWN AND CO., BOSTON, MA, US, PAGE(S) 49 - 53 , XP023144578 ISSN: 0090-3019 [retrieved on 1991-01-01] page 49, left-hand column, paragraph 1 page 50, right-hand column, paragraph 4

Beskrivelse

Den foreliggende oppfinnelse vedrører preparater og metoder for behandling av Charcot-Marie-Tooth sykdom og beslektede lidelser.

- 5 Charcot-Marie-Tooth sykdom ("CMT") er en orphan genetisk perifer polyneuropati. Den rammer omtrent 1 av 2500 individer, og denne sykdom er den mest vanlige arvelige lidelse i det perifere nervesystemet. Den starter typisk i løpet av første eller andre tiår av livet, skjønt den kan oppdages i barndommen. Sykdomsforløpet er kronisk, med gradvis nevromuskulær degenerering. Sykdommen er invalidiserende, med tilfeller av ledsagende nevrologisk smerte og ekstrem muskulær funksjonshemming. CMT er én av de best vurderte genetiske patologier med omtrent 10 30000 tilfeller i Frankrike. Mens en hoveddel av CMT-pasienter har en duplisering av et kromosom 17 fragment som inneholder et myeligen: PMP22 (form CMT1A), er to dusin gener implisert i forskjellige former av CMT. Følgelig, skjønt opprinnelig monogenisk, manifesterer denne patologi klinisk heterogenitet på grunn av mulige 15 modulatorgener. Genene mutert i CMT-pasienter er samlet i klynger rundt tett forbundne molekyllære spor, som påvirker differensieringen av Schwann-celler eller nevroner, eller som forandrer samspill mellom disse celler i perifere nerver.
- 20 PMP22 er en viktig komponent i myelin uttrykt i den kompakte delen av i alt vesentlig alle myelinerte fibrer i det perifere nervesystem, og produseres hovedsakelig av Schwann-celler. Videre antas PMP22-gen å være involvert i utviklingen av neoplasier i pasienter med neurofibromatose, en autosomal dominerende lidelse som er kjennetegnet ved cafe-au-lait flekker og fibromatøse tumorer i huden. En beskjedne 25 1,5-ganger overekspresjon av et normalt PMP22-protein er også observert i Schwann-celle heterozygot for duplikasjonen i CMT-pasienter (i noen sjeldne tilfeller kan CMT1A-liknende fenotyper også være koblet til strukturelle mutasjoner i PMP-22-protein) (Lupski et al., 1992; Suter et al., 1992; Roa et al., 1993; Thomas et al., 1997; Suter & Scherer, 2003; Nave & Sereda, 2007). Direkte bevis at unormal 30 PMP22-gendosering bevirker en CMT1A-liknende fenotype, ble tilveiebrakt ved transgene eksperimenter i gnagermodeller med overekspresjon av PMP22-protein (Niemann et al., 1999; Perea et al., 2001; Robaglia-Schlupp et al., 2002; Meyer et al., 2006; Sereda & Nave, 2006). Videre reduserte terapeutiske intervensjoner med inhibitorer av progesteronreseptorer og askorbinsyre denne ekspresjon i de transgene 35 dyrene med forbedring eller nedsettelse av progresjon av sykdomsfenotype (Sereda et al., 2003; Passage et al., 2004; Meyer zu Horste et al., 2007). Bassi et al., 1978, angår bruken av metimazol i behandlingen av tyrotoksikose assosiert med neuropati

og encefalomyelitt. WO 00/20024 fra Celtrix angår bruken av metimazol for å lindre symptomer på en IGF-avhengig lidelse, som er en thyroidea lidelse, og anvendelsen av IGF eller thyroidea-akse agonister i behandling av ikke-thyroidea lidelser som responderer på IGF (slik som CMT). WO 2004/019938 angår anvendelsen av pilokarpin i behandlingen av symptomer på nevropatisk smerte, slik som glaukom og andre lidelser relatert til økt intraokulært trykk. EP 2 065 038 angår preparater og metoder for behandling av CMT-sykdom ved å nedsette PMP22-ekspressjon i et individ.

Bruk av pilokarpin alene for behandling av myotoniske papillær-unormalheter ble foreslått av Keltner et al., 1975. Bruk av pilokarpin for behandling av CMT var imidlertid ikke beskrevet. Dessuten var heller ikke bruken av pilokarpin i kombinasjon med en hvilken som helst annen forbindelse foreslått.

Følgelig er der et behov for effektiv og anerkjent terapi for behandling av CMT-sykdom.

Oppsummering av oppfinnelsen

Formålet med den foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe nye terapeutiske tilnærminger for behandling av CMT og relaterte lidelser. Mer spesifikt har oppfinnerne identifisert nye kombinasjonsterapier som effektivt påvirker spor som fører til CMT og relaterte lidelser, og representerer nye tilnærminger for behandlingen av disse lidelser. Oppfinnelsen tilveiebringer derfor nye kombinasjonsprodukter og preparater, så vel som anvendelser for behandling av CMT-sykdom og relaterte lidelser.

Formålet med denne oppfinnelse angår et preparat som definert i kravene. Mer spesifikt angår oppfinnelsen et preparat som omfatter en muskarinreseptoragonist valgt fra gruppen som består av pilokarpin, cevimelin, karbachol, metacholin og betanechol, eller et salt derav, og en inhibitor av thyroidea hormonsyntese valgt fra gruppen som består av metimazol, karbomazol, propyltiouracil og amiodaron, eller et salt derav, og en farmasøytisk akseptert bærer eller eksipiens.

Oppfinnelsen omhandler også anvendelsen av en kombinasjon av forbindelser for (fremstillingen av et medikament for) behandling av CMT eller en relatert lidelse, hvor nevnte kombinasjon av forbindelser er valgt fra en muskarinreseptoragonist eller en prodrug derav, og en inhibitor av thyroideahormonsyntese eller en prodrug derav. Oppfinnelsen omhandler også et kombinasjonsprodukt som omfatter en muskarinreseptoragonist, og en inhibitor av thyroidea hormonsyntese, eller en

prodrug derav, for en samlet eller separat administrering til et individ, samtidig eller påfølgende.

5 I den mest foretrukne utførelsesform er muskarinreseptoragonisten (3S,4R)-3-etyl-4-
[(3-metylimidazol-4-yl)metyl]oksolan-2-on (CAS 92-13-7), som er et aktivt middel i
pilocarpin farmasøytikum), eller en prodrug derav.

10 Videre, i en mest foretrukket utførelsesform, er inhibitoren av thyroidea-
hormonsyntesen 1-metyl-3H-imidazol-2-tion (CAS 60-56-0, som er et aktivt middel i
metimazol farmasøytikum), eller en prodrug derav, slik som karbimazol.

15 Oppfinnelsen omhandler også et preparat som omfatter en muskarinreseptoragonist
og en inhibitor av tyrpindhormonsyntese for behandling av CMT i et individ, hvor
behandlingen videre omfatter et trinn å bestemme om pasienten har CMT1A.

I denne forbindelse er et særlig formål med denne oppfinnelse et preparat som
omfatter pilocarpin, eller en prodrug derav, og metimazol, eller en prodrug derav, og
eventuelt en farmasøytisk aksepterbar bærer eller eksipiens. Som vist i eksemplene,
tillater en slik kombinasjon effektiv behandling av CMT i anerkjente dyremodeller.

20 Preparatene ifølge denne oppfinnelsen kan videre omfatte minst én ytterligere aktiv
forbindelse, foretrukket valgt fra gruppen som består av rapamycin, baklofen, sorbitol,
mifepriston, naltrekson, flurbiprofen og ketoprofen.

25 I en foretrukket utførelsesform omfatter preparatet ifølge oppfinnelsen minst:

- pilocarpin, metimazol og mifepriston;
- pilocarpin, metimazol og baklofen; eller
- pilocarpin, metimazol og sorbitol.

30 I en annen foretrukket utførelsesform omfatter preparatet ifølge oppfinnelsen minst:

- pilocarpin, metimazol, mifepriston, baklofen og sorbitol; eller
- pilocarpin, metimazol, mifepriston, baklofen, sorbitol og naltrekson.

35 I andre utførelsesformer angår den foreliggende oppfinnelse et preparat som omfatter
metimazol, pilocarpin og to ytterligere aktive forbindelser, foretrukket mifepriston og
sorbitol.

I andre utførelsesformer angår den foreliggende oppfinnelse preparater som omfatter metimazol, pilokarpin og tre ytterligere aktive forbindelser, foretrukket:

- mifepriston, baklofen og sorbitol; eller
- mifepriston, sorbitol og rapamycin; eller
- 5 - mifepriston, sorbitol og ketoprofen; eller
- mifepriston, sorbitol og flurbiprofen.

I andre utførelsesformer angår den foreliggende oppfinnelse et preparat som omfatter metimazol, pilokarpin og fire ytterligere aktive forbindelser, foretrukket:

- 10 - mifepriston, sorbitol, baklofen og naltrekson;
- mifepriston, sorbitol, baklofen og rapamycin;
- mifepriston, sorbitol, naltrekson og rapamycin.

I andre utførelsesformer angår oppfinnelsen et preparat som omfatter en hvilken som helst legemiddelkombinasjon som angitt i tabell 1.

I andre spesifikke utførelsesformer angår den foreliggende oppfinnelse et preparat som omfatter:

- 20 - metimazol og cevimelin.

I en annen utførelsesform angår oppfinnelsen også et preparat som omfatter pilokarpin og propyltiouracil.

Et annet formål med oppfinnelsen angår bruken av en kombinasjon av pilokarpin med metimazol eller disse to forbindelser alene, eller i kombinasjon/kombinasjoner med andre forbindelser som øker deres effekt for (fremstilling av et medikament for) behandling av CMT eller en relatert lidelse.

Et annet formål med den foreliggende oppfinnelse angår bruken av en kombinasjon av pilokarpin med metimazol eller disse to forbindelser alene, eller i kombinasjon/kombinasjoner med andre forbindelser som øker deres effekt for (fremstilling av et medikament for) behandling av toksisk nevropati.

Et annet formål med den foreliggende oppfinnelse angår bruken av en kombinasjon av pilokarpin med metimazol eller disse to forbindelser alene, eller i kombinasjon/kombinasjoner med andre forbindelser som øker deres effekt for

(fremstillingen av et medikament for) behandling av ALS (amyotrofisk lateral-sklerose).

5 Forbindelsene som øker effekten av pilokarpin- og metimazolkombinasjonen for behandling av CMT, velges foretrukket fra gruppen som består av mifepriston, baklofen, sorbitol, naltrekson, rapamycin, flurbiprofen og ketoprofen.

10 I en variant anvendes en pilokarpin- og metimazolblanding, for behandling av CMT eller en relatert lidelse, i kombinasjon med en ytterligere aktiv forbindelse, foretrukket mifepriston eller baklofen.

I en annen variant anvendes en pilokarpin- og metimazolblanding i kombinasjon med to ytterligere aktive forbindelser, foretrukket mifepriston og sorbitol.

15 I en annen variant anvendes en pilokarpin- og metimazolblanding i kombinasjon med tre ytterligere aktive forbindelser, foretrukket bestående av mifepriston og sorbitol i kombinasjon med en tredje forbindelse valgt fra baklofen, rapamycin, ketoprofen eller furbiprofen.

20 I en annen variant anvendes en pilokarpin- og metimazolblanding i kombinasjon med fire ytterligere aktive forbindelser, foretrukket mifepriston, sorbitol, baklofen og naltrekson eller rapamycin; eller mifepriston, sorbitol, naltrekson og rapamycin.

25 Oppfinnelsen omhandler også en metode for å behandle CMT eller en relatert lidelse, særlig CMT, som omfatter administrering til et individ med behov derfor, av en effektiv mengde av kombinasjonen av muskarinreseptoragonist eller en prodrug derav, og inhibitorer av thyroideahormonsyntese, eller en prodrug derav.

30 Oppfinnelsen omhandler videre også en metode for å behandle CMT i et individ, som omfatter at det til individet administreres en effektiv mengde av en kombinasjon av pilokarpin, eller et prodrug derav, og metimazol, eller et prodrug derav.

35 Oppfinnelsen angår også en metode for å behandle CMT i et individ, som omfatter at det til individet administreres en effektiv mengde av en kombinasjon av pilokarpin og metimazol, med minst én ytterligere aktiv forbindelse, foretrukket valgt fra gruppen av rapamycin, baklofen, sorbitol, mifepriston, naltrekson, flurbiprofen og ketoprofen.

I varianter omhandler den foreliggende oppfinnelse også en metode for å behandle CMT i et individ som omfatter at det til individet administreres en effektiv mengde av en kombinasjon av:

- pilokarpin, metimazol og minst én ytterligere aktiv forbindelse som er valgt fra baklofen, mifepriston, sorbitol og naltrekson;
- pilokarpin, metimazol og baklofen;
- pilokarpin, metimazol og mifepriston;
- pilokarpin, metimazol, mifepriston, sorbitol og baklofen;
- pilokarpin, metimazol, mifepriston, sorbitol og rapamycin;
- pilokarpin, metimazol, mifepriston, sorbitol og ketoprofen;
- pilokarpin, metimazol, mifepriston, sorbitol og flurbiprofen;
- pilokarpin, metimazol, mifepriston, sorbitol, baklofen og naltrekson;
- pilokarpin, metimazol, mifepriston, sorbitol, baklofen og rapamycin;
- pilokarpin, metimazol, mifepriston, sorbitol, naltrekson og rapamycin;
- metimazol og baklofen;
- metimazol og cevimeline; eller
- pilokarpin og propyltiouracil.

Oppfinnelsen kan også anvendes for å behandle CMT eller en relatert lidelse i et hvilket som helst pattedyrindivid, særlig mennesker. Den er særlig egnet for å behandle CMT1a.

Oppfinnelsen angår også en metode for å behandle CMT1a i et individ som omfatter at det til individet administreres en effektiv mengde av en kombinasjon av pilokarpin eller en prodrug derav, metimazol eller en prodrug.

Oppfinnelsen angår også en metode for å behandle CMT1a, hvor metoden omfatter (1) å fastslå om et individ har CMT1a, og (2) å behandle individet med CMT1a med en effektiv mengde av en kombinasjon av pilokarpin, eller en prodrug derav, og metimazol, eller en prodrug derav. Bestemmelse av om et individ har CMT1a kan gjennomføres ved hjelp av forskjellige tester som er kjent innen teknikkens stand, slik som DNA-analyser.

Forklaring av figurene

Figur 1: Relative nivåer er representert som % av PMP22 mRNA-ekspressjon i primær rotte Schwann-celler behandlet i 24 timer med forbindelser A og B. Til venstre er det vist % av PMP22 mRNA-nivå, 24 timer etter 1 mM eller 1 μ M av forbindelse A

(metimazol) ved tilsetning. Det er observert at PMP22 mRNA er signifikant nedsatt i primære Schwann-celler, og at den lavere dosen av forbindelse A induserer den viktigste PMP22 nedregulering. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; signifikant forskjellig fra kontroll (parvis student t test). Til høyre, eksponert 24 timer for forbindelse B (pilocarpin), er PMP22 mRNA-ekspresjonsnivået signifikant nedregulert i primære Schwann-celler selv ved svært lave doser (10 nM og 50 nM). Likeledes har man observert at forbindelse B (1 μ M) signifikant nedsetter PMP22 proteinekspresjonsnivå etter 24 timers inkubasjon, med 38 % i primære Schwann-celler. Denne effekt er fremdeles signifikant etter 48 timers inkubasjon (-18 %, $p < 0,001$).

Figur 2: Effekt av valgte legemidler på PMP22 mRNA ekspresjonsnivå kvantifisert ved RT-Q-PCR i RT4-D6P2T schwannomaceller. ***: $p < 0,0001$: signifikant forskjellig fra kontroll (= uten legemiddel). Bilateral students t test på $\Delta\Delta$ Ct-verdier.

Figur 3: Resultater av motorisk vurdering av hunnrotter i Bar-testen gjennom behandlingsstudien presentert i form av tendenser. WTplacebo: normale rotter behandlet med placebo; TGplacebo: kontroll transgene rotter behandlet med placebo; TGptx25: transgene rotter behandlet med negativ kontrollsubstans, TGA: transgene rotter tvangsfôret med daglig dose av 0,2 mg/kg metimazol; TGB: transgene rotter behandlet med daglig dose på 0,35 mg/kg av pilocarpin.

Figur 4: Elektrofysiologisk vurdering av sensitiv nerve potensiell amplitude i CMT-rotter behandlet med legemidler i løpet av 20 uker. TGplacebo: kontroll transgene rotter behandlet med placebo, TGptx25: transgene rotter behandlet med negativ kontrollsubstans; TGA: transgene rotter behandlet med daglig dose på 0,2 mg/kg metimazol; TGB: transgene rotter behandlet med daglig dose på 0,35 mg/kg pilocarpin.

Figur 5: Analyse av post-mortem prøver oppnådd fra dyr behandlet med legemidler som beskrevet i forklaringen til figur 3. Rottene behandlet med legemidler og placebo i løpet av 20 uker ble inngående bedøvet, og prøver av de fullstendige hofternerver og soleus muskler ble forsiktig tatt og veid. Kurvene angir 30 gjennomsnittlige verdier av disse målinger.

Figur 6: Positiv effekt av blanding1 i gangeevalueringstesten (hunnrotter); sort linje representerer kontrollrotter behandlet med placebo; sort uthevet linje representerer transgene rotter behandlet med placebo; stiplet linje representerer transgene rotter

behandlet med blanding 1. * $p < 0,05$; sort *: wt placebo versus tg placebo; grå *: tg placebo versus tg blanding 1. Statistikk er gjennomført med student bilateral test; gjennomsnitt er representert ved $\pm$ s.e.m.

5 **Figur 7:** Positiv effekt av blanding 2 på eksitabilitets-terskelverdi for kaudalnerven (hvite stolper representerer kontroll hannrotter behandlet med placebo; sorte stolper representerer transgene hannrotter behandlet med placebo; grå stolper representerer transgene hannrotter behandlet med blanding 2. Statistikk er gjennomført med student bilateral test; gjennomsnitt er representert som $\pm$ s.e.m.

10

Figur 8: Positiv effekt av blanding 2 etter 4 ukers behandling i stolpetesten (hvite stolper representerer kontroll hannrotter behandlet med placebo; sorte stolper representerer transgene hannrotter behandlet med placebo; grå stolper representerer transgene hannrotter behandlet med blanding 2). Statistikk er gjennomført med student bilateral test; gjennomsnitt er representert ved $\pm$ s.e.m.

15

Figur 9: Positiv effekt på gange for blanding 2 etter 3 ukers behandling (hvite stolper representerer prosentandel hannrotter i hver gruppe som går med en flytende gange; grå stolper representerer uførhet. Statistikk er gjennomført med student bilateral test.

20

Figur 10: Anti-allodyneffekt i kronisk OXALPN-modell. Med blått er det vist reaksjonstider i acetontest for kontroll dyr, med rødt oksiliplatinbehandlede dyr, med grønn farge dyrene behandlet med oksiliplatin og blanding 2.

25 **Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen**

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer nye terapeutiske tilnærminger for å behandle CMT eller relaterte lidelser. Oppfinnelsen angår nye sammensetninger dannet fra kombinasjoner av kjente legemidler og deres nye anvendelser for effektiv korreksjon av slike sykdommer, og kan anvendes i et hvilket som helst

30

pattedyrindivid.

Innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelse betyr betegnelsen "CMT-relatert lidelse" andre perifere nevropatier, både arvelige og ervervede.

35

Den viktigste form av CMT, CMT1A, er forårsaket av duplikasjon av PMP22-gen. PMP22 er en viktig komponent i myelin uttrykt i den kompakte del av i alt vesentlig alle myelinerte fibre i det perifere nervesystem. PMP22-protein interagerer med annet

strukturelt myelinprotein P0, og derfor vil det endrede PMP22/P0-proteinforhold kunne innvirke på kompaktering av myelinplater (Vallat et al., 1996; D'Urso et al., 1999). Som demonstrert ved in vitro studier, er PMP22-protein også involvert i regulering av cellespredning på en Rho-avhengig måte, og vil således kunne påvirke aksonal "ensheatment" (Brancolini et al., 1999). Dessuten danner PMP22-former komplekser med $\alpha 6\beta 4$ -integriner, og vil kunne mediere interaksjoner av Schwann-celler med ekstracellulær matriks (Amici et al., 2006; Amici et al., 2007). Videre kan økt nivå av PMP22-protein endre Arf6-regulert plasmamembran endosomalt resirkuleringsspor, og føre til akkumulering av PMP22 i de sene endosomer (Chies et al., 2003). Det ble demonstrert at overuttrykt PMP22-protein forstyrrer intracellulær proteinsortering, og overbelaster proteinnedbrytningsmaskineriet i Schwann-celler (Notterpek et al., 1997; Tobler et al., 2002; Fortun et al., 2003; Fortun et al., 2006; Fortun et al., 2007; Khajavi et al., 2007). Endelig er PMP22 direkte involvert i kontroll av celleproliferasjon og programmert celledød (Sancho et al., 2001; Atanasoski et al., 2002) og mutant PMP22-protein ble vist til å fremkalle inngående reorganisering og den avvikende ekspresjon av aksonale ionekanaler (Ulzheimer et al., 2004; Devaux & Scherer, 2005).

Følgelig omfatter betegnelsen "CMT-relatert lidelse" perifere lidelser slik som ALS, toksiske nevropatier, idiopatiske nevropatier, diabetisk nevropati, cancer- og HIV-induserte nevropatier, Guillain-Barré syndrom.

I en foretrukket utførelsesform betegner CMT-relatert lidelse en nevropati, slik som demyelineringsnevropatier, som inkluderer HNPP (arvelig nevropati med tilbøyelighet til trykk-palsier), CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1X, CMT2A, CMT2B, CMT2D, CMT2E, CMT2-P0, alvorlige demyelineringsnevropatier DSS (Dejerine-Sottas syndrom), CHN (kongenital hypomyelineringsnevropati), CMT4A, CMT4B1, CMT4B2, CMT4D, CMT4F, CMT4, AR-CMT2A, HSN1.

Oppfinnelsen er særlig egnet for å behandle CMT1A.

Som anvendt her inkluderer "behandling" av en lidelse terapi, forebygging, profylakse, retardasjon eller reduksjon av smerte som er fremmet ved lidelsen. Betegnelsen behandling inkluderer særlig kontroll av sykdomsprogresjon og assosierte symptomer.

Betegnelsen forbindelse angir også de kjemiske forbindelser som spesifikt blir nevnt i søknaden, så vel som et hvilket som helst farmasøytisk aksepterbart salt, hydrat, ester, eter, isomerer, racemater, konjugater, prodrugs derav.

5 Betegnelsen "kombinasjon" betegner også en behandling hvor minst to legemidler ko-administreres til et individ for å bevirke en biologisk effekt. Ved kombinert terapi kan de i det minste to legemidlene administreres sammen eller separat, samtidig eller påfølgende. De i det minste to legemidlene kan også administreres ved ulike ruter og protokoller.

10

Oppfinnelsen viser at CMT eller en CMT-relatert lidelse kan behandles ved en spesiell kombinasjon av legemidler. Mer spesifikt viser oppfinnelsen at metimazol- og pilokarpinforbindelser i kombinasjon(er), kan anvendes for å behandle CMT eller relaterte lidelser. I denne forbindelse viser eksperimentelle resultater at en
15 kombinasjon av metimazol og pilokarpin nedsettes signifikant nivået av RNA-ekspressjon av PMP22-gen i rotte Schwann-celler. Videre er PMP22-transgene rotter som er modell for human CMT-sykdom blitt behandlet daglig med kombinasjoner som inneholder metimazol og pilokarpin. Signifikant forbedring av atferdsmessige endepunkter ble observert.

20

Pilokarpin: (3S,4R)-3-etyl-4-[(3-metylimidazol-4-yl)metyl]oksolan-2-on

Dette legemiddel, $C_{11}H_{16}N_2O_2$ er blitt godkjent for behandling av i) symptomer på tørr munn fra spyttkjertelhypofunksjon bevirket ved radioterapi for cancer av hode og hals; og ii) behandling av symptomer på tørr munn i pasienter med Sjøgrens
25 syndrom.

Muskarinreseptoragonist, den bevirker kontraksjon av glatte muskelfibre (fordøyelseskanal, øye, bronkie), stimulerer sudoral sekresjon, spyttsekresjon, bronkiesekresjon og gastrisk sekresjon. Videre utviser den en kompleks
30 kardiovaskulær virkning, stimulerer begge parasympatomimetiske (vasodilatasjon) eksitoganglionære spor.

Oppfinnerne har vist at pilokarpin, en muskarinreseptoragonist, nedsetter ekspressjon av PMP22-protein i Schwann-celler in vitro. Vi foreslår at stimulering av
35 muskarinreseptorer ved pilokarpin fører, sannsynligvis gjennom komplekse grupper av molekyllære mekanismer, til skift i intracellulær balanse av Erk/Akt-aktiviteter, som

regulerer ekspresjon av myelinassosierte proteinmarkører på motsatt måte, til en mer uttalt Erk-signallering (Ogata et al., 2004).

Uten at man ønsker å være bundet av noen teori, er det postulert at stimulering av muskarinreseptor kan modifisere aktivitet av Akt- og Erk-kinaser ved en rekke ledsagende mekanismer (Ma et al., 2004; Anger et al., 2007). Muskarinreseptor kan f.eks. selektivt blokkere signalering ved IGF-1, men ikke PDGF-reseptorer, ved å fremme inhiberende tyrosindefosforylering eller inhiberende serinfosforylering av IRS-1 ved PKC. Deretter kan muskarinreseptor mediere intracellulær transaktivering av ERK-signalerings gjennom Src-liknende Fyn-kinase, idet ved å nedsette aktivitet av adenylat syklase, kan muskarinreseptorer likeledes være involvert i funksjonell regulering av Akt/Gsk-3 β og Erk-kinasene også gjennom PKA-mediert mekanisme. Endelig er det vist at stimulering av muskarinreseptorer kan, gjennom aktivering av AMPK, transient bevirke defosforylering av Akt, og således nedsette intracellulær samling av β -katenin (Batty et al., 2004; King et al., 2006).

Som et resultat kan andre muskarinreseptoragonister likeledes anvendes, slik som: Cevimeline (CAS nummer 107233-08-9), Karchol (CAS nummer 51-83-2), Metacholin (CAS nummer 55-92-5) og Betanecol (CAS nummer 674-38-4).

Metimazol: 1-metyl-3H-imidazol-2-tion

Metimazol inhiberer produksjonen av nye thyroideahormoner, og blokkerer aktiviteten av thyroidea peroksidase, omdanner jodid til jod og katalyserer innlemmelsen av det resulterende jodidmolekyl i fenolringene til tyrosiner. Således kan metimazol effektivt nedsette transkripsjonell aktivitet av thyroideahormonreseptorer. I tillegg har metimazol blitt rapportert til å undertrykke prostaglandinproduksjon ved å svekke prostaglandin H syntaseaktivitet (Zelman et al., 1984). Prostaglandiner, gjennom deres kognat GPCR-reseptorer, kan ytterligere øke aktivitet av Akt-signaleringsspor, som fremmer ekspresjonen av myelinrelaterte proteiner (Ogata et al., 2004; Castellone et al., 2006). Følgelig er forbindelser som både inhiberer thyroidea hormonsyntese og rammer prostaglandinproduksjon eller signalering særlig fordelaktige for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse.

Andre forbindelser som ved virkningsmåte er relatert til metimazol er karbimazol (prodrug av metimazol – CAS nummer 22232-54.8) og propyltiouracil (CAS nummer 51-52-5), og amiodaron (CAS nummer 1951-25-3).

Som omtalt i eksemplene, utviser forbindelser metimazol og pilokarpin en kombinert virkning som fører til å forbedre terapeutisk effekt mot CMT, som tillater nedskalering av effektive terapeutiske doser med nedsatte bivirkninger.

5 En særlig utførelsesform av oppfinnelsen ligger i en kombinasjonsterapi for å behandle CMT eller en relatert lidelse, særlig CMT1A, hvor nevnte kombinasjonsterapi omfatter metimazol- og pilokarpinforbindelser og minst en tredje forbindelse som er i stand til å øke aktiviteten av denne kombinasjonen.

10 En annen særlig utførelsesform av oppfinnelsen angår en kombinasjonsterapi for å behandle ALS, hvor nevnte kombinasjonsterapi omfatter metimazol- og pilokarpinforbindelser, og minst en tredje forbindelse som er i stand til å øke aktiviteten av denne kombinasjonen.

15 En annen særlig utførelsesform av oppfinnelsen angår en kombinasjonsterapi for å behandle toksisk nevropati, hvor nevnte kombinasjonsterapi omfatter metimazol- og pilokarpinforbindelser, og minst en tredje forbindelse som er i stand til å øke aktiviteten av denne kombinasjonen.

20 En særlig utførelsesform av oppfinnelsen angår en terapi for å behandle CMT eller en relatert lidelse, hvor forbindelsene metimazol og pilokarpin anvendes alene.

En annen særlig utførelsesform av oppfinnelsen angår en terapi for å behandle CMT eller en relatert lidelse, hvor metimazol og/eller pilokarpin anvendes i kombinasjon
25 med minst én ytterligere aktiv forbindelse. I en foretrukket utførelsesform er den minst ene ytterligere forbindelse valgt fra gruppen av forbindelser som er angitt i tabell 1.

En annen særlig utførelsesform av oppfinnelsen angår en sammensetning som
30 omfatter en hvilken som helst legemiddelkombinasjon som angitt i tabell 1.

En annen særlig utførelsesform av oppfinnelsen angår en kombinasjonsterapi for å behandle CMT eller en relatert lidelse, som omfatter en hvilken som helst legemiddelkombinasjon som angitt i tabell 1.

En annen særlig utførelsesform av oppfinnelsen angår en kombinasjonsterapi for å behandle ALS, som omfatter en hvilken som helst legemiddelkombinasjon som angitt i tabell 1.

- 5 En annen særlig utførelsesform av oppfinnelsen angår en kombinasjonsterapi for å behandle toksisk nevropati, som omfatter en hvilken som helst legemiddelkombinasjon som angitt i tabell 1.

10 Terapi ifølge oppfinnelsen gjennomføres som legemiddelkombinasjon, eventuelt sammen med en hvilken som helst annen terapi. Den kan tilveiebringes hjemme, hos legen, i en klinikk, på poliklinikken til et sykehus, eller i et sykehus, slik at legen kan observere terapiens effekt på nært hold, og kan gjøre eventuelle justeringer som er nødvendig.

- 15 Varigheten av terapien avhenger av sykdomsstadiet, alder og tilstand til pasienten, og hvordan pasienten responderer på behandlingen.

20 I tillegg, kan en person med større risiko for å utvikle en ytterligere nevropatisk lidelse (f.eks. en person som er genetisk predisponert for, eller som f.eks. har diabetes, eller som er under behandling for en onkologisk tilstand, osv.), motta profylaktisk behandling for å lindre eller for å utsette eventuell nevropatisk respons.

25 Dose, hyppighet og administreringsmåte for hver komponent i kombinasjonen kan reguleres uavhengig av hverandre. Et legemiddel kan f.eks. administreres oralt, mens det andre legemiddel kan administreres intramuskulært. Kombinasjonsterapi kan gis i på- og av-sykluser som inkluderer hvileperioder, slik at pasientens kropp har en sjanse til å restituere fra eventuelle, fremdeles uforutsette, bivirkninger. Legemidler kan også være formulert sammen, slik at én administrering avleverer begge legemidler.

30

Formulering av farmasøytiske sammensetninger

Administreringen av hvert legemiddel eller av kombinasjonen kan være ved hjelp av et hvilket som helst passende middel som resulterer i en konsentrasjon av legemidlet som, kombinert med den andre komponent, kan korrigere effekt av økt ekspresjon av PMP22 når man når de perifere nerver.

35

Mens det er mulig for de aktive bestanddeler i kombinasjonen å bli administrert som det rene kjemikaliet, er det foretrukket å presentere dem som en farmasøytisk sammensetning, også omtalt i denne sammenheng som farmasøytisk formulering. Ulike sammensetninger inkluderer dem som er egnet for oral, rektal, topisk, som
5 inkluderer transdermal, bukal og sublingual, eller parenteral som inkluderer subkutan, intramuskulær, intravenøs og intradermal administrering.

Mer vanlig er disse farmasøytiske formuleringer forskrevet til pasienten i "pasientpakninger" som inneholder et antall doseringsenheter eller andre midler for
10 administrering av målte enhetsdoser for å anvende under en bestemt behandlingsperiode i en enkeltpakning, vanligvis en blisterpakning. Pasientpakninger har en fordel fremfor tradisjonelle resepter, hvor en farmasøyt oppdeler en pasients forsyning av et farmasøytikum fra en bulkforsyning, ved at pasienten alltid har tilgang til pakningsinnlegget som er inneholdt i pasientpakningen, og som normalt mangler
15 ved tradisjonelle resepter. Innlemmelsen av et pakningsinnlegg er blitt vist til å forbedre pasientens samarbeidsvilje i forbindelse med legens instruksjoner. Således inkluderer oppfinnelsen videre en farmasøytisk formulering, som beskrevet i det foregående, i kombinasjon med pakningsmateriale som er egnet for denne formuleringen. En slik pasientpakning som har den tilsiktede bruken av en formulering
20 for kombinasjonsbehandlingen, antydes ved instruksjoner, utstyr, forskrifter, tilpasninger og/eller andre midler for å hjelpe med å anvende formuleringen mest passende for behandlingen. Slike forholdsregler gjør en pasientpakning spesielt egnet for og tilpasset for anvendelse ved behandling med kombinasjonen ifølge oppfinnelsen.

25 Legemidlet kan være inneholdt i en hvilken som passende mengde i en hvilken som helst passende bærersubstans, og det kan være tilstede i en mengde fra 1-99 vekt% av den totale vekten av sammensetningen. Sammensetningen kan være tilveiebrakt i en doseform som er egnet for oral, parenteral (f.eks. intravenøs, intramuskulær),
30 rektal, kutan, nasal, vaginal, for inhalasjon, hud (plaster), eller okulær administreringsrute. Sammensetningen kan således være i form av f.eks. tabletter, kapsler, piller, pulvere, granulater, suspensjoner, emulsjoner, oppløsninger, geler som inkluderer hydrogeler, pastaer, salver, kremer, plastre, ved store doser, osmotiske avleveringsanordninger, stikkpiller, klystér, injiserbare preparater, implantater,
35 sprayer eller aerosoler.

De farmasøytiske sammensetninger kan være formulert i henhold til konvensjonell farmasøytisk praksis (se f.eks. Remington: The Science and Practice of pharmacy (20. utgave), red. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 og Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, red. J. Swarbrick og J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan være formulert for å frigi det aktive legemidlet i alt vesentlig umiddelbart etter administrering, eller på et hvilket som helst forhåndsbestemt tidspunkt eller tidsperiode etter administrering.

10

Formuleringene med kontrollert frigivelse inkluderer (i) formuleringer som danner en i alt vesentlig konstant konsentrasjon av legemidlet i kroppen over en utstrakt tidsperiode; (ii) formuleringer som etter en forhåndsbestemt forsinkelsestid, danner en i alt vesentlig konstant konsentrasjon av legemidlet i kroppen over en utstrakt tidsperiode; (iii) formuleringer som opprettholder legemiddelvirkning under en forhåndsbestemt tidsperiode ved å bibeholde et relativt konstant effektivt legemiddelnivå i kroppen med den samtidige minimalisering av uønskede bivirkninger som er forbundet med fluktureringer i plasmanivået for den aktive legemiddelsubstansen; (iv) formuleringer som lokaliserer legemiddelvirkning ved f.eks. spatial plassering av en sammensetning med kontrollert frigivelse i nærhet av, eller i, det syke vevet eller organet; og (v) formuleringer som målretter legemiddelvirkning ved å anvende bærere eller kjemiske derivater for å avlevere legemidlet til en spesiell målcelletype.

Administrering av legemidler i form av en formulering med kontrollert frigivelse er særlig foretrukket i tilfeller hvor legemidlet, enten alene eller i kombinasjon, har (i) en snever terapeutisk indeks (dvs. forskjellen mellom plasmakonsentrasjonen som fører til skadelige bivirkninger eller toksiske reaksjoner, og plasmakonsentrasjonen som fører til en terapeutisk effekt er liten; generelt er den terapeutiske indeks, TI, definert som forholdet mellom midlere letal dose (LD50) og midlere effektiv dose (ED50)); (ii) et snevert absorpsjonsvindu i fordøyelseskanalen; eller (iii) en svært kort biologisk halveringstid, slik at hyppig dosering i løpet av en dag er nødvendig for å opprettholde plasmanivået på et terapeutisk nivå.

Hvilke som helst av en rekke strategier kan følges for å oppnå kontrollert frigivelse hvor frigivelsesraten oppveier metabolisme for det aktuelle legemidlet. Kontrollert frigivelse kan oppnås ved passende seleksjon av forskjellige formuleringsparametere

og bestanddeler som inkluderer f.eks. forskjellige typer av sammensetninger og belegg med kontrollert frigivelse. Legemidlet formuleres således med passende eksipienser til en farmasøytisk sammensetning som, ved administrering, frigir legemidlet på en kontrollert måte (enkelt- eller multippel enhet-tablett eller kapselsammensetninger, oljeoppløsninger, suspensjoner, emulsjoner, mikrokapsler, mikrokuler, nanopartikler, plastre og liposomer).

Faste doseformer for oral bruk

Formuleringer for oral bruk inkluderer tabletter som inneholder den eller de aktive bestanddeler i blanding med ikke-toksiske farmasøytisk aksepterbare eksipienser. Disse eksipienser kan f.eks. være inerte fortynningsmidler eller fyllstoffer (f.eks. sukrose, mikrokrystallinsk cellulose, stivelser som inkluderer potetstivelse, kalsiumkarbonat, natriumklorid, kalsiumfosfat, kalsiumsulfat, eller natriumfosfat); granuleringsmidler og desintegrerende midler (f.eks. cellulosederivater som inkluderer mikrokrystallinsk cellulose, stivelser som inkluderer potetstivelse, krysskarmellose-natrium, alginater eller alginsyre); bindemidler (f.eks. akasie, alginsyre, natriumalginat, gelatin, stivelse, pregelatinert stivelse, mikrokrystallinsk cellulose, karboksymetylcellulose-natrium, metylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose, etylcellulose, polyvinylpyrrolidon eller polyetylglykol); og smøremidler, glidemidler og antiklebemidler (f.eks. stearinsyre, silikaforbindelser og talk). Andre farmasøytisk aksepterbare eksipienser kan være fargestoffer, smaksstoffer, myknere, fuktemidler, buffermidler, og liknende.

Tablettene kan være ubelagte eller de kan være belagt ved kjente teknikker, eventuelt for å utsette desintegrering og absorpsjon i fordøyelseskanalen, og for derved å tilveiebringe en forlenget virkning over en lengre periode. Belegget kan være tilpasset for frigivelse av den aktive legemiddelsubstansen i et forhåndsbestemt mønster (f.eks. for å oppnå en formulering med kontrollert frigivelse) eller den kan være tilpasset til ikke å frigi den aktive legemiddelsubstans før etter passering av magen (enterisk belegg). Belegget kan være et sukkerbelegg, et filmbelegg (f.eks. basert på hydroksypropylmetylcellulose, metylcellulose, metylhydroksyetylcellulose, hydroksypropylcellulose, karboksymetylcellulose, akrylatkopolymerer, polyetylglykoler og/eller polyvinylpyrrolidon), eller et enterisk belegg (f.eks. basert på metakrylsyrekopolymer, celluloseacetatftalat, hydroksypropylmetylcelluloseftalat, hydroksypropylmetylcelluloseacetatsuksinat, polyvinylacetatftalat, shellakk og/eller etylcellulose). Et materiale for tidsforskyvning som f.eks. glycerylmonostearat eller glyceryldistearat kan benyttes.

Den faste tabletttsammensetning kan inkludere et belegg som er tilpasset for å beskytte sammensetningen fra uønskede kjemiske forandringer (f.eks. kjemisk nedbrytning før frigivelse av den aktive legemiddelsubstans). Belegget kan påføres på
 5 den faste doseformen på en tilsvarende måte som det som er beskrevet i Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

De to legemidlene kan være blandet sammen i tablettene, eller kan være oppdelt. Det første legemidlet er f.eks. inneholdt på innsiden av tablettene, og det andre legemidlet
 10 er på utsiden, slik at en vesentlig del av det andre legemidlet frigjøres før frigivelse av det første legemidlet.

Formuleringer for oral anvendelse kan også presenteres som tyggbare tabletter, eller som harde gelatinkapsler hvor den aktive bestanddelen er blandet med et inert fast
 15 fortynningsmiddel (f.eks. potetstivelse, mikrokrySTALLinsk cellulose, kalsiumkarbonat, kalsiumfosfat eller kaolin), eller som myke gelatinkapsler hvor den aktive bestanddel er blandet med vann eller et oljemedium, f.eks. flytende parafin eller olivenolje. Pulvere og granulater kan fremstilles ved å anvende bestanddelene som nevnt ovenfor under tabletter og kapsler på en passende måte.

20

Sammensetninger for kontrollert frigivelse for oral bruk kan f.eks. være sammensatt til å frigi det aktive legemidlet ved å kontrollere oppløsning og/eller diffusjon av den aktive legemiddelsubstans.

25 Frigivelse med kontrollert oppløsning eller diffusjon kan oppnås ved passende belegning av en tablett, kapsel, pellet eller granulatformulering av legemidler, eller ved å innlemme legemidlet i en passende matriks. Et belegg med kontrollert frigivelse kan inkludere én eller flere av belegningssubstansene som er nevnt ovenfor og/eller f.eks. shellakk, bivoks, glykovoks, risinusvoks, karnaubavoks, stearylalkohol,
 30 glycerylmonostearat, glyceryldistearat, glyserolpalmitostearat, etylcellulose, akrylharpikser, dl-polymelkesyre, celluloseacetatbutyrat, polyvinylklorid, polyvinylacetat, vinylpyrrolidon, polyetylen, polymetakrylat, metylmetakrylat, 2-hydroksymetakrylat, metakrylathydrogeler, 1,3-butylenglykol, etylenglykolmetakrylat, og/eller polyetylenglykoler. I en matriksformulering med kontrollert frigivelse, kan
 35 matriksmaterialet også f.eks. inkludere hydratisert metylcellulose, karnaubavoks og stearylalkohol, carbopol 934, silikon, glyceryltristearat, metylakrylat-metylmetakrylat, polyvinylklorid, polyetylen og/eller halogenert fluorkarbon.

En sammensetning med kontrollert frigivelse som inneholder ett eller flere av legemidlene ifølge de patentsøkte kombinasjoner, kan også være i form av en flytende tablett eller kapsel (dvs. en tablett eller kapsel som ved administrering flyter på toppen av mageinnholdet i en viss tidsperiode). En flytende tablettformulering av ett eller flere legemidler kan fremstilles ved granulering av en blanding av ett eller flere legemidler med eksipienser og 20-75 % vekt/vekt av hydrokolloider, slik som hydroksyetylcellulose, hydroksypropylcellulose, eller hydroksypropylmetylcellulose. De oppnådde granuler kan deretter komprimeres til tabletter. Ved kontakt med magesaften, danner tabletten en i alt vesentlig vannimpermeabel gelbarriere rundt sin overflate. Denne gelbarrieren deltar i opprettholdelse av en densitet som er mindre enn én, og tillater derved at tabletten forblir flytende i magesaften.

Væsker for oral administrering

Pulvere, dispergerbare pulvere, eller granuler som er egnet for fremstilling av en vandig suspensjon ved tilsetning av vann er passende doseformer for oral administrering. Formulering slik som suspensjon tilveiebringer den aktive bestanddel i en blanding med et dispergeringsmiddel eller fuktemiddel, suspensjonsmiddel og ett eller flere konserveringsmidler. Passende suspensjonsmidler er f.eks. natriumkarboksymetylcellulose, metylcellulose, natriumalginat og liknende.

Parenterale sammensetninger

Den farmasøytiske sammensetning kan også administreres parenteralt ved injeksjon, infusjon eller implantasjon (intravenøs, intramuskulær, subkutan, eller liknende) i doseformer, formuleringer, eller via passende avleveringsanordninger eller implantater som inneholder konvensjonelle, ikke-toksiske farmasøytisk aksepterbare bærere og adjuvanter. Formuleringen og fremstillingen av slike sammensetninger er velkjent for de fagkyndige på området innen farmasøytisk fremstilling.

Sammensetningene for parenteral anvendelse kan tilveiebringes i enhetsdoseformer (f.eks. i enkeltdoseampuller), eller i hetteglass som inneholder flere doser, og hvortil et passende konserveringsmiddel kan tilsettes (se nedenfor). Sammensetningen kan være i form av en oppløsning, en suspensjon, emulsjon, en infusjonsanordning eller en avleveringsanordning for implantasjon, eller kan være tilstede som et tørt pulver eller kan rekonstitueres med vann eller annen passende vehikkel før bruk. Bortsett fra det eller de aktive legemidlene, kan sammensetningen inkludere passende parenteralt aksepterbare bærere og/eller eksipienser. Det eller de aktive legemidler kan være

innlemmet i mikrokuler, mikrokapsler, nanopartikler, liposomer eller liknende for kontrollert frigivelse. Sammensetningen kan inkludere midler for suspensjon, solubilisering, stabilisering, pH-justering og/eller dispergeringsmidler.

- 5 De farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan være i en form som er egnet for steril injeksjon. For å fremstille en slik sammensetning, blir det eller de aktive legemidlene oppløst eller suspendert i en parenteralt akseptbar flytende
- vehikkel. Blant akseptbare vehikler og løsningsmidler som kan anvendes er vann, vann justert til en passende pH ved tilsetning av en passende mengde saltsyre,
- 10 natriumhydroksid, eller en passende buffer, 1,3-butandiol, Ringers oppløsning, og isotonisk natriumkloridoppløsning. Den vandige formulering kan også inneholde ett eller flere konserveringsmidler (f.eks. metyl, etyl eller n-propyl p-hydroksybenzoat). I tilfeller hvor ett av legemidlene er tungt oppløselig eller bare litt oppløselig i vann, kan et oppløsningsøkende eller solubiliserende middel tilsettes, eller løsningsmidlet kan
- 15 inkludere 10-60 % vekt/vekt av propylenglykol eller liknende.

- Parenterale sammensetninger med kontrollert frigivelse kan være i form av vandige suspensjoner, mikrokuler, mikrokapsler, magnetiske mikrokuler, oljeoppløsninger, oljesuspensjoner eller emulsjoner. Alternativt kan det eller de aktive legemidler være
- 20 innlemmet i biokompatible bærere, liposomer, nanopartikler, implantater eller infusjonsanordninger. Materialer for anvendelse i fremstilling av mikrokuler og/eller mikrokapsler er f.eks. bionedbrytbare/bioeroderbare polymerer slik som polygalaktin, poly-(isobutylcyanoakrylat), poly(2-hydroksyetyl-L-glutamin). Biokompatible bærere som kan anvendes når formulert som en parenteral formulering og kontrollert
- 25 frigivelse, er karbohydrater (f.eks. dekstraner), proteiner (f.eks. albumin), lipoproteiner eller antistoffer. Materialer for anvendelse i implantater kan være ikke-bionedbrytbare (f.eks. polydimetylsiloksan) eller bionedbrytbare (f.eks. poly(kaprolakton), poly(glykolsyre) eller poly(ortoestere)).

30 Rektale sammensetninger

- For rektal anvendelse, vil passende doseformer for en sammensetning inkludere stikkpiller (emulsjonstype eller suspensjonstype), og rektale gelatinkapsel (oppløsninger eller suspensjoner). I en typisk stikkpilleformulering, er det eller de aktive legemidler kombinert med en passende farmasøytisk akseptbar
- 35 stikkpillebasis, slik som kakaosmør, forestrede fettsyrer, glyserinert gelatin, og forskjellige vannoppløselige eller dispergerbare basiser som polyetylenglykoler. Forskjellige tilsetningsstoffer, enhancere eller surfaktanter kan være innlemmet.

Perkutane og topiske sammensetninger

De farmasøytiske sammensetninger kan også administreres topisk til huden for
perkutan absorpsjon i doseformer eller formuleringer som inneholder konvensjonelle
5 ikke-toksiske farmasøytisk aksepterbare bærere og eksipienser som inkluderer
mikrokuler og liposomer. Formuleringene inkluderer kremer, salver, lotioner,
linimenter, geler, hydrogeler, oppløsninger, suspensjoner, stifter, sprayer, pastaer,
plastre og andre typer av transdermale legemiddelavleveringssystemer. De
farmasøytisk aksepterbare bærere eller eksipienser kan inkludere emulgeringsmidler,
10 antioksidanter, buffermidler, konserveringsmidler, fuktemidler, penetreringsøkende
midler, chelaterende midler, geldannende midler, salvebaser, parfymer og
hudbeskyttende midler.

Emulgeringsmidler kan være naturlig forekommende gummier (f.eks. gummi akasie
15 gummi eller tragakant gummi)

Konserveringsmidlene, fuktemidlene, de penetreringsøkende midlene kan være
parabener slik som metyl eller propyl p-hydroksybenzoat, og benzalkoniumklorid,
glyserin, propylenglykol, urea, osv.

20 De farmasøytiske sammensetninger som beskrevet ovenfor for topisk administrering
på huden kan også anvende samme topiske administrering på eller nær den delen av
kroppen som skal behandles. Sammensetningene kan tilpasses for direkte applikasjon
eller for applikasjon ved hjelp av spesielle legemiddelavleveringsanordninger, slik som
kompresser eller alternativt plastre, bind, svamper, strimler eller andre former for
25 passende fleksibelt material.

Doser og varighet av behandling

Det vil forstås at legemidlene i kombinasjonen kan administreres samtidig, enten i den
samme eller en forskjellig farmasøytisk formulering eller påfølgende. I en foretrukket
30 utførelsesform er legemidlene formulert sammen i den samme eksipiens eller bærer.
Dersom det er en påfølgende administrering, bør utsettelsen ved administrering av
den andre (eller ytterligere) aktive bestanddel ikke være slik at man mister fordelen
av den effektive effekten av kombinasjonen av de aktive bestanddelene. Et
minstekrav for en kombinasjon ifølge denne beskrivelse av kombinasjonen bør være
35 tiltenkt for kombinert bruk med fordelen av den effektive effekten av kombinasjonen
av de aktive bestanddeler. Den tiltenkte bruk av en kombinasjon kan utledes ved hjelp

av muligheter, foranstaltninger, tilpasninger og/eller andre midler for å understøtte bruken av kombinasjonen ifølge oppfinnelsen.

5 Terapeutisk effektive mengder av to eller flere legemidler som er formålet med denne oppfinnelse kan anvendes sammen for fremstilling av et medikament som er anvendbart for å redusere effekten av økt ekspresjon av PMP22-gen, forebygge eller redusere risikoen for å utvikle CMT1A-sykdom, stanse eller nedsette progresjon av CMT1A-sykdom når den har blitt klinisk manifestert, og forhindre eller redusere risikoen for en første eller påfølgende forekomst av en nevropatisk hendelse.

10

Skjønt de aktive legemidlene ifølge oppfinnelsen kan administreres i oppdelte doser, f.eks. to eller tre ganger daglig, er en enkelt daglig dose av hvert legemiddel i kombinasjonen foretrukket, med en enkelt daglig dose av alle legemidler i en enkelt farmasøytisk sammensetning (enhetsdoseform) som mest foretrukket.

15

Administrering kan være fra én til flere ganger daglig i flere dager til flere år, og kan være for pasientens levetid. Kronisk eller i det minste periodisk repetert langtidsadministrering vil være indikert i de fleste tilfeller.

20

- Betegnelsen "enhetsdoseform" refererer til fysisk adskilte enheter (slik som kapsler, tabletter, eller fylte sprøytesylindere), som er egnet for enhetsdoser for humane individer, hvor hver enhet inneholder en forhåndsbestemt mengde av aktivt materiale eller materialer som er beregnet til å produsere den ønskede terapeutiske effekt, sammen med den nødvendige farmasøytiske bærer.

25

Mengden av hvert legemiddel i kombinasjonen som er foretrukket for en enhetsdose vil avhenge av en rekke faktorer som inkluderer administreringsmetoden, pasientens kroppsvekt og alder, alvorligheten av den nevropatiske skade bevirket ved CMT1A-sykdom eller risiko for eventuelle bivirkninger under hensyntagen til den generelle helsestatusen til personen som skal behandles.

30

I tillegg kan farmakogenomisk (effekten av genotype på farmakokinetikken, farmakodynamikken eller effektivitetsprofilen til et terapeutikum) informasjon om en spesiell pasient påvirke den anvendte dosen.

35

Unntatt ved respondering på tilfeller med særlig svekkende CMT-sykdom der høyere doser kan være nødvendig, eller når barn behandles når lave doser bør velges, vil den

foretrukne dosen av hvert legemiddel i kombinasjonen vanligvis ligge innenfor området av doser som ikke er over den vanlige foreskrevne langtidsvedlikeholdsbehandlingen, eller som har vist seg å være sikre i store fase 3 kliniske studier.

5

For eksempel

- for metimazol, fra omtrent 0,5 til omtrent 15 mg pr. dag dersom inntatt oralt. De spesielle doser bør velges dersom administrert topisk.

10

- for pilokarpin, fra omtrent 0,1 til omtrent 20 mg pr. dag dersom inntatt oralt.

Den mest foretrukne dosen tilsvarer en mengde fra 1 % opp til 10 % av dem som vanligvis er forskrevet for langtidsvedlikeholdsbehandling.

15

Det vil forstås at mengden av legemidlet som faktisk administreres vil bestemmes av en lege sett i lys av de relevante forhold som inkluderer den tilstand eller tilstander som behandles, den nøyaktige sammensetning som skal administreres, alder, vekt og respons hos den individuelle pasient, alvorligheten av pasientsymptomer og den valgte administreringsrute. De overnevnte doseområder er derfor tiltenkt for å tilveiebringe generell veiledning og støtte for læren heri, men skal ikke begrense oppfinnelsens ramme.

20

Terapeutisk skjema, doser og ruter for administrering

25

Under er dosene for legemiddelkombinasjoner (som avviker i administrasjonsruter) i mennesker beskrevet.

Metimazol og pilokarpin

30

1 – Administrert oralt som en enkelt farmasøytisk sammensetning: metimazol fra omtrent 0,5 til omtrent 15 mg, og pilokarpin fra omtrent 0,1 til omtrent 20 mg hver dag oralt i flere måneder, hvor de mest foretrukne doser for begge legemidler i sammensetningen strekker seg fra 0,6 til 35 mg pr. enhet (pr. dag).

35

2 – Administrert samtidig oralt i flere måneder: metimazol fra omtrent 0,1 til omtrent 15 mg, og pilokarpin fra omtrent 0,02 til omtrent 20 mg hver dag oralt i flere måneder, hvor de mest foretrukne doser for begge legemidler i sammensetningen strekker seg fra 1,02 til 35 mg pr. enhet (pr. dag).

3 – Administrert samtidig i flere måneder: metimazol fra omtrent 0,05 til omtrent 15 mg, og pilokarpin fra omtrent 0,01 til omtrent 20 mg hver dag oralt i flere måneder, hvor de mest foretrukne doser for begge legemidler i sammensetningen strekker seg
5 fra 0,06 til 35 mg pr. enhet (pr. dag).

Dosene av dette legemiddel i en hvilken som helst kombinasjon blant dem som er angitt i den foreliggende oppfinnelse kan være forskjellige i formuleringer som er foreslått for behandling av menn eller kvinner.

10

Ytterligere aspekter og fordeler med den foreliggende oppfinnelse vil bli beskrevet i den etterfølgende eksperimentelle delen, som kun skal anses som illustrerende.

15 EKSEMPLER

15

I. In vitro forsøk

Kommersialisert rotte primære Schwann-celler

Rør av rotte Schwann-celler (SC) primærkultur (Sciencell #1700) tines og utsås til en
20 densitet på 10000 celler/cm² i "Sciencell Schwann cell medium" (basalmedium fra Sciencell # R1701) i poly-L-lysin pre-belagte 75 cm² kolber. Dyrkingsmediet er sammensatt av basalmedium, 5 % føtalt bovint serum (3H-Biomedical AB #1701-0025), 1 % Schwann-cellevekstsupplement (3H Biomedical AB #1701-1752), 1 % gentamicin (Sigma #G1397) og 10 µM forskolin (Sigma # F6886) for å fremme deres
25 proliferasjon.

Etter oppnåelse av konfluens (4 til 10 dager avhengig av cellebatch), renses Schwannceller ved forsiktig omrøring eller ved thy1.1 immunopanning som tillater SC-isolasjon fra adherente fibroblaster for å produsere kulturer som er minst 95 % rene,
30 SC telles deretter (tryptanblått-metode) og utsås i poly-L-lysin pre-belagte 75 cm² kolber i det samme SC-medium. Ved konfluens renses cellene, trypsinbehandles (trypsin-EDTA 1x fortynnet fra Invitrogen #1540054), fortynnet i PBS uten kalsium og magnesium), telles og utplates i 12-brønns plater (140000 celler/brønn) i Sciencell Schwann-cellemedium med 5 % FBS, 1 % cellevekstsupplement (CGS), 40 µg/ml
35 gentamicin og 4 µM forskolin.

Skreddersydde rotte primære Schwann-celler

Primære Schwann-cellekulturer (SC) etableres fra Sprague-Dawley isjiasnerver (mellom P0 og P2) fra nyfødte rotter. Alle nyfødte rotter avlives og isoleres i en petriskål. Disseksjon gjennomføres under sterile betingelser.

5 Rygghuden fjernes fra bakpoten og nedre del av kroppen. Isjiasnerven isoleres og overføres til en dyrkingsskål som inneholder iskald Leibovitz (L15, Invitrogen #11415) supplert med 1 % penicillin/streptomycinløsning (henholdsvis 50 UI/ml og 50 µg/ml; Invitrogen #15070) og 1 % bovint serumalbumin (BSA, Sigma A6003). Begge nerver pr. rotte overføres til et 15 ml rør som inneholder iskald L15. L15-mediet fjernes
10 deretter og erstattes med 2,4 ml DMEM (Invitrogen #21969035) med 10 mg/ml kollagenase (Sigma #A6003). Nerver inkuberes i dette medium i 30 minutter ved 37°C. Mediet fjernes deretter, og begge nerver dissosieres ved trypsin (10 % trypsin EDTA 10x, Invitrogen #15400054) fortynnet i PBS uten kalsium og magnesium (Invitrogen #2007-03) i 20 min. ved 37°C. Reaksjonen stanser ved tilsetning av
15 DMEM inneholdende DNase I kvalitet II (0,1 mg/ml Roche diagnostic #104159) og føtalt kalveserum (FCS 10 %, Invitrogen #10270). Cellesuspensjonen ble triturerert med en 10 ml pipette, og passert gjennom et filter i et 50 ml rør (Swinnex 13 mm filter enheter, Millipore, med 20 µm nylonduk filtre, Fischer). Cellesuspensjonen sentrifugeres ved 350 g i 10 min. ved romtemperatur (RT) og pelletene suspenderes i
20 DMEM med 10 % FCS og 1 % penicillin/streptomycin. Celler telles (tryptanblått metode) og utsås i Falcon 100 mm Primaria vevsdyrkingsplater ved densitet på 5×10^5 til 10^6 celler/skål.

Etter dyrking i ett døgn forandres mediet med DMEM, 10 % FCS, 1 %
25 penicillin/streptomycin og 10 µM cytosin b-D-arabinofuranosid (Sigma #C1768). 48 timer senere, elimineres medium og celler vaskes tre ganger med DMEM. SC-vekstmediet tilsettes deretter, sammensatt av DMEM, 10 % FCS, 1 % penicillin/streptomycin, 2 µM forskolin (Sigma #F6886), 10 µg/ml bovint pituitært ekstrakt (PEX, Invitrogen #13028). Mediet erstattes hver 2-3 dager.

30 Etter dyrking i 8 dager (4 til 10 dager avhengig av cellebatcher), når Schwann-celler konfluens og kulturen, som inneholder en stor mengde kontaminerende fibroblaster renses ved thy1.1 immunopanning metoden. Etter denne rensing, suspenderes celler i vekstmedium ved 10000 celler/cm² i poly-L-lysin pre-belagte 75 cm² kolber. Når de
35 når konfluens, vaskes cellene, trypsinbehandles (trypsin-EDTA), telles og utplates i 12-brønns plater (100000 celler/brønn).

Legemiddelinkubasjon:

Etter at cellene er utplatet i 12-brønns plater, erstattes mediet ved et definert medium som består av en blanding av DMEM-F12 (Invitrogen # 21331020) supplert med 1 % N2-supplement (Invitrogen # 17502), 1 % L-glutamin (Invitrogen # 25030024), 2,5 % FBS (Sciencell # 0025), 0,02 µg/ml kortikosteron (Sigma # C2505), 4 µM forskolin og 50 µg/ml gentamycin. Vekstfaktorer tilsettes ikke til dette medium for å fremme SC-differensiering.

24 timer senere erstattes mediet med et definert medium (DMEM-F12) supplert med 1 % Insulin-Transferrin-Selen-X (ITS, Invitrogen # 51300), 16 µg/ml putrescin (Sigma # P5780), 0,02 µg/ml kortikosteron og 50 µg/ml gentamicin. Ved dette trinn er verken progesteron eller forskolin tilstede i mediet.

En dag senere blir primære Schwann-celler stimulert med legemidler i løpet av 24 timer (3 brønner/betingelse). Fremstillingen av hver forbindelse gjennomføres like før tilsetning av celledyrkingsmediet.

Pilokarpin (SIGMA) ble testet i primære Schwann-celler ved 10 µM til 10 nM konsentrasjonsområde, mens metimazol (SIGMA) ble testet ved 10 µM, 1 µM, 100 nM og 10 nM.

Legemidler tilsettes for å definere medium sammensatt av DMEM-F12 med 1 % Insulin-Transferrin-Selen – X (ITS, Invitrogen # 51300), 16 µg/ml putrescin, 0,02 µg/ml kortikosteron, 10 nM progesteron og 50 µg/ml gentamicin. Fraværet av forskolin før og etter legemiddelstimulering unngår adenylatsyklase-metning.

Dyrkede Schwannoma-celler

Rotte schwannoma RT4-D6-P2T-cellelinje (ATCC # CRL-2498TM) tines i DMEM (ATCC # 30-2002) og 10 % FCS (Invitrogen # 10106). Cellene holdes ved 37°C i en fuktig inkubator, i en luftatmosfære (95 %)-CO₂ (5 %). Ved passering nr. 4, dissosieres cellene ved trypsinering (+1 ml trypsin-EDTA, 0,25 %-0,53 mM; Invitrogen) 5 til 15 min. ved 37°C. Reaksjonen stanses ved tilsetning av DMEM inneholdende 10 % føtalt bovint serum (FBS). Brønner telles i et Neubauer-cytometer ved anvendelse av trypanblått ekskluderings testen (Sigma). Suspensjonen tritureres med en 10 ml pipette, og cellene sentrifugeres deretter ved 350xg i 10 min. ved romtemperatur. Pelleten av dissosierte celler resuspenderes og utsås på grunnlag av 30000 celler/ml i 12 brønns plater. 48 timer senere erstattes mediet med et medium uten serum

(DMEM). Etter 15 timer stimuleres RT4-D6P2T-brønner ved legemidler tilsatt til celledyrkingsmediet ved den valgte konsentrasjon. Fremstillingen av hvert individuelle legemiddel eller legemiddelkombinasjon gjennomføres like før tilsetning derav til celledyrkingsmediet.

5

Kvantitativ revers transkriptase polymerasekjedereaksjon (Q-RT-PCR)

Kvantitativ RT-PCR anvendes for å sammenlikne nivåene av PMP22 mRNA etter legemiddelstimulering, i forhold til husholdning RPS9 mRNA i RT4-D6P2T-cellelinje.

10 8 timer etter legemiddelinkubasjon vaskes celler med kald sterilisert PBS, totale RNAer fra hver celleprøve ekstraheres og renses fra SC ved å anvende Qiagen RNeasy mikrokitt (Qiagen # 74004). Nukleinsyrer kvantifiseres ved Nanodrop spektrofotometer ved å anvende 1 µl RNA-prøve. RNA-integritet bestemmes gjennom et BioAnalyzer (Agilent) apparat.

15

RNAer blir revers-transkribert inn i cDNA i henhold til standard protokoll. cDNA-templater for PCR-amplifikasjon syntetiseres fra 100 ng total RNA ved å anvende SuperScript II revers-transkriptase (Invitrogen # 18064-014) i 60 min. ved 42°C i nærvær av oligo(dT), i et sluttvolum på 20 µl.

20

cDNAer underkastes PCR-amplifikasjon ved å anvende "LightCycler® 480" systemet Molecular Systems Inc.). Hver cDNA fortynnes fem ganger før anvendt for PCR-amplifikasjon. 2 µl av disse cDNA'er innføres i PCR-reaksjonsoppløsningen med 5 µl Master mix kit (Roche # 04-887301001) i et sluttvolum på 10 µl. Preliminære forsøk sikret at kvantifisering ble gjennomført i den eksponensielle fasen av

25 amplifikasjonsprosessen for begge sekvenser, og at reaksjonseffektiviteten er tilsvarende mellom målgene og husholdningsgen.

Taqman-kjemi ble anvendt for å gjennomføre RT-Q-PCR-analyse. PCR-reaksjon gjennomføres ved amplifikasjon av rotte PMP22 (NM_017037) ved å anvende 500 nM av hver primer (F og R) og 200 nM av probe Taq1 fra Sigma-Aldrich.

30

De følgende PCR-betingelser anvendes: Denaturering 5 min. ved 95°C fulgt av 10 sek. ved 95°C, 40 sek. ved 60°C, og 10 sek. ved 72°C, og 1 min. ved 40°C (førte

35 amplifikasjonssykluser). De relative nivåer av PMP22-geneekspressjon måles ved å følge $\Delta\Delta C_t$ -metoden som sammenlikner kvantiteten av produkter dannet fra målgene PMP22 og PMP22-ekspressjonsanalyse ved flow cytometri (FACS) 8 timer, 24 timer og 48

timer etter legemiddelinkubasjon, supernatanter av primære rotte Schwann-celler utvinnes, sentrifugeres og fryses. SC fraskilles med trypsin-EDTA. Så snart majoriteten av celler er i suspensjon, nøytraliseres trypsin ved å anvende DMEM med 10 % FCS.

5

Supernatanter med celler utvinnes og sentrifugeres. Pelletene av celler overføres til mikrorør, vasket i PBS én gang og fiksert med en spesifikk oppløsning (AbCys # Reagent A BUF09B). 10 minutter senere vaskes celler én gang med PBS og holdes ved 4°C.

10

Fem dager etter cellefiksering, blir alle cellepreparater med forskjellige inkubasjonstider merket ved å anvende etterfølgende protokoll.

15

Celler sentrifugeres ved 7000 rpm i 5 minutter, og pelletene suspenderes i en permeabiliseringsoppløsning (AbCys # Reagens B BUF09B) og merkes med primært PMP22-antistoff (Abcam # ab61220, 1/50) i 1 time ved romtemperatur. Celler sentrifugeres deretter ved 7000 rpm i 5 minutter, og cellepelleten vaskes én gang i PBS. Et sekundært antistoff tilsettes, koblet til Alexa Fluor 488 (geit anti-kanin IgG, Molecular Probes # A11008, 1/100), i én time ved romtemperatur. Celler sentrifugeres deretter ved 7000 rpm i 5 minutter, og cellepelleten vaskes én gang i PBS. Merkingen økes ved tilsetning av et tertiært antistoff koblet til Alexa Fluor 488 (høne anti-geit IgG, Molecular Probes # A21467, 1/100) for én times inkubasjon ved romtemperatur. Celler vaskes deretter én gang i PBS. Kontroll uten noe antistoff (umerkede celler) gjennomføres for å bestemme nivået av autofluorescens og tilpasse sensitiviteten for fotomultiplikatorene. Kontroll med både sekundære og tertiære antistoffer men uten primært antistoff, gjennomføres for å fastslå ikke-spesifikk binding av antistoffer.

25

30

Data-akvisisjon og analyser gjennomføres med et FACS Array cytometer og FACS Array software (Becton Dickinson) på 5000 celler. Forward Scatter (FSC) korrelerte med cellevolum (størrelse) og "Side Scatter" (SSC) avhengig av indre kompleksitet av celler (granularitet) analyseres. For ekspresjon av PMP22, gjennomføres analyser innen totale celler, og prosent av positive celler beregnes. Positive celler er celler med fluorescensintensitet som er høyere enn kontrollen med sekundært antistoff.

35

For å kvantifisere antall SC, analyseres celler i kontrollmedium ved å anvende antistoffer anti-S100-protein.

Celler fremstilles i henhold til den etterfølgende protokoll: Schwann-celler farges med antistoff anti-S100-protein (Dako # s0311, 1/100) i 1 time ved romtemperatur. Dette antistoff er merket i henhold til protokollen beskrevet ovenfor for PMP22 immunofarging, men uten inkubasjon med tertiært antistoff.

5

Resultater

Vi observerte at PMP22 mRNA-nivåer (fig. 1) er signifikant redusert i primære Schwann-celler, og at 1 μ M dose av pilokarpin induserer den viktigste PMP22 nedregulering. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; signifikant forskjellig fra kontroll (parvis student t-test). På høyre side, eksponert 24 timer for pilokarpin, er PMP22 mRNA-ekspressjonsnivåer signifikant nedregulert i primære Schwann-celler selv ved lave doser (10 nM og 50 nM). Likeledes observerte vi at pilokarpin (1 μ M) signifikant nedsetter PMP22-proteinekspressjonsnivået etter 24 timers inkubasjon, ved 38 % i primære Schwann-celler. Denne effekt er fremdeles signifikant etter 48 timers inkubasjon (-18 %, $p < 0,001$).

15

I et annet forsøk inkuberes legemidler angitt i tabell 1 med rotte schwannoma-cellelinje i løpet av 8 timer og PMP22 mRNA-ekspressjonsnivået kvantifiseres ved RT-Q-PCR. Oppfinnerne har observert (fig. 2) at mens metimazol (0,1 nM) og pilokarpin (0,001 nM), anvendt som individuelle legemidler, utviser ingen signifikant aktivitet på PMP22 mRNA-ekspressjonsnivå, er dette siste signifikant redusert ved deres kombinasjon. Den synergistiske aktiviteten av disse to legemidler er illustrert i fig. 2. Disse data viser at ved valgte konsentrasjoner er kombinasjonen av pilokarpin og metimazol i stand til signifikant å nedregulere ekspresjon av PMP22-gen i dyrkede Schwannoma-celler, mens pilokarpin og metimazol som er aktive ved høyere konsentrasjoner i primære Schwann-celler, ikke nedsetter ekspresjonsnivået av dette genet i dette system.

20

25

II. Forsøk in vivo i CMT-dyremodell

Oppfinnerne har testet forbindelser og kombinasjoner for terapeutisk effekt i CMT transgen rottemodell, hvor en hemizygot PMP22 transgen rotte som bærer tre ytterligere kopier av mus PMP22-gen viser tegn på demyelinering i perifere nerver og kranienerver (Sereda et al., 1996; Grandis et al., 2004). Ved mRNA-nivået, vil en gjennomsnittlig 1,6-ganger overekspressjon av PMP22 i CMT-rotter korrelere med den kliniske fenotypen. En putativ terskelverdi for PMP22-overekspressjon ved hvilken villtypegenet omdannes til et sykdomsgen, representerer et tydelig "mål" som skal nåes ved behandling som er tilsiktet for reduksjon av PMP22-genekspressjon.

35

Denne CMT rottemodell er en god tilnærming av human CMT1A-sykdom sett ut fra et klinisk synspunkt. Voksne CMT-rotter utviser en nedsettelse av motorisk nerveledningshastighet med verdier tilsvarende dem for CMT1A-pasienter, dvs. mindre enn 50 %. Etter isjiasnervestimulering, viser "compound muscle action potential" reduserte amplituder og desynkronisering. De histologiske og elektrofysiologiske forandringer står over de åpenbare kliniske tegn på motorisk svekkelse (Sereda et al., 1996, 2003). Aksonalt tap, bekreftet ved histologisk fremtredende muskelatrofi, matcher de humane CMT1A-symptomene. CMT-rotter tjente allerede som en modell for en eksperimentell CMT1A-terapi (Meyer zu Hörste et al. 2007). I denne modellen av CMT1A-sykdom, synes de åpenbare og gjemte tegn på patologi (lokomotorisk mangel, særlig endringer i elektrofysiologiske egenskaper og vevsegenskaper, og endelig nivået av PMP22-overekspressjon) å være de nærmeste til dem som man finner i CMT1A-pasienter.

Oppfinnerne har testet forbindelsene og kombinasjonene for terapeutisk effekt i en rottemodell. Eksperimentelle grupper dannes med unge rotter av begge kjønn separat. Rottene overføres til grupper i henhold til plan for randomisering basert på kroppsvekt. I noen forsøk er randomisering basert på rottenes yteevne i stang-testen ("bar test"). Begge kjønn er representert ved separate kontrollkullgrupper som er antallsmessig like eller større enn behandlingsgruppene.

Rottene behandles kronisk med legemidler – innført ved tvang eller injisert ved Alzet osmotisk subkutan pumpe (DURECT Corporation Cupertino, CA), avhengig av hver legemiddeltilgjengelighet i løpet av 3 eller 6 uker.

Dyrene veies to ganger pr. uke for å justere dosene i henhold til økende kroppsvekt. Dersom den osmotiske pumpen velges for å behandle administrering, beregnes dosene av legemiddel på grunnlag av estimert gjennomsnittlig kroppsvekt av dyrene som forventes med hensyn til deres alder over perioden med pumpevarigheten (6 uker). Pumpene reimplanteres om nødvendig, med den passende anestesiprotokoll.

Atferdstester

Hver tredje eller fjerde uke underkastes dyrene for en atferdstest. Hver test gjennomføres med den samme forsker i det samme rommet, og på det samme tidspunktet om dagen, denne homogenitet opprettholdes gjennom hele forsøket. Alle behandlinger og genotypebestemmelser er ukjent for forskeren. Stang-test og

gripestyrke ("Grip strength") er blitt hovedsakelig anvendt for å fastslå yteevne gjennom studien. Skjemaet for stang-test kan forandres ettersom dyret vokser (for å unngå avvik som skyldes f.eks. læring). Analysen av gripestyrken tillater deteksjon av subtile forskjeller i gripeyteevnen som synes å være sammensatt av muskelstyrken, sensitivitetsstatus (f.eks. smertefulle følbare følelser kan forandre målte verdier på styrken), atferdskomponent ("motivasjon"). Verdier avviker mellom forlemmer og baklemmer og avhenger i stor grad av dyrenes alder.

Gripestyrketesten måler styrken hvormed dyrene holder fast i et grep med dets forpoter eller dets bakpoter separat. Et dynamometer plasseres med et grep for å måle styrken (Force Gauge FG-5000A). Rotten holdes av eksperimentatoren på en slik måte at den griper fast enten med sine forpoter eller med sine bakpoter, og man drar forsiktig rotten bakover inntil den slipper grepet. Styrken som måles når dyret slipper grepet registreres.

To påfølgende forsøk ved måling av forpotestyrken og to påfølgende forsøk ved måling av bakpotestyrken pr. dyr gjennomføres, og kun maksimal skår (én for forpoter og én for bakpoter) konstateres (i N).

20 Stang-test

Stang-test evaluerer rottenes evne til å holde på en fast stang. PMP22-rotter som fremviser muskulær svakhet, utviser en manglende yteevne i denne test (Sereda et al., 1996). Rotten plasseres på sine fire poter på midten av stangen (diameter: 2,5 cm, lengde: 50 cm, 30 cm over bordet). Forsøk gjennomføres påfølgende, antallet (5 eller 10) og varigheten (30 eller 60 sek.) av forsøk i våre eksperimenter er blitt avhengig av dyrenes batcher. Denne variabilitet ved testing er blitt introdusert for å bestemme den plan som anses for den beste deteksjon av motorisk defisiens i CMT-rottene under forsøkene.

30 Yteevneindekser er registrert for hver økt:

- Antall forsøk som er nødvendig for å holde i 60 sek. eller 30 sek. på stangen.
- Gjennomsnittlig tid som er brukt på stangen (dvs. fall-latens) i hvert forsøk og gjennomsnittet for økten. I de eksperimentelle prosedyrer ender øktene etter at rottene har oppholdt seg to ganger i en varighetstid ("cut-off time"), dvs. 30 eller 60 sek., på stangen. En atferd med en varighetstid (30 sek. eller 60 sek.) angis som forsøk som ikke er avsluttet.

- Antall fall.

Generell helsevurdering

5 Kroppsvekt, åpenbare tegn (pelsutseende, kroppsholdning, skjelving) hos dyrene måles gjennom forsøk. Vuderingskalaen anvendes for registrering: 0 = normal, 1 = unormal.

Gangen

10 Hver rotte observeres i et nytt rottebur (dimensjoner 55x33x18 cm) uten strø i 5 minutter. Gangen til rottene evalueres med 4 parametere:

- Skår 0 : normal gang (flytende)
- Skår 1 : unormal gange (ikke flytende eller rotten har en liten halting)
- Skår 2 : moderat uførhet (rotten drar på ett av bena, og er i stand til å sette det riktig og gå)
- 15 - Skår 3 : alvorlig uførhet (rotten drar på sin ene eller begge bakpoter, men er ikke i stand til å stille dem riktig).

Skråplantest

20 Skliapparatet hadde et 30x50 cm plexiglassplan som kunne helles i en vinkel fra 0° (horisontalt) til 60°. Hver rotte ble først plassert på et plan som hadde en helning på 25° på et plan i en opp-hodet posisjon (hode-opp orientering), og to forsøk som er separert ved 1 min. gjennomføres. 30 minutter senere gjennomføres det samme forsøk på et plan med helning 35° og deretter på et plan med helning 40°. Under denne tiden fikk rottene vende tilbake til buret. Planet vaskes etter hvert forsøk.

25

Rottenes atferd evalueres ved hjelp av 4 forskjellige skårer:

- Skår 0 : ingen skliing
- Skår 1 : litt skliing (én eller to poter)
- Skår 2 : moderat skliing (4 poter) men ikke til enden av planet
- 30 - Skår 3 : rotten skled helt ned til bunnen av planet.

Elektrofysiologi

35 Når passende, underkastes rottene for elektrofysiologisk evaluering: den sensitive nerveledningshastighet så vel som latenser og potensiell amplitude måles. NCV-måling og potensiell akvisisjon (subkutan) ble gjennomført ved hjelp av kjeden som var sammensatt av en amplifikator (AM System 1700 og/eller EMG-UTC), en stimulator

(Havard-apparat 223) og en computer utstyrt med et akvisisjonskort og software for akvisisjon (SPATOL) og for signalbehandlingen (CALVISE).

Dyr ble bedøvet ved anvendelse av ketamin/xalazin, og ble holdt på en termostatplate ved 37°C gjennom hele testen (anestetika ble supplert etter behov). Stimulerende sølvnåleelektroder ble innført i halens proksimale del. Registreringselektroden ble innført subkutan gjennom omtrent 1 mm hud i halens distale del (4 og 6 cm fra den stimulerende elektroden). Konstant-strøm kvadratbølge stimuli, varighet 0,2 sek., ble administrert ved en hyppighet av 0,3 pr. sekund. Responser, amplifisert 5000-20000, ble visualisert og samlet på et computerbasert data-akvisisjonssystem. Latenser ble målt ved hver bølgeinntreden (definert som første klart identifiserbare defleksjon fra basislinjen). Topp til topp amplituder av de største defleksjoner ble beregnet for å bestemme maksimal amplitude. For hver registrering, ble målinger gjennomført på de gjennomsnittlig beregnede responser for minst ti identiske stimuli. "Sensory related conduction velocity" (SNCV) ble beregnet ved å dele avstanden mellom de stimulerende katoder med forskjellen mellom de tilsvarende latenser oppnådd fra de to stimuleringssteder.

Histologiske målinger

Etter de endelige tester (behandlinger fortsatt inntil den siste dagen), ble rottene avlivet. Bakfoten av villtype og transgene rotter ble dissekert og fiksert ved nedsenking i 4 % formoloppløsning i 48 timer, og overført til en 10 % formoloppløsning i 2 ytterligere dager. Etter vasking i 15 min. i vann, ble de deretter bearbeidet for dekalsifikasjon i 26 timer (Labonord Décalcifiant rapide nr. 3 # DC3_09128300).

Føttene ble deretter delt på tvers i to deler som bearbeides for osmiumfarging.

Vev henges opp over 1 % osmiumtetroksydoppløsning (VWR, Osmium VIII oksid 0,5 # 20551.076) i 24 timer, og vaskes deretter med demineralisert vann i 4 til 6 timer. Vev dehydratiseres deretter i innestøpingsautomat (VIP2000 Vertical, Bayer Diagnostics) og blir klassisk innestøpt i parafin.

Vevssnitt på 4 µm dehydratiseres påfølgende i xylene- og alkoholbad og prepareres (Pertex glue, #T/00811_MICROM) for ytterligere analyser.

Bildeanalyser

Snitt fra 6 dyr ble omhyggelig valgt for å illustrere det samme anatomiske nivået (tå-forbindelsespunkt) og analyseres under Olympus-mikroskop koblet med Saisam microvision software (Archimed Pro® 1997-2000 av Microvision Instruments).

5 Perifere nerver lokaliseres og analyseres som følger: sirkulerte myelinerte fibre telles (i en nervebunt på minst 150 fibre/dyr). "Cylindraxe" diametere som tilsvarer indre perimetere av myelinerte fibre og ytre perimetere av de samme fibre bestemmes. Deretter sammenliknet vi fordelingen av myelintykkelse og aksondiameter i villtype og transgene dyr.

10

Videre måler vi optimal densitet av den samme nervedelen for å bestemme om det ikke-myelinerte fiberinnhold (ikke synlig på osmosium- snitt, og derfor ikke analysert) er høyere i transgene mus (reflektert ved et globalt blekt utseende for nervedelen).

15

Endelig blir alle fotmuskler tilstede på det samme snittet som anvendt for nerveanalyser skildret manuelt for å bestemme global muskeloverflate. Vi kan beregne forholdet "muskelinnhold/snittoverflate".

20

Isjiasnerver skjæres ut og anvendes for veiing så vel som for molekyllær biologi og/eller biokjemiske forsøk. (RT-Q-PCR for PMP22 mRNA og Western blot for myelinproteinkvantifiseringer; Cayman's EIA kit – for biokjemiske markører slik som arakidonsyremetabolitter, HPLC-kvantifikasjon for steroider og aminer, ELISA for CNTF, IL-6 osv.) gjennomført i henhold til generelt anvendte protokoller og analytiske prosedyrer (legemiddelkonsentrasjonsmålinger).

25

Det tas prøver fra muskler fra baklemmer (soleus), de veies og hurtigfryses, og konserveres ved -80°C inntil analyse (det samme som for isjiasnerver).

Resultater

30

Metimazol (0,35 mg/kg daglig dose) og pilokarpin (0,2 mg/kg daglig dose) administrert ved tvungen fôring forbedrer stangtest-yteevnen gjennom behandlingsprosedyren (fig. 3), mens en forbindelse PXT25 (som her kun er presentert og sammenlikning) knapt viser noen forbedring.

35

De motoriske ytelser var gjennomsnittlig tre ganger mindre vellykket i forskjellig CMT TG-rotter behandlet med placebo sammenliknet med villtype (WT) gruppe. Behandlingen med metimazol og pilokarpin tillot forbedring av TG-dyrene i dette

forsøk, effekten blir statistisk signifikant så tidlig som etter 8 uker med tvangsfôring. Dataene viser at CMT-rotter behandlet med metimazol og pilokarpin ved disse relativt høye dosene ble signifikant mer presterende sammenliknet med placebogrupperen. Gruppen behandlet med forbindelsen pilokarpin fikk til og med tilbake ytelsesnivået som ikke lenger avviker signifikant fra det til WT placebogrupperen.

SNAP målt på den distale del av halen ble funnet til å være signifikant nedsatt i TG placebogrupperen som kan reflektere det viktige aksonale tap, som i sin tur skyldes demyelineringen. Denne elektrofysiologiske parameter viste seg å bli signifikant forbedret ved behandling med forbindelse A (fig. 4) mens SNAP for de transgene rottene behandlet med forbindelse B nærmer seg nominell 5 % terskelverdi for signifikans.

Denne observasjon tillater oss å anta at virkningen av metimazol kan forhindre aksontap, selv om myelineringstatusen for de perifere nerver ikke er målbart forbedret. Effekten av pilokarpin synes å være i alt vesentlig den samme, selv om, på grunn av intragruppe-variabiliteten, forskjellen med placebo gruppe parameteren mislykkes i å nå statistisk signifikans. I CMT1A var "sensory nerve action potential" (SNAP) amplituden mer redusert, og SNAP-varighet mer forlenget enn i CMT2. Reduksjonen av sammensatt muskelvirkningspotensial (CMAP) og SNAP-amplituder i CMT1A er sannsynligvis en kombinert effekt av demyelinering og aksonal dysfunksjon (Bienfait et al., 2006).

På slutten av studien er morfometriske analyser blitt utført. Denne måling av vev fra bakfot viser at isjiasnerver og soleusmuskler er signifikant redusert i CMT hunnrotter behandlet med placebo sammenliknet med kontroll WT-rottene (fig. 5).

Disse mangler synes å bli fullstendig korrigert ved forbindelse A-behandling: de absolutte masser av musklene og nervene er til og med høyere enn i kontroll WT-rottene, mens den totale kroppsvekten er snarere nedsatt i forbindelse A-gruppen sammenliknet med placebogrupperen (data ikke vist). Effekten av pilokarpinbehandling på bakfotmuskler og nerver synes å være mindre enn den for metimazol.

Blanding 1 (tabell 1) ved 50 ganger lavere doser av metimazol (4 mkg/kg) og pilokarpin (7 mkg/kg) forbedrer skåren for gange for hunnrotter etter 10 uker med tvangsfôringsbehandling som vist i figur 6. Vi observerte en positiv trend etter 6 ukers behandling.

De etterfølgende figurer illustrerer den positive effekten av blanding 2 (tabell 1) som inneholder pilokarpin (7 mkg/kg); metimazol (4 mkg/kg), mifepriston (40 mkg/kg), naltrekson (4 mkg/kg), baklofen (60 mkg/kg) og sorbitol (2 mg/kg) på hannrotter i tre forskjellige tester for atferd og elektrofysiologi.

Figur 7 viser at blanding 2 ved disse doser nedsetter økning av eksitabilitets- terskelverdien funnet i CMT placebo-rotter etter en elektrisk stimulering av kaudalnerve.

10

Figur 8 viser den positive effekten av blanding 2 på hanners atferd på stangtesten; etter 4 ukers behandling er antall fall nedsatt, og tiden som er tilbrakt på staven er økt.

Figuren illustrerer det faktum at blanding 2 også forbedrer gangen til hannrotter etter tre ukers behandling; prosentandel rotter som går med en flytende gange er økt med 35 % for de behandlede rotter sammenliknet med CMT placebo-rotter.

Tilsvarende resultater oppnås for andre kombinasjoner, og oppsummering av resultater er vist i tabell 1.

20

POS: reversering av sykdomssymptomer in vivo

[illegible]

*	
Propyl- tiouracil	

Disse data viser at in vivo vil kombinasjonene og regimene ifølge oppfinnelsen tillate effektiv behandling av CMT.

III. In vivo effekt i en toksisk nevropatimodell

5 Legemiddelbehandlinger eller regimer er oralt administrert fra dagen før den første intraperitoneale injeksjon av oksaliplatin 3 mg/kg (D-1) inntil dagen før den siste testdag (D16). Dyrene som tilhører den oksaliplatinbehandlede gruppen doseres daglig med destillert vann (10 ml/kg). Dyr doseres med testbehandling og destillert vann daglig om morgenen, mens oksaliplatin
10 administreres på ettermiddagen.

Under testdagene (dvs. D1, D4, D10), administreres behandling og destillert vann etter testen. Med hensyn til testdagen (D4), som inkluderer forbindelse- og vehikkel-administreringer og oksaliplatininjeksjon, administreres
15 behandling og destillert vann før injeksjon av oksaliplatin etter testen. Dyr fra referansebehandlingsgruppen doseres kun under testdagene (dvs. D1, D4, D10 og D17). Kald allodyn timer fastslås ved å måle responsen på termisk ikke-nociseptiv stimulering (acetontest) på D1 (rundt 24 timer etter første injeksjon av oksaliplatin 3 mg/kg (akutt effekt av oksaliplatin)), på D4, D10
20 og (kronisk effekt av oksaliplatin) og på D17 (resteffekt av oksaliplatin én uke etter endt behandling). Testing gjennomføres ved å anvende acetontesten to timer etter administrering av referanse. Referansesubstansen er gabapentin, 100 mg/kg, per os (én gang pr. dag x 4 testdager).

Acetontest

25 Kald allodyn timer fastslås ved å anvende acetontest. I denne testen måles latens for bakpotetilbaketrekking etter applikasjon av en dråpe aceton på den plantære overflaten av begge bakpoter (reaksjonstid) og intensiteten av responsen skåres (kald skår).

30 Reaksjonstid inntil kjøleeffekten av aceton måles i løpet av 20 sek. ("cut-off") etter acetonapplikasjon. Responser på aceton er også gradert i henhold til følgende 4-punkt skala: 0 (ingen respons); 1 (rask tilbaketrekking, rask bevegelse av poten), 2 (forlenget tilbaketrekking eller markert rask bevegelse
35 av poten), 3 (gjentatt rask bevegelse av poten med slikking eller biting).

Seks forsøk med rotte gjennomføres. For hver forsøksgruppe er resultatene uttrykt som den kumulative kaldskåren definert som summen av de seks skårer for hver rotte sammen $\pm$ SEM. Minimumskår er 0 (ingen respons på noen av de seks forsøk) og maksimal mulig skår er 18 (gjentatt rask bevegelse og slikking eller biting av poter i hvert av de seks forsøk).

Gabapentin: Kilde: Zhejiang Chiral Medicine Chemicals, Kina

Oksaliplatin: Kilde: Sigma, Frankrike

Resultater

Resultater av testing av blanding 2 i oksaliplatin er vist i figur 10. Det fremgår klart at blanding 2 beskytter dyr fra nevropati induisert ved toksisk legemiddelbehandling.

IV. In vivo effekt i en modell av ALS

Dyremodell

Vi har valgt SOD1^{G93A} rottemodellen (generert av Howland DS et al., 2002) for å etterlikne amyotrofisk lateralsklerose patologi. Denne modellen overuttrykker det muterte SOD1-genet i ryggmarg, mange hjerneregioner, så vel som perifere vev (Howland DS et al., 2002). Inntreden av motorisk nervesykdom i denne modell er omtrent ved 115 dager (Howland DS et al., 2002); den fremkommer som unormal gange med hensyn til baklem. I løpet av noen få dager oppstår paralyse av baklem.

Eksperimentelle prosedyrer

Vi oppnådde kolonier ved å krysse avlsrotter SOD1^{G93A} med Sprague Dawley hunnrotter. Heterozygote SOD1^{G93A} rotter ble identifisert med polymerase kjedereaksjon (PCR) av hale-DNA med primere spesifikke for hSOD1 (Howland DS et al., 2002). Dyr ble holdt i et rom med regulert belysning (lys på 0500-1900 t) og temperatur ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), og ble gitt fri tilgang til fôr og vann. Alle dyreprosedyrer i den foreliggende studie ble gjennomført i overensstemmelse med retningslinjestandarder i forbindelse med dyrehold.

Kroppsvektmåling blir gjennomført hver uke, og atferdstester begynte i en alder av 60 dager, og fortsatte inntil slutt punktet. Behandlinger ble administrert hver dag oralt eller subkutan fra en alder av 5 uker.

Observasjonstest: karakterisering av det generelle aspekt

Hver rotte ble observert i et nytt rottebur (dimensjoner 55x33x18 cm) uten strø i fem minutter. Fem forskjellige parametere ble registrert:

5 **Gange**

- Skår 0: normal gange (flytende)
- Skår 1: unormal gange (ikke flytende eller rotten hadde en lett halting)
- Skår 2: moderat uførhet (rotten dro på det ene benet, og var i stand til å sette det riktig og gå)
- Skår 3: alvorlig uførhet (rotten drar på den ene eller begge bakpoter, men er ikke i stand til å sette den/dem rett)

10

Pelsaspektet

15

- Skår 0: ren og silkeaktig pels
- Skår 1: piloereksjon eller skitten pels

Skjelving

20

- Skår 0: ingen skjelving
- Skår 1: skjelving

Kroppsstilling

25

- Skår 0: normal
- Skår 1: unormal (utflating av eller krumming av ryggen)

Bakpoteposisjon

- Skår 0: normal
- Skår 1: spredte bakpoter

30

Motorisk skårtest: karakterisering av motorisk svikt

Denne test evaluerer rottens evne til å rette opp seg selv i løpet av 30 sekunder etter at de er blitt snudd på hver side (opprettingsrefleks) (Gale K. et al., 1985).

35

Et ikke-parametrisk skåringssystem ble anvendt i henhold til disse kriterier (Matsumoto A. et al., 2006; Thonhoff JR et al., 2007):

- Skår 0: rotten er ikke i stand til å rette seg opp fra begge sider i løpet av 30 sekunder;
- Skår 1: rotten er ikke i stand til å rette seg selv opp fra kun én side innen 30 sekunder;
- 5 - Skår 2: rotten er i stand til å rette seg selv opp fra begge sider i løpet av 30 sekunder, men er ikke i stand til å stå i buret; den sleper alltid på noen kroppsdel;
- Skår 3: rotten er i stand til å rette seg selv opp fra begge sider i løpet av 30 sekunder, den er ikke i stand til å stå i buret, men
- 10 sleper ikke på noen kroppsdel;
- Skår 4: Rotten er i stand til å rette seg selv opp fra begge sider i løpet av 30 sekunder, den er i stand til å stå i buret, men har synlig funksjonell mangel;
- Skår 5: rotten er i stand til å rette seg selv opp fra begge sider i
- 15 løpe av 30 sekunder, den er i stand til å stå i buret, og har ingen synlige funksjonelle mangler.

Endepunktet for sykdom er satt ved skår 0, da rotten avlives.

20 Skråplantest: karakterisering av motorisk svikt

Glideapparatet hadde et 30x50 cm pleksiglassplan som kunne helles i en vinkel fra 0° (horisontal) til 60°. Hver rotte ble først plassert på det 25° vinklede skråplanet i en posisjon med hodet oppover (hodet-opp orientering); to forsøk separert ved 1 min. ble gjennomført. 30 min. senere gjennomføres

25 det samme forsøk på et 35° vinklet skråplan, deretter på et 40° vinklet skråplan. Under denne tiden ble rotten returnert til buret. Planet renses etter hvert forsøk.

Rottens atferd evalueres ved fire forskjellige skårer:

- 30 - Skår 0: ingen skliing
- Skår 1: litt skliing (én eller to poter)
- Skår 2: moderat skliing (4 poter) men ikke til enden av planet
- Skår 3: rotten skled helt ned til bunnen av planet

35 Tråddukstesten: karakterisering av den motoriske evnen i en vanskelig situasjon

En trådduk ble plassert i kontakt med en boks på toppen (i en vinkel på 70°), og kanten av et bord i bunnen (Thonhoff JR et al., 2007). Hver rotte ble plassert på bunnen av trådduken, og blir motivert til å klatre opp ved å plassere deres matskåler i boksen på toppen. Hver rotte ble trent én gang pr. uke (3 forsøk).

Den registrerte parameter var latenstiden inntil man nådde toppen av trådduken.

10 Åpen felt testen: karakterisering av den lokomotoriske aktivitet

Lokomotorisk aktivitet ble målt i en pleksiglassboks (45x45x30 cm, Acti-Track ved BIOSEB, Lyon, Frankrike) med 16 fotocelle stråler som følger de to akser, 1 og 5 cm over gulvet.

15 Den spontane og undersøkende aktiviteten hos hver rotte ble evaluert i løpet av tre timer. Fire parametere registreres (totalt tilbakelagt distanse, antall ganger rotten reiste seg opp, prosentandel tilbakelagt distanse, og tiden som dyret oppholdt seg midt i det åpne området).

20 **Bibliografi**

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.

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

30 Anger T, Klintworth N, Stumpf C, Daniel WG, Mende U, Garlich CD, RGS protein specificity towards Gq- and Gi/o-mediated ERK 1/2 and Akt activation in vitro. J Biochem Mol Biol. 2007; 40(6):899-910.

35 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; 76(4): 443-449.

Bassi S, et al., Encephalo myelitis with thyro toxicosis. J Neur. 1978; 218(4): 293-296.

5 Batty IH, Fleming IN, Downes CP. Muscarinic-receptor-mediated inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor-stimulated phosphoinositide 3-kinase signaling in 1321N1 astrocytoma cells. Biochem J. 2004; 379(Pt3): 641-651.

10 Bienfaith HM, Verhamme C, van Schaik IN, Koelman JH, de Visser BW, de Haan RJ, Baas F, van Engelen BG, de Visser M. Comparison of CMT1A and CMT2: similarities and differences. J. Neurol. 2006 des; 253(12): 1572-80.

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

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

20 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 Cosgaya J. M., Chan J. R., Shooter E. M. 2002. The Neurotrophian Receptor p75NTR as a Positive Modulator of Myelination Science 298; 1245-1248.

30 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.

D'Urso D, Ehrhardt P, Müller HW. PMP22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. J Neurosci. 1999; 19(9): 3396-3403.

35 Fortun J, Dunn WA Jr, Joy S, Li J, Notterpek L. Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. J Neurosci. 2003; 23(33): 10672-10680.

- Fortun J, Go JC, Li J, Amici SA, Dunn WA Jr, Notterpek L. Alterations in degradative pathways and protein aggregation in a neuropathy model based on PMP22 overexpression. *Neurobiol Dis.* 2006; 22(1): 153-164.
- 5 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. *Neur. Dis.* 2007; 25(2): 252-265.
- 10 Keltner J. et al. Myotonic pupils in Charcot-Marie-Tooth disease. *Archives of ophtalmogy*, 1975; 93(11): 1141-1148.
- 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
15 phenotype of the Trembler-J mouse: a potential therapy for inherited neuropathy. *Am J Hum Genet.* 2007; 81(3): 438-453.
- King TD, Song L, Jope RS. AMP-activated protein kinase (AMPK) activating agents cause dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase-3.
20 *Biochem Pharmacol.* 2006; 71(11): 1637-1647.
- 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.
- 25 Ma W, Li BS, Zhang L, Pant HC. Signaling cascades implicated in muscarinic regulation of proliferation of neural stem and progenitor cells. *Drug News Perspect.* 2004; 17(4): 258-266.
- 30 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
35 transgenic rad model of CMT1A neuropathy. *Ann. Neurol.* 2007; 61 (1): 61-72.

- Nave KA, Sereda MW, Ehrenreich H. Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007; 3(8): 453-464.
- 5 Niemann S, Sereda MW, Rossner M, Stewart H, Suter U, Meinick HM, 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.
- 10 Notterpek L, Shooter EM, Snipes GJ. Upregulation of the endosomal-lysosomal pathway in the trembler-J neuropathy. *J Neurosci.* 1997; 4190-4200.
- 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.
- 15 Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J. Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontes M. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of CMT disease. *Nature Med.* 2004; 10(4): 396-401.
- 20 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.
- 25 Rangaraju S., Madorsky I., Go Pileggi J., Kamal A., Notterpek L. 2008. Pharmacological induction of the heat shock response improves myelination in a neuropathic model *Neurobiology of Disease* 32; 105-115.
- 30 Roa BB, et al., Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med.* 1993; 329(2): 96-101.
- 35 Robaglia-Schlupp A, Pizant J, Norreel JC, Passage E, 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.

- 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.
- 5 Sereda M. et al. A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron*. 1996; 16(5): 1049-60.
- 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).
10 *Nat Med* 2003; 9: 1533-1537.
- Sereda MW, Nave KA. Animal models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A). *Neuromol Med* 2006; 8: 205-215.
- 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.
- 20 Tashiro H, Fukada Y, Hoshino S, Furukawa M, Shintaku S, Ohdan H, Dohi K. Assessment of microchimerism following rat liver transplantation. *Transplant Proc.* 1996 jun; 28(3): 1279-80.
- 25 Thomas PK, Marques W Jr, Davis MB, Sweeney MG, King RH, Bradley JL, Muddle JR, Tyson J, Malcolm S, Harding AE. The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain* 1997; 120 (Pt 3): 465-478.
- 30 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.
- 35 Ulzheimer JC, Peles E, Levinson SR, Martini R. Altered expression of ion channel isoforms at the node of Ranvier in P0-deficient myelin mutants. *Mol Cell Neurosci.* 2004; 25(1): 83-94.

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

5

Zelman SJ, Rapp NS, Zenser TV, Mattammal MB, Davis BB. Antithyroid drugs interact with renal medullary prostaglandin H synthase. *J Lab Clin Med.* 1984; 104(2): 185-192.


```

gtg atc ctg cgg aaa cgc gaa tga ggcgcccgcac gcaccatccg tctaggctct 720
Val Ile Leu Arg Lys Arg Glu
155 160

gagcgtgcat aggggtacaca gggagggagg aaggaaacca gaaaaccaa ccaaccaacc 780
caaaagagct agcccccaaa cccaaacgca agccaaacca aacagaacac agttgagtgg 840
ggattgctgt cgattgaaga tgtatataat atctatgggt tataaaacct atttataaca 900
ctttttacat acatgtacat aggattgttt gctttttatg ttgaccgtca gcctcgtgtt 960
gaatctttaa cgactctaca tcctaacact ataaccaagc tcagtatttt cgttttgttt 1020
cgtttttttc atctttttgt tttgctcaga cataaaaaaa aaaaaatcca cgtggccccc 1080
tttcatctga aagcagatcc ctccctcca ttcaacctca taggataacc aaagtgcggg 1140
gacaaacccc agatggccag aggttcacac tatgggtgac ccagtgaatt tagcaggaat 1200
aatccgctgc ccgaatcaat gtgtgaagcc ctaagcactc acagacgaaa cgccctgacc 1260
agagccctct gcgaaaccaa tagctggtgg ctgcggaaca cttgaccctg aaggcggagt 1320
actggggcca catgttttaa tgagacgtca gagacaagca atctgtgaaa tgggtctata 1380
gatttaccat tccttggtat tactaatcat ttaaaccact cactggaaac tcaattaaca 1440
gttttatgac ctacagcaga acagagaccc gatacaaacg gttcgtact gctttcgtac 1500
atagctaggc tggtgttatt actacaataa ataaatctca aagccttcgt cactcccaca 1560
gttttctcac ggtcggagca tcaggacgag cgtctagacc cttgggacta gcaaattccc 1620
tggttttctg ggtctagagt gttctgtgcc tccaaggact gtctagcgat gacttgatt 1680
ggccaccaac tgtagatgta tatacgggtg cttctgatg ctaagactcc agacctttct 1740
tggttttgct tgctttttct gattttatac caactgtgtg gactaagatg cattaaaata 1800
aacatcagag taactc 1816

```

```

<210> 2
<211> 160
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

```

```
<400> 2
```

```

Met Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ile Leu Phe Leu His Ile Ala Val Leu
1 5 10 15

```

```

Val Leu Leu Phe Val Ser Thr Ile Val Ser Gln Trp Leu Glu Gly Asn
20 25 30

```

```

Gly His Arg Thr Asp Leu Trp Gln Asn Cys Thr Thr Ser Ala Leu Gly
35 40 45

```

```

Ala Val Gln His Cys Tyr Ser Ser Ser Val Ser Glu Trp Leu Gln Ser
50 55 60

```

```

Val Gln Ala Thr Met Ile Leu Ser Val Ile Phe Ser Val Leu Ser Leu
65 70 75 80

```

50

Phe Leu Phe Phe Cys Gln Leu Phe Thr Leu Thr Lys Gly Gly Arg Phe
85 90 95

Tyr Ile Thr Gly Val Phe Gln Ile Leu Ala Gly Leu Cys Val Met Ser
100 105 110

Ala Ala Ala Ile Tyr Thr Val Arg His Ser Glu Trp His Val Asn Asn
115 120 125

Asp Tyr Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Ile Leu Ala Trp Val Ala Phe Pro
130 135 140

Leu Ala Leu Leu Ser Gly Ile Ile Tyr Val Ile Leu Arg Lys Arg Glu
145 150 155 160

<210> 3
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Forward primer_rat PMP22

<400> 3
ggaaacgcga atgaggc

17

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Reverse primer_rat PMP22

<400> 4
gttctgtttg gtttgctt

19

<210> 5
<211> 690
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (15)..(626)

<400> 5
ggcggctgcc gaag atg gcg gag ggg cag gtt cta gta ttg gat ggc cgg
Met Ala Glu Gly Gln Val Leu Val Leu Asp Gly Arg
1 5 10

50

ggc cat ctt ctg ggc cgc ctg gcg gcc att gtg gcc aag cag gta ctg
Gly His Leu Leu Gly Arg Leu Ala Ala Ile Val Ala Lys Gln Val Leu
15 20 25

98

ctg ggc cga aag gtg gtg gtt gta cgc tgt gag ggc atc aac att tct
Leu Gly Arg Lys Val Val Val Val Arg Cys Glu Gly Ile Asn Ile Ser
30 35 40

146

gga aat ttc tac aga aac aag tta aag tat ctg gcc ttt ctc cga aag
Gly Asn Phe Tyr Arg Asn Lys Leu Lys Tyr Leu Ala Phe Leu Arg Lys
45 50 55 60

194

cgg atg aac acc aac ccg tct cga ggc ccc tac cac ttc cga gcc cca 242
 Arg Met Asn Thr Asn Pro Ser Arg Gly Pro Tyr His Phe Arg Ala Pro
 65 70 75
 agc cgc att ttt tgg cgc act gtg cga ggc atg ctg ccg cac aag acc 290
 Ser Arg Ile Phe Trp Arg Thr Val Arg Gly Met Leu Pro His Lys Thr
 80 85 90
 aaa aga ggc cag gct gcc ctg gaa cgc ctc aag gtg ttg gat ggg atc 338
 Lys Arg Gly Gln Ala Ala Leu Glu Arg Leu Lys Val Leu Asp Gly Ile
 95 100 105
 cct cca ccc tat gac aag aaa aag cgg atg gtg gtc cct gct gcc ctc 386
 Pro Pro Pro Tyr Asp Lys Lys Lys Arg Met Val Val Pro Ala Ala Leu
 110 115 120
 aag gtt gtg cgg ctg aag cct acc aga aag ttt gct tac ctg ggg cgt 434
 Lys Val Val Arg Leu Lys Pro Thr Arg Lys Phe Ala Tyr Leu Gly Arg
 125 130 135 140
 ctg gct cat gag gtc ggg tgg aag tac cag gca gtg aca gct act ctg 482
 Leu Ala His Glu Val Gly Trp Lys Tyr Gln Ala Val Thr Ala Thr Leu
 145 150 155
 gag gag aaa cgg aag gaa aag gca aag atc cat tac cgg aag aag aag 530
 Glu Glu Lys Arg Lys Glu Lys Ala Lys Ile His Tyr Arg Lys Lys Lys
 160 165 170
 cag ctc ttg agg cta agg aaa cag gca gaa aag aat gtg gag aag aaa 578
 Gln Leu Leu Arg Leu Arg Lys Gln Ala Glu Lys Asn Val Glu Lys Lys
 175 180 185
 atc tgc aag ttc aca gag gtc ctc aag acc aat gga ctc ttg gtg tga 626
 Ile Cys Lys Phe Thr Glu Val Leu Lys Thr Asn Gly Leu Leu Val
 190 195 200
 acccaataaa gactgtttgt gcctcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 686
 aaaa 690

<210> 6
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 6

Met Ala Glu Gly Gln Val Leu Val Leu Asp Gly Arg Gly His Leu Leu
1 5 10 15

Gly Arg Leu Ala Ala Ile Val Ala Lys Gln Val Leu Leu Gly Arg Lys
20 25 30

Val Val Val Val Arg Cys Glu Gly Ile Asn Ile Ser Gly Asn Phe Tyr
35 40 45

Arg Asn Lys Leu Lys Tyr Leu Ala Phe Leu Arg Lys Arg Met Asn Thr
50 55 60

Asn Pro Ser Arg Gly Pro Tyr His Phe Arg Ala Pro Ser Arg Ile Phe
65 70 75 80

Trp Arg Thr Val Arg Gly Met Leu Pro His Lys Thr Lys Arg Gly Gln

52

85

90

95

Ala Ala Leu Glu Arg Leu Lys Val Leu Asp Gly Ile Pro Pro Pro Tyr
 100 105 110

Asp Lys Lys Lys Arg Met Val Val Pro Ala Ala Leu Lys Val Val Arg
 115 120 125

Leu Lys Pro Thr Arg Lys Phe Ala Tyr Leu Gly Arg Leu Ala His Glu
 130 135 140

Val Gly Trp Lys Tyr Gln Ala Val Thr Ala Thr Leu Glu Glu Lys Arg
 145 150 155 160

Lys Glu Lys Ala Lys Ile His Tyr Arg Lys Lys Lys Gln Leu Leu Arg
 165 170 175

Leu Arg Lys Gln Ala Glu Lys Asn Val Glu Lys Lys Ile Cys Lys Phe
 180 185 190

Thr Glu Val Leu Lys Thr Asn Gly Leu Leu Val
 195 200

<210> 7
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Forward primer_RPL13A

<400> 7
 ctgccctcaa ggttgtg

17

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Reverse primer_RPL13A

<400> 8
 cttcttcttc cggtaatgga t

21

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> FRET probe_Pmp22_fluorescéine labelled

<400> 9
 gctctgagcg tgcataagggt ac

22

<210> 10
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> FRET probe_Rpl13A_fluorescéine labelled
 <400> 10
 tcgggtggaa gtaccagcc 19

<210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> FRET probe_Pmp22_rhodamine labelled
 <400> 11
 agggaggagg gaaggaaacc agaaa 25

<210> 12
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> FRET probe_Rpl13A_rhodamine labelled
 <400> 12
 tgacagctac tctggaggag aaacggaa 28

<210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer 1_Sry-specific
 <400> 13
 gagagaggca caagttggc 19

<210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer 2_Sry-specific
 <400> 14
 gcctcctgga aaaagggcc 19

<210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Forward primer _PMP22 transgene
 <400> 15
 gacaaacccc agacagttg 19

<210> 16

54

<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Reverse primer_PMP22 transgene

<400> 16
ccagaaagcc agggaactc

19

PATENTKRAV

- 5 1. Sammensetning som omfatter en muskarinreseptoragonist valgt fra gruppen som består av pilokarpin, cevimelin, karbachol, metacholin og betanechol, eller et salt derav, og en inhibitor av thyroideahormonsyntese valgt fra gruppen som består av metimazol, karbimazol, propyltiouracil og amiodaron, eller et salt derav, og en farmasøytisk akseptierbar bærer eller
10 eksipiens.
2. Sammensetning ifølge krav 1, hvor muskarinreseptoragonisten er pilokarpin.
- 15 3. Sammensetning ifølge krav 1, hvor inhibitoren av thyroideahormonsyntese er metimazol eller karbimazol.
4. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, som omfatter pilokarpin og metimazol, eller pilokarpin og karbimazol, eller salter
20 derav, og eventuelt en farmasøytisk akseptierbar bærer eller eksipiens.
5. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav for anvendelse i behandling av Charcot-Marie Tooth sykdom eller en CMT-relatert lidelse.
25
6. Sammensetning for anvendelse i behandlingen av Charcot-Marie Tooth sykdom ifølge krav 5, hvor Charcot-Marie Tooth sykdom er CMT1A.
7. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, som
30 ytterligere omfatter minst én ytterligere aktiv forbindelse.
8. Sammensetning ifølge krav 7, hvor den nevnte minst ene ytterligere aktive forbindelse er valgt fra baklofen, mifepriston, sorbitol, naltrekson, rapamycin, ketoprofen og flurbiprofen.
35
9. Sammensetning ifølge krav 7 eller 8, hvor nevnte minst ene ytterligere forbindelse er baklofen eller mifepriston.

10. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-9, som omfatter metimazol, pilokarpin, baklofen, mifepriston og sorbitol.

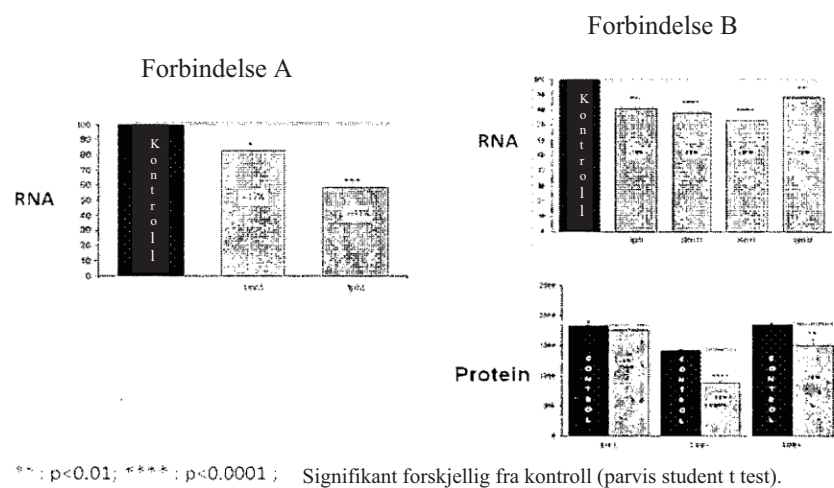
5 11. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-9, som omfatter metimazol, pilokarpin, baklofen, mifepriston, sorbitol og naltrekson.

12. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-9, som omfatter hvilke som helst av de etterfølgende legemiddelkombinasjoner:

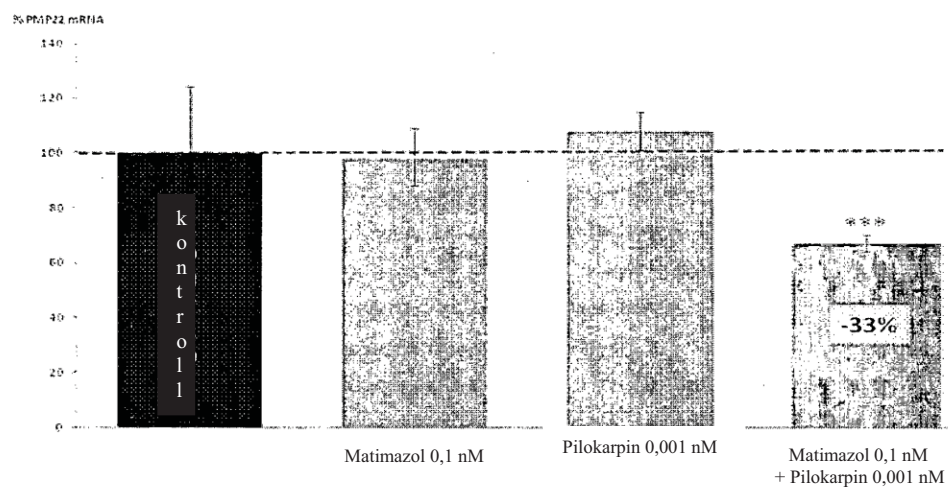
- 10 - pilokarpin, metimazol, mifepriston og sorbitol;
- pilokarpin, metimazol, mifepriston, sorbitol og rapamycin;
- pilokarpin, metimazol, mifepristone, sorbitol og ketoprofen;
- pilokarpin, metimazol, mifepriston, sorbitol og flurbiprofen;
- metimazol og cevimelin;
- 15 - pilokarpin og propyltiouracil;
- pilokarpin, metimazol og baklofen;
- pilokarpin, metimazol og mifepriston;
- pilokarpin, metimazol og sorbitol;
- pilokarpin, metimazol og naltrekson;
- 20 - pilokarpin, metimazol og rapamycin;
- pilokarpin, metimazol og ketoprofen;
- pilokarpin, metimazol og flurbiprofen;
- pilokarpin, metimazol, mifepriston, sorbitol, baklofen og ramapmycin; eller
- pilokarpin, metimazol, mifepriston, sorbitol, naltrekson og rapamycin.

25 13. Farmasøytisk sammensetning ifølge hvilke som helst av kravene 1 til 12, hvor forbindelsene er kombinert for en administrering i gruppe eller separat, samtidig eller påfølgende.

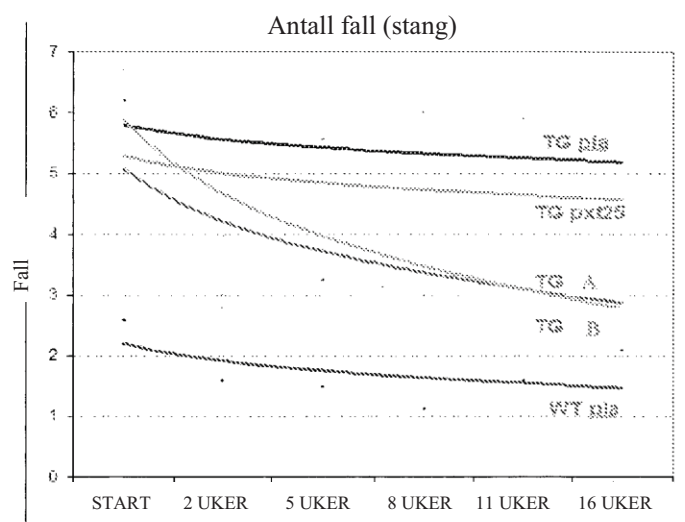
30 14. Sammensetning for anvendelse ifølge krav 5, hvor behandlingen ytterligere omfatter trinnet med å bestemme om pasienten har CMT1A.



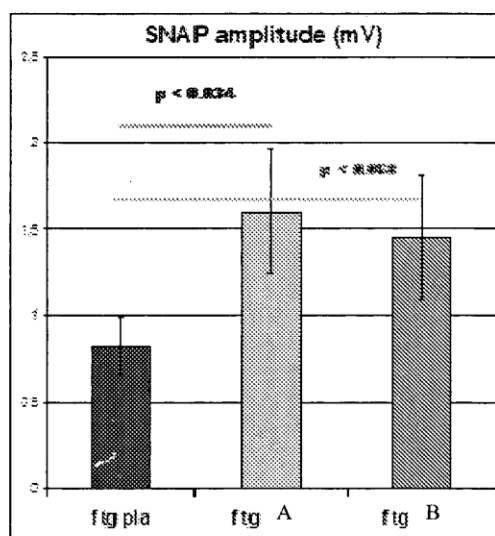
FIGUR 1



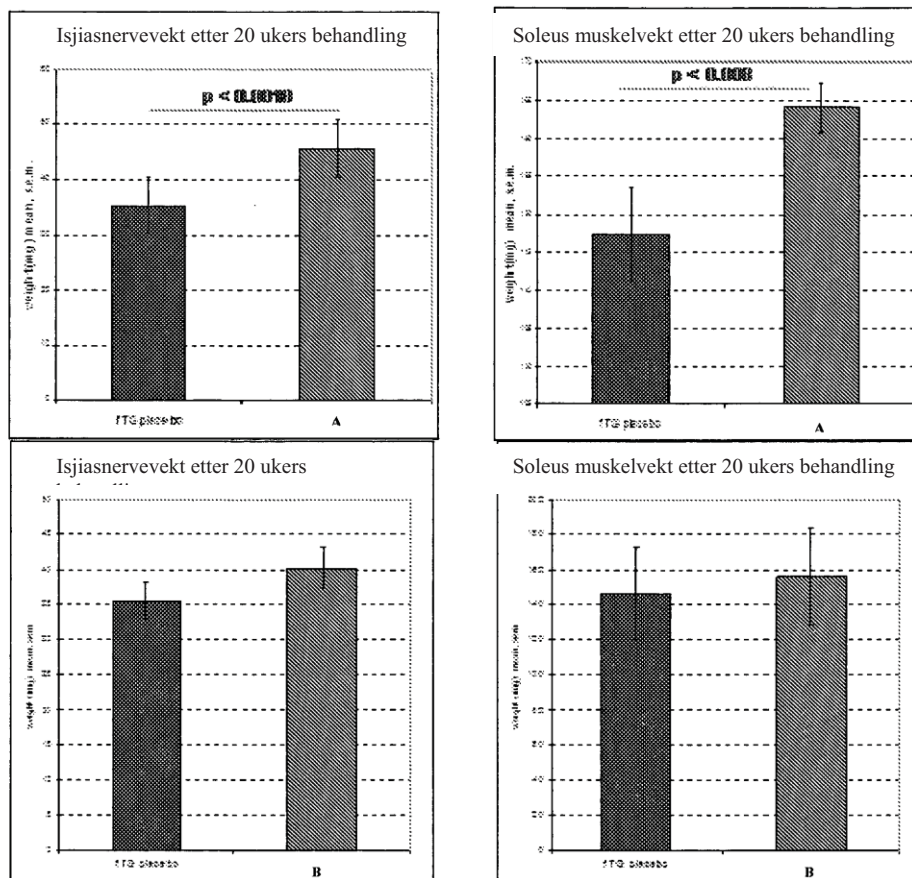
FIGUR 2



FIGUR 3

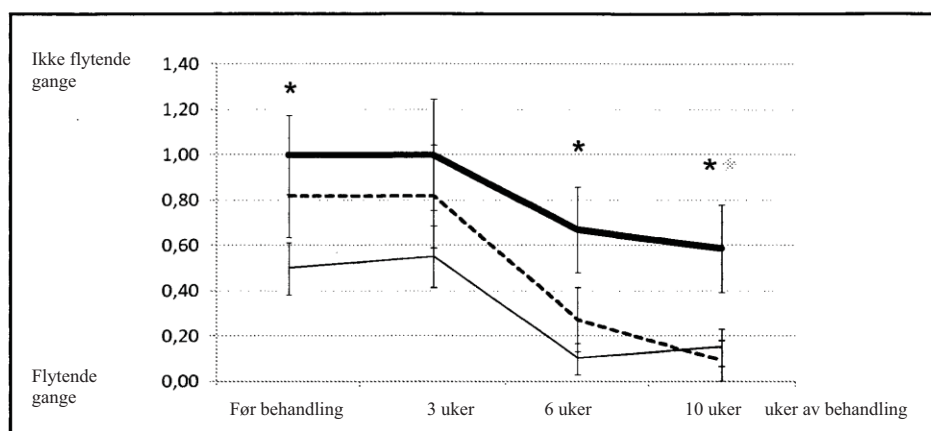


FIGUR 4

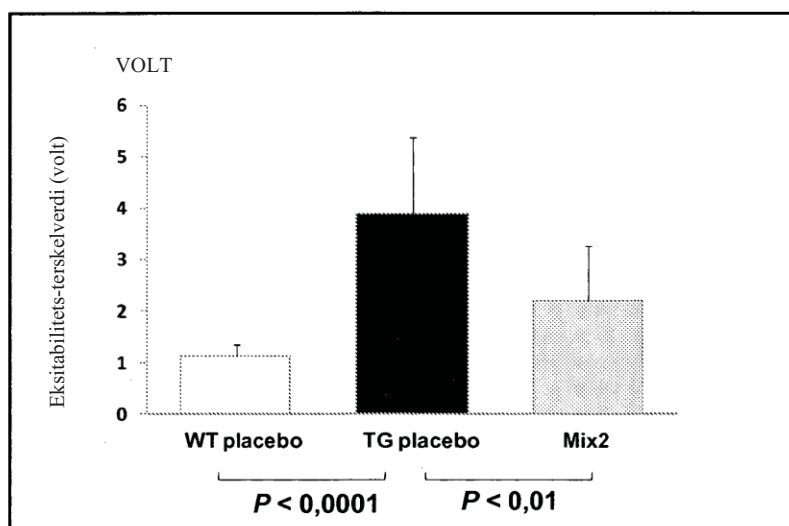


FIGUR 5

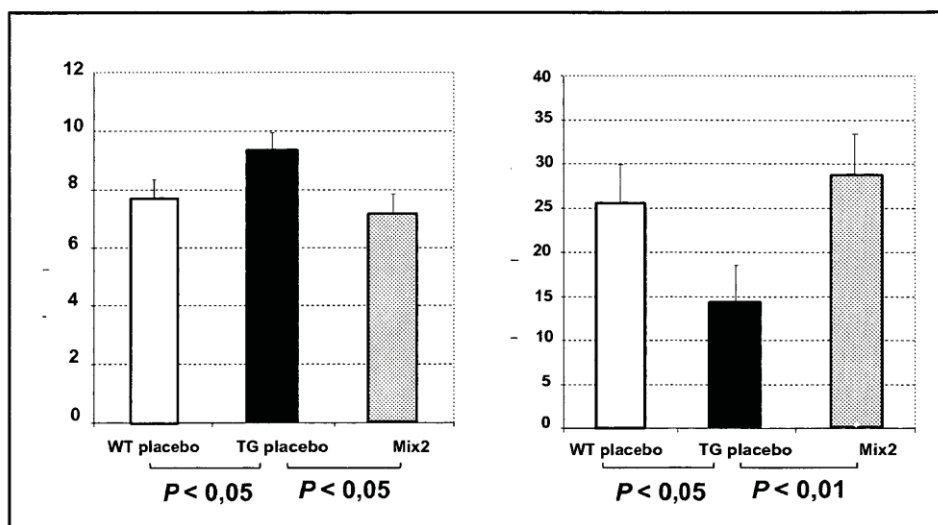
4/6



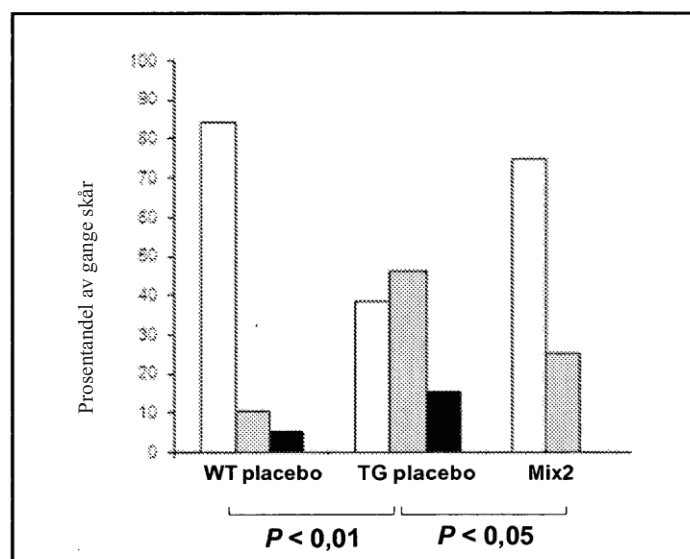
FIGUR 6



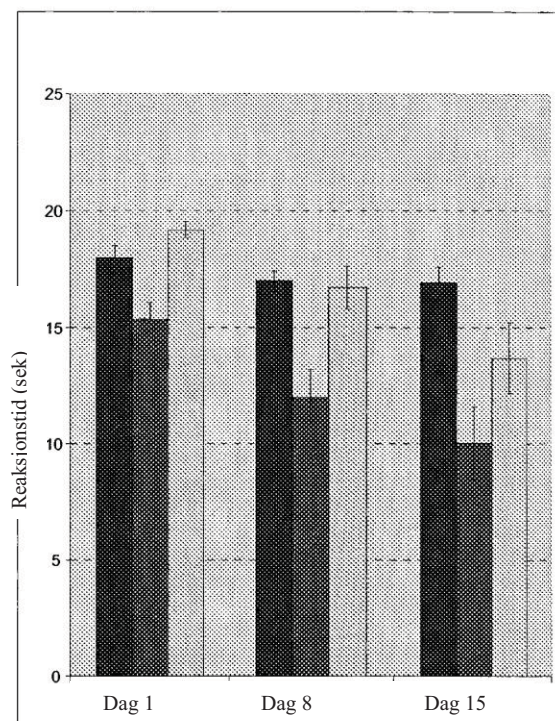
FIGUR 7



FIGUR 8



FIGUR 9



FIGUR 10