



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2437742 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/197 (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01)
A61K 31/4178 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
A61K 31/485 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61K 31/7004 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.12.22
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.08.06
(86)	Europeisk søknadsnr	10724399.0
(86)	Europeisk innleveringsdag	2010.05.28
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.04.11
(30)	Prioritet	2009.06.02, EP, 09305506
(84)	Utpekte stater	AL 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 SM TR
(73)	Innehaver	Pharnext, 11 Rue des Peupliers, 92130 Issy les Moulineaux, FR-Frankrike
(72)	Oppfinner	COHEN, Daniel, 61 avenue des Courlis, F-78110 Le Vésinet, FR-Frankrike NABIROCHKIN, Serguei, 49 avenue de Sully Prud'homme, F-92290 Chatenay Malabry, FR-Frankrike CHUMAKOV, Ilya, 691 rue de la Noue, F-77000 Vaux Le Penil, FR-Frankrike
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Nye preparater for behandling av CMT og relaterte lidelser
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 0 778 023 WO-A-2004/006911 WO-A-2006/117573 WO-A1-2009/153291 SLAVIK J ET AL: "Sa.25. In Vitro Correlates of in Vivo Rapamycin Therapy in Patients with Multiple Sclerosis" CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 119, 1 January 2006 (2006-01-01), page S113, XP024911484 ISSN: 1521-6616 [retrieved on 2006-01-01] POMARA N ET AL: "MIFEPRISTONE (RU 486) FOR ALZHEIMER'S DISEASE" NEUROLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, PHILADELPHIA, US, vol. 58, no. 9, 1 May 2002 (2002-05-01), XP008031502 ISSN: 0028-3878 GALLAGHER P ET AL: "Persistent effects of mifepristone (RU-486) on cortisol levels in bipolar disorder and schizophrenia" JOURNAL OF PSYCHIATRIC RESEARCH, ELSEVIER LTD, GB,

vol. 42, no. 12, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 1037-1041, XP023905451 ISSN: 0022-3956 [retrieved on 2008-02-05]

ZU HOERSTE GERD MEYER ET AL: "Myelin disorders: Causes and perspectives of Charcot-Marie-Tooth neuropathy" JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE, BIRKHAUSER, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 28, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 77-88, XP008090275 ISSN: 0895-8696

HERRMANN D N: "Experimental Therapeutics in Hereditary Neuropathies: The Past, the Present, and the Future" NEUROTHERAPEUTICS, vol. 5, no. 4, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 507-515, XP009124626 ISSN: 1933-7213

GIRONI M ET AL: "A pilot trial of low-dose naltrexone in primary progressive multiple sclerosis" MULTIPLE SCLEROSIS, SAGE PUBLICATIONS, BASINGSTOKE, GB, vol. 14, no. 8, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 1076-1083, XP009124628 ISSN: 1352-4585

CINTAS P: "Drug therapy for symptomatic relief in ALS-Quels sont les traitements medicamenteux symptomatiques?" REVUE NEUROLOGIQUE, MASSON, PARIS, FR, vol. 162, no. Sp. Issue 2, 1 June 2006 (2006-06-01), pages 4S235-4S243, XP009124633 ISSN: 0035-3787

NORRIS F H ET AL: "TRIAL OF BACLOFEN IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS" ARCHIVES OF NEUROLOGY, AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, CHICAGO, IL, US, vol. 36, 1 November 1979 (1979-11-01), page 715/716, XP000981818 ISSN: 0003-9942

LEES A J ET AL: "BACLOFEN IN PARKINSON'S DISEASE" JOURNAL OF NEUROLOGY NEUROSURGERY & PSYCHIATRY, BMJ PUBLISHING GROUP, GB, vol. 41, 1 January 1978 (1978-01-01), page 707/708, XP000981829 ISSN: 0022-3050

"Chemidex Pharma Ltd, Lyflex 5 mg/5ml oral solution" INTERNET CITATION, [Online] XP002476376 Retrieved from the Internet: URL:<http://emc.medicines.org.uk/emc/assets/c/html/displaydoc.asp?document id=14939> [retrieved on 2008-04-14]

WILCOCK G K ET AL: "A placebo-controlled, double-blind trial of the selective AB-42 lowering agent, flurizan (MPC-7869, (R)-flurbiprofen) in patients with mild to moderate Alzheimer's disease" ALZHEIMER'S & DEMENTIA: THE JOURNAL OF THE ALZHEIMER'S ASSOCIATION, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 1, no. 1, 1 July 2005 (2005-07-01), page S95, XP025350528 ISSN: 1552-5260 [retrieved on 2005-08-12]

KELTNER J L ET AL: "Myotonic pupils in Charcot-Marie-Tooth disease. Successful relief of symptoms with 0.025% pilocarpine" ARCHIVES OF OPHTHALMOLOGY, AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, US, vol. 93, no. 11, 1 January 1975 (1975-01-01), pages 1141-1148, XP008090277 ISSN: 0003-9950

DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US 1977 BERENBAUM M C: 'SYNERGY ADDITIVISM AND ANTAGONISM IN IMMUNO SUPPRESSION A CRITICAL REVIEW' Database accession no. PREV197866036009 & BERENBAUM M C: "SYNERGY ADDITIVISM AND ANTAGONISM IN IMMUNO SUPPRESSION A CRITICAL REVIEW", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 28, no. 1, 1977, pages 1-18, ISSN: 0009-9104

Beskrivelse

Foreliggende oppfinnelse angår preparater og anvendelse derav for behandling av Charcot-Marie-Tooth sykdom og beslektede tilstander.

Charcot-Marie-Tooth sykdom ("CMT") er en orphan genetisk perifer polyneuropati. Den rammer tilnærmelsesvis 1 av 2,500 individer, og denne sykdommen er derved den mest vanlige arvelige sykdommen i det perifere nervesystemet. Den debuter typisk i løpet av det første eller andre tiåret av livet, selv om den kan påvises i tidlig barndom. Sykdomsforløpet er kronisk med gradvis nevromuskulær degenerasjon. Sykdommen er invalidiserende med tilfeller av ledsagende nevrologisk smerte og ekstrem muskulær svekkelse. CMT er én av de best studerte genetiske patologier med omtrent 30,000 tilfeller i Frankrike. Selv om et flertall av pasientene med CMT har en duplikasjon av et kromosom 17-fragment inneholdende et myeligen: PMP22 (danner CMT1A), har to dusin gener blitt implisert i forskjellige former av CMT. Følgelig, selv om den er monogen i opprinnelse, manifesterer denne patologien klinisk heterogenitet på grunn av mulige modulatorgener. Genene mutert hos pasienter med CMT er samlet rundt tett forbundne molekylære reaksjonsveier som innvirker på differensiering av Schwann-celler eller nevroner eller endrer samspill mellom disse cellene i perifere nerver.

Undersøkelser i offentlig tilgjengelige data, som beskriver molekylære mekanismer og patologiske manifestasjoner av CMT1A-sykdommen, tillot oss å prioritere noen få funksjonelle cellulære moduler - transkripsjonell regulering av PMP22-gen, PMP22 proteinfolding/ degradering, Schwann-celle proliferasjon og apoptose, nevrondød, ekstracellulær matriks avsetning og remodellering, immunrespons - som potensielle legitime mål for CMT-relevante terapeutiske intervensjoner. Den kombinerte innvirkning av disse deregulerte funksjonelle modulene på debut og progresjon av patologiske manifestasjoner av Charcot-Marie-Tooth rettferdiggjør en potensiell effekt av kombinatorisk CMT-behandling.

Internasjonal patentsøknad WO2009/068659 beskriver en fremgangsmåte for å identifisere medikamentkandidater for behandling av Charcot-Marie-Tooth sykdom ved å oppføre en dynamisk modell av patologien og målrette funksjonelle cellulære reaksjonsveier som er relevante ved regulering av CMT-sykdom.

Internasjonal patentsøknad WO2009/068668 beskriver preparater for behandling av Charcot-Marie-Tooth sykdom hvilke omfatter minst to forbindelser valgt fra gruppen av multiple medikamentkandidater.

Oppsummering av oppfinnelsen

Formålet ifølge foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe nye terapeutiske kombinasjoner for behandling av CMT og beslektede lidelser. Oppfinnelsen angår følgelig nye preparater og anvendelse derav for behandling av CMT og beslektede lidelser, spesielt toksisk nevropati og amyotrofisk lateralsklerose, ved anvendelse av bestemte medikamentkombinasjoner.

Formålet ifølge foreliggende oppfinnelse angår et preparat som definert i kravene. Nærmere bestemt angår oppfinnelsen et preparat omfattende baklofen, D-sorbitol og naltrekson, for samtidig, separat eller sekvensiell administrering til et mammalsk individ.

Foreliggende oppfinnelse beskriver også et preparat omfattende baklofen, sorbitol og en forbindelse valgt fra pilokarpin, metimazol, mifepriston, naltrekson, rapamycin, flurbiprofen og ketoprofen, salter eller prodruger derav, for samtidig, separat eller sekvensiell administrering til et mammalsk individ.

Oppfinnelsen beskriver også et preparat omfattende (a) rapamycin, (b) mifepriston eller naltrekson, og (c) en PMP22-modulator, for samtidig, separat eller sekvensiell administrering til et mammalsk individ.

For eksempel er PMP22-modulatoren valgt fra acetazolamid, albuterol, amilorid, aminoglutetimid, amiodaron, aztreonam, baklofen, balsalazid, betain, betanekol, bikalutamid, bromokriptin, bumetanid, buspiron, carbachol, karbamazepin, karbimazol, cevimeline, ciprofloksacin, klonidin, kurkumin, ciklosporin A, diazepam, diklofenak, dinoprost, disulfiram, D-sorbitol, dutasterid, østradiol, exemestan, felbamat, fenofibrat, finasterid, flumazenil, flunitrazepam, flurbiprofen, furosemid, gabapentin, galantamin, haloperidol, ibuprofen, isoproterenol, ketokonazol, ketoprofen, L-karnitin, liotyronin (T3), litium, losartan, loksapin, meloksikam, metaproterenol, metaraminol, metformin, metakolin, metimazol, metylergonovin, metoprolol, metyrapon, mikonazol, mifepriston, nadolol, naloxon, naltrekson; norfloksacin, pentazocin, fenoksybenzamin, fenylobutyrat, pilokarpin, pioglitazon, prazosin, propyltiouracil, raloksifen, rapamycin, rifampin, simvastatin, spironolakton, takrolimus, tamoksifen, trehalose, trilostan, valproinsyre, salter eller prodruger derav.

Foreliggende oppfinnelse beskriver også et preparat omfattende rapamycin og mifepriston, for samtidig, separat eller sekvensiell administrering til et mammalsk individ.

Et ytterligere formål ifølge foreliggende oppfinnelse er et preparat som beskrevet ovenfor videre omfattende ett eller flere farmasøytisk akseptable hjelpestoffer eller bærere (dvs., et farmasøytisk preparat).

Et annet formål ifølge foreliggende oppfinnelse angår et preparat som beskrevet ovenfor for behandling av CMT eller en beslektet lidelse.

Et ytterligere formål ifølge foreliggende oppfinnelse angår anvendelse av en kombinasjon av forbindelser som beskrevet ovenfor for fremstilling av et medikament for behandling av CMT eller en beslektet lidelse.

Foreliggende oppfinnelse beskriver også en fremgangsmåte for behandling av CMT eller en beslektet lidelse, hvor fremgangsmåten omfatter å administrere til et individ med behov derfor en effektiv mengde av et preparat som definert ovenfor.

Et ytterligere formål ifølge foreliggende oppfinnelse er en fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat, hvor fremgangsmåten omfatter å blande de ovennevnte forbindelsene i et passende hjelpestoff eller bærer.

Foreliggende oppfinnelse beskriver også en fremgangsmåte for behandling av CMT1a hos et individ, hvor fremgangsmåten omfatter å administrere til individet med behov derfor en effektiv mengde av en forbindelse eller kombinasjon av forbindelser som beskrevet ovenfor.

Foreliggende oppfinnelse beskriver videre en fremgangsmåte for behandling av toksisk nevropati hos et individ, hvor fremgangsmåten omfatter å administrere til individet med behov derfor en effektiv mengde av en forbindelse eller kombinasjon av forbindelser som beskrevet ovenfor.

Foreliggende oppfinnelse beskriver også en fremgangsmåte for behandling av ALS hos et individ, hvor fremgangsmåten omfatter å administrere til individet med behov derfor en effektiv mengde av en forbindelse eller kombinasjon av forbindelser som beskrevet ovenfor.

Hvilke som helst av de forskjellige anvendelsene eller fremgangsmåtene for behandling beskrevet heri kan også omfatte et valgfritt trinn med å diagnostisere en pasient med CMT eller en beslektet lidelse, spesielt CMT1A, eller identifisere et individ som å være med risiko for å utvikle CMT eller en beslektet lidelse, spesielt CMT1A.

I dette henseende beskriver oppfinnelsen også en fremgangsmåte for behandling av CMT, spesielt CMT1a, hvor fremgangsmåten omfatter (1) å fastsette hvorvidt et individ har CMT, spesielt CMT1a og (2) behandle individet som har CMT, spesielt CMT1a med en effektiv mengde av en kombinasjon av forbindelser som beskrevet ovenfor. Bestemmelse av hvorvidt et individ har CMT, spesielt CMT1a, kan utføres ved forskjellige tester i og for seg kjent på området, slik som DNA-analyser.

Oppfinnelsen kan anvendes for behandling av CMT eller en beslektet lidelse i hvilket som helst mammalsk individ, spesielt mennesker, mer foretrukket CMT1a.

Tegnforklaring til figurene

Figur 1. Synergistisk effekt av medikamentkombinasjon, dose 1: effekt av **A)** Blanding7 (dose 1, dag 10), **B)** D-sorbitol (SRB, 500 μ M, dag 10), **C)** (R/S)-baklofen (BCL, 5 μ M, dag 10) og **D)** naltrekson (NTX, 5 μ M, dag 10) på MBP-ekspressjon.

*: $p < 0,05$: betydelig forskjellig fra kontroll (= askorbinsyre) (enveis ANOVA fulgt av Fisher Post-hoc test); ns: ikke statistisk forskjellig

Figur 2. Synergistisk effekt av medikamentkombinasjon, dose 6 **A)** Blanding7 (dose 6, dag 10), **B)** SRB (160 nM, dag 10), **C)** BCL (1,6 nM, dag 10) og **D)** NTX (1,6 nM, dag 10) på MBP-ekspressjon. *: $p < 0,05$: betydelig forskjellig fra kontroll (= askorbinsyre) (enveis ANOVA fulgt av Fisher Post-hoc test); ns: ikke statistisk forskjellig

Figur 3. Positiv effekt av Blanding7 (7 doser) **A)** på dag 10 og **B)** på dag 11 i koinkubering med askorbinsyre i PMP22 TG ko-kulturer på MBP-ekspressjon i prosentandel av kontroll (= askorbinsyre). Enveis ANOVA fulgt av Fisher Post-hoc test.

Figur 4. Positiv effekt på hannrotter av 3 og 6 ukers behandling med Blanding1 målt ved anvendelse av stang-test. Latens ble målt som gjennomsnittet av to første analyser av testene (hvite stolper representerer kontrollrotter behandlet med placebo; svarte stolper representerer transgene rotter behandlet med placebo; grå stolper representerer transgene rotter behandlet med Blanding1. ** $p < 0,01$. Statistikk er utført med Student t-sidet test).

Figur 5. Positiv effekt på gangen hos hannrotter av 3 og 6 ukers (henholdsvis venstre og høyre diagram) behandling med Blanding1-preparat (hvite stolper viser fluid gange; grå stolper viser ikke fluid gange; svarte stolper viser rotter med en alvorlig manglende evne til å gå. Statistikk er utført med Student t-sidet test).

Figur 6. Positiv effekt på hannrotter av Blanding1-preparatet hos rotter ved anvendelse av skråplan-test (25°). Rotter ble undersøkt etter 3, 6, 9 og 12 ukers behandling (hvite stolper representerer kontrollrotter behandlet med placebo; svarte stolper representerer transgene rotter behandlet med placebo; grå stolper representerer transgene rotter behandlet med Blanding1. * $p < 0,05$. Statistikk er utført med Student t-sidet test).

Figur 7. Positiv effekt på hunnrotter av 3 ukers behandling med Blanding2-preparatet hos rotter, ved anvendelse av en skråplan-test (hvite stolper representerer kontrollrotter behandlet med placebo; svarte stolper representerer transgene rotter behandlet med placebo; grå stolper representerer transgene rotter behandlet med Blanding2. ** $p < 0,01$. Statistikk er utført med Student t-sidet test).

Figur 8. Beskyttende effekt på hannrotter av Blanding1 på oksaliplatin-indusert nevropati (hvite stolper representerer villtype-rotter behandlet med placebo; svarte stolper representerer villtype rotter behandlet med referanseprodukt gabapentin; grå stolper representerer villtype rotter behandlet med Blanding1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Statistikk er utført med Student t-sidet test).

Figur 9. Signifikant reduksjon av pmp22 RNA-ekspresjon hos behandlede transgene dyr sammenlignet med PMP22 transgene rotter, observert etter 9 ukers behandling med Blanding7-dose 3 (MPZ som referanseggen, Sereda et al., 1996) ($p = 0,0015$). Transgen integrering og overekspresjon av pmp22-gen har også blitt bekreftet; pmp22-RNA i transgene PMP22-rotter var 1,8 ganger overuttrykt sammenlignet med deres villtype kullsøsken-kontroller ($p < 1,10^{-4}$). Ekstraksjon av pmp22-RNA ble utført for isjassnerver hos 16 uker gamle hannrotter ($n=18$ for villtypen, $n=20$ for de transgene rottene og $n=18$ for TG behandlet med Blanding7-dose3). Statistisk analyse ble utført ved anvendelse av Welch t-test.

Figur 10. En clustering-analyse ble utført på skråplan test-score ved 35° (for fordeling i dårlig, middels og god ytelse-klasser ved alle tidspunkter for evaluering (3, 6 og 9 ukers behandling analysert sammen). En signifikant forskjell ble observert mellom WT og TG placebo: 68 % av WT tilhørte god ytelse-gruppen og kun 5 % av placebo TG placebo tilhørte denne gruppen ($p=0,0003$). Blanding7-dose 2 og dose 3 forbedret ytelse hos TG-rotter. Statistisk analyse ble utført ved anvendelse av en trend-test ved 5 % signifikansnivå ($n=18$ for WT placebo-rotter, $n=20$ for TG placebo-rotter, $n=17$ for TG behandlet med Blanding7-dose 2, $n=18$ for TG behandlet med Blanding7-dose3).

Figur 11. Fall i latensen hos TG-rotter i stang-testen etter 9 ukers behandling med Blanding7-dose3 ble analysert ved anvendelse av en Cox-modell med en sandwich varians-estimator, og sammenlignet med referanse TG placebo ved anvendelse av en log rank-test ved 5 % signifikansnivå. Blanding7-dose 3 økte i betydelig grad fall latens hos TG-rotter etter 9 ukers behandling.

Figur 12. Grepstyrken for grupper av villtype, transgene placebo og transgene dyr behandlet med Blanding7-dose 3 daglig i 9 uker ble modellert ved anvendelse av en Cox-modell med en sandwich varians-estimator over alle tidspunktene etter behandling (3, 6 og 9 uker) og sammenlignet med referanse TG placebo ved anvendelse av en log rank-test ved 5 % signifikansnivå. De korresponderende P-verdiene ble presentert i Kaplan-Meier-kurver. En signifikant reduksjon av grepstyrken av forlabbene hos transgene placebo-rotter ble observert (svart jevn linje, $n=21$) sammenlignet med WT rotter (grå jevn linje, $p=1,45 \cdot 10^{-5}$, $n=19$). Behandlingen med Blanding7-dose 3 økte i betydelig grad styrken av forlabbene (svart prikket linje; $p=0,03$, $n=18$).

Figur 13. En Pearsons korrelasjonstest viste en signifikant korrelasjon mellom fall latens i stang-testen (etter 9 ukers behandling) og pmp22 RNA-ekspresjonsnivået: $p=1,6 \cdot 10^{-4}$ (WT, TG placebo og TG behandlet med Blanding7-dose 3 analysert sammen); $p=0,07$ (TG placebo og TG behandlet med Blanding7-dose 3 analysert sammen). Jo lavere pmp22 RNA ekspresjonen var, jo bedre var stang-test ytelsen. Hannrotter var 16 uker gamle ($n=18$ for WT-rotter, hvite sirkler; $n=20$ for TG placebo, svarte sirkler og $n=18$ for TG behandlet med Blanding7-dose3, hvite triangler).

Figur 14. En Pearsons korrelasjonstest viste en signifikant korrelasjon mellom fall i latens i stang-testen (etter 9 ukers behandling) og ledningshastigheten av den sensitive nerven (NCV): $p=1,34 \cdot 10^{-6}$ (WT, TG placebo og TG behandlet med Blanding7-dose 3 analysert sammen) og $p=0,04$ (TG placebo og TG behandlet med Blanding7-dose 3 analysert sammen). Jo høyere ledningshastigheten var, jo bedre var ytelsen i stang-testen. Hannrotter var 16 uker gamle ($n=18$ for WT-rotter, hvite sirkler; $n=20$ for TG placebo, svarte sirkler og $n=18$ for TG behandlet med Blanding7-dose3, hvite triangler).

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer nye terapeutiske metoder for behandling av CMT eller beslektede lidelser. Oppfinnelsen beskriver nye medikamentkombinasjoner som muliggjør en effektiv forbedring av slike sykdommer og kan anvendes hos hvilket som helst mammalsk individ.

Innenfor konteksten til foreliggende oppfinnelse omfatter CMT; CMT1A, CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1X, CMT2A, CMT2B, CMT2D, CMT2E, CMT2-P0, CMT4A, CMT4B1, CMT4B2, CMT4D, CMT4F, CMT4 eller AR-CMT2A, mer foretrukket CMT1a.

Innenfor konteksten til foreliggende oppfinnelse angir betegnelsen "CMT beslektet lidelse" andre sykdommer assosiert med unormal ekspresjon av PMP22 som fører til unormal myelinisering og tap av nevroner. Betegnelsen "CMT beslektet lidelse" omfatter nærmere bestemt Alzheimers sykdom (AD), senil demens av AD-type (SDAT), Parkinsons sykdom, demens med lewylegemer, vaskulær demens, autisme, mild kognitiv svikt (MCI), aldersrelatert hukommelssvikt (AAMI) og problem forbundet med aldring, postencefalitisk parkinsonisme, schizofreni, depresjon, bipolar lidelse og andre stemningsforstyrrelser, Huntingtons sykdom, motornevro sykdommer inkludert amyotrofisk lateralsklerose (ALS), multippel sklerose, idiopatisk nevropati, diabetisk nevropati, toksisk nevropati inkludert nevropati induisert av medikamentbehandlinger, nevropatier fremkalt av HIV, stråling, tungmetaller og vitaminmangel-tilstander, prion-basert nevrodegenerasjon, inkludert Creutzfeld-Jakobs sykdom (CJD), bovin spongiform encefalopati (BSE), GSS, FFI, Kuru og Alpers syndrom.

I en foretrukket utførelsesform angir "CMT beslektet lidelse" en toksisk nevropati, spesielt legemiddelinduserte nevropatier, eller ALS.

Som anvendt heri omfatter "behandling" av en lidelse å behandle, forebygge, profylakse, forsinke eller redusere smerte fremkalt av lidelsen. Betegnelsen behandling omfatter spesielt kontroll av sykdomsprogresjon og assosierte symptomer.

I tillegg angir betegnelsen "forbindelse" de kjemiske forbindelsene som spesielt navngitt i søknaden, så vel som hvilket som helst farmasøytisk preparat med akseptabelt salt, hydrat, ester, eter, isomerer, racemat, konjugater, prodruger derav. Forbindelsene

listet opp i foreliggende søknad kan også identifiseres med deres korresponderende CAS-nummer.

Følgelig er foretrukne forbindelser anvendt i oppfinnelsen baklofen (CAS 1134-47-0) og mulige salter, enantiomerer, racemater, prodruger og derivater derav; sorbitol (CAS 50-70-4) og mulige salter, enantiomerer, racemater, prodruger og derivater derav; naltrekson (CAS 16590-41-3) og mulige salter, enantiomerer, racemater, prodruger og derivater derav; mifepriston (CAS 84371-65-3) og mulige salter, enantiomerer, racemater, prodruger og derivater derav; pilokarpin (CAS 54-71-7) og mulige salter, enantiomerer, racemater, prodruger og derivater derav; metimazol (CAS 60-56-0) og mulige salter, enantiomerer, racemater, prodruger og derivater derav; ketoprofen (CAS 22071-15-4) og mulige salter, enantiomerer, racemater, prodruger og derivater derav; flurbiprofen (5104-49-4) og mulige salter, enantiomerer, racemater, prodruger og derivater derav og rapamycin (CAS 53123-88-9) og mulige salter, enantiomerer, racemater, prodruger og derivater derav. Ytterligere forbindelser beskrevet i oppfinnelsen er acetazolamid (CAS 59-66-5) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; albuterol (CAS 18559-94-9) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; amilorid (CAS 2016-88-8) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; aminoglutetimid (CAS 125-84-8) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; amiodaron (CAS 1951-25-3) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; aztreonam (CAS 78110-38-0) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; baklofen (CAS 1134-47-0) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; balsalazid (CAS 80573-04-2) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; betain (CAS 107-43-7) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; betanekol (CAS 674-38-4) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; bikalutamid (CAS 90357-06-5) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; bromokriptin (CAS 25614-03-3) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; bumetanid (CAS 28395-03-1) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; buspiron (CAS 36505-84-7) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; carbachol (CAS 51-83-2) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; karbamazepin (CAS 298-46-4) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; karbimazol (CAS 22232-54-8) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; cevimeline (CAS 107233-08-9) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; ciprofloksacin (CAS 85721-33-1) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; klonidin (CAS 4205-90-7) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; kurkumin (CAS 458-37-7) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; ciklosporin A (CAS 59865-13-3) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; diazepam

(CAS 439-14-5) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; diklofenak (CAS 15307-86-5) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; dinoproston (CAS 363-24-6) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; disulfiram (CAS 97-77-8) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; D-sorbitol (CAS 50-70-4) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; dutasterid (CAS 164656-23-9) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; østradiol (CAS 50-28-2) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; exemestan (CAS 107868-30-4) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; felbamat (CAS 25451-15-4) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; fenofibrat (CAS 49562-28-9) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; finasterid (CAS 98319-26-7) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; flumazenil (CAS 78755-81-4) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; flunitrazepam (CAS 1622-62-4) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; flurbiprofen (CAS 5104-49-4) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; furosemid (CAS 54-31-9) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; gabapentin (CAS 60142-96-3) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; galantamin (CAS 357-70-0) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; haloperidol (CAS 52-86-8) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; ibuprofen (CAS 15687-27-1) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; isoproterenol (CAS 7683-59-2) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; ketokonazol (CAS 65277-42-1) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; ketoprofen (CAS 22071-15-4) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; L-karnitin (CAS 541-15-1) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; liotyronin (T3) (CAS 6893-02-3) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; litium (CAS 7439-93-2) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; losartan (CAS 114798-26-4) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; loxapin (CAS 1977-10-2) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; meloksikam (CAS 71125-38-7) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; metaproterenol (CAS 586-06-1) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; metaraminol (CAS 54-49-9) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; metformin (CAS 657-24-9) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; metakolin (CAS 55-92-5) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; metimazol (CAS 60-56-0) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; metylergonovin (CAS 113-42-8) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; metoprolol (CAS 37350-58-6) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; metyrapon (CAS 54-36-4) og mulige salter,

enantiomerer, prodruger og derivater derav; mikonazol (CAS 22916-47-8) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; mifepriston (CAS 84371-65-3) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; nadolol (CAS 42200-33-9) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; naloxon (CAS 465-65-6) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; naltrekson (CAS 16590-41-3) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; norfloksacin (CAS 70458-96-7) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; pentazocin (CAS 359-83-1) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; fenoksybenzamin (CAS 59-96-1) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; fenylobutyrat (CAS 1821-12-1) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; pilokarpin (CAS 54-71-7) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; pioglitazon (CAS 111025-46-8) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; prazosin (CAS 19216-56-9) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; propyltiouracil (CAS 51-52-5) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; raloksifen (CAS 84449-90-1) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; rapamycin (CAS 53123-88-9) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; rifampin (CAS 13292-46-1) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; simvastatin (CAS 79902-63-9) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; spironolakton (CAS 52-01-7) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; tacrolimus (CAS 104987-11-3) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; tamoksifen (CAS 10540-29-1) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; trehalose (CAS 99-20-7) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; trilostan (CAS 13647-35-3) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav; valproinsyre (CAS 99-66-1) og mulige salter, enantiomerer, prodruger og derivater derav.

Betegnelsen "kombinasjon" angir en behandling hvori flere medikamenter blir administrert sammen til et individ for å bevirke en biologisk effekt. I en kombinert behandling, kan medikamentene administreres sammen eller separat, samtidig eller sekvensielt. Dessuten kan medikamentene administreres gjennom forskjellige administreringsveier og metoder.

Oppfinnelsen beskriver nå identifisering og aktiviteter av bestemte medikamentkombinasjoner som tilveiebringer en effektiv behandling for CMT. Nærmere bestemt beskriver oppfinnelsen nye ternære kombinasjoner som tilveiebringer en signifikant effekt *in vitro* og *in vivo* på CMT eller beslektede lidelser.

I dette henseende beskriver oppfinnelsen et preparat omfattende baklofen, sorbitol og en forbindelse valgt fra pilokarpin, metimazol, mifepriston, naltrekson,

rapamycin, flurbiprofen og ketoprofen, salter, enantiomerer, racemater eller prodruger derav.

Spesielt beskriver oppfinnelsen et preparat omfattende baklofen, sorbitol og en forbindelse valgt fra pilokarpin, metimazol, mifepriston, naltrekson og ketoprofen.

I den mest foretrukne utførelsesformen angår foreliggende oppfinnelse et preparat omfattende naltrekson, baklofen og D-sorbitol, for samtidig, separat eller sekvensiell administrering til et mammalsk individ.

Foretrukket er, i ovennevnte preparater, sorbitol D-sorbitol og baklofen er RS-baklofen eller S-baklofen, mer foretrukket RS-baklofen.

Oppfinnelsen beskriver også et preparat omfattende:

- a) rapamycin,
- (b) mifepriston eller naltrekson, og
- (c) en PMP22-modulator,

for samtidig, separat eller sekvensiell administrering til et mammalsk individ.

Foreliggende oppfinnelse beskriver også et preparat omfattende:

- (a) rapamycin,
- (b) mifepriston, og
- (c) en PMP22-modulator,

for samtidig, separat eller sekvensiell administrering til et mammalsk individ.

PMP22-modulatoren kan være hvilken som helst forbindelse som modulerer PMP22 reaksjonsvei i en celle og hovedsakelig foranlediger eller bidrar til normalisering av myelin organisering og/eller inhibering av nevrontap. PMP22-modulatoren kan være valgt fra acetazolamide, albuterol, amilorid, aminoglutetimid, amiodaron, aztreonam, baklofen, balsalazid, betain, betanekol, bikalutamid, bromokriptin, bumetanid, buspiron, carbachol, karbamazepin, karbimazol, cevimeline, ciprofloksacin, klonidin, kurkumin, ciklosporin A, diazepam, diklofenak, dinoprost, disulfiram, D-sorbitol, dutasterid, østradiol, exemestan, felbamat, fenofibrat, finasterid, flumazenil, flunitrazepam, flurbiprofen, furosemid, gabapentin, galantamin, haloperidol, ibuprofen, isoproterenol, ketokonazol, ketoprofen, L-carnitin, liotyronin (T3), litium, losartan, loxapin, meloksikam, metaproterenol, metaraminol, metformin, metakolin, metimazol, metylergonovin, metoprolol, metyrapon, mikonazol, mifepriston, nadolol, naloxon, naltrekson; norfloksacin, pentazocin, fenoksybenzamin, fenylbutyrat, pilokarpin, pioglitazon, prazosin, propyltiouracil, raloksifen, rapamycin, rifampin, simvastatin, spironolakton, tacrolimus, tamoksifen, trehalose, trilostan, valproinsyre salter eller prodruger derav.

For eksempel er forbindelse (c) valgt fra pilocarpin, metimazol og baklofen.

I dette henseende omfatter et preparat:

(a) rapamycin,

(b) mifepriston, og

(c) en forbindelse valgt fra pilocarpin, metimazol og baklofen,

for samtidig, separat eller sekvensiell administrering til et mammalsk individ.

Spesifikke eksempler på slike preparater inkluderer preparater omfattende:

- Rapamycin; mifepriston og pilocarpin;
- Rapamycin; mifepriston og baklofen;
- Rapamycin; mifepriston og metimazol; eller
- Rapamycin; naltrekson og metimazol.

Det eksperimentelle avsnittet viser at disse bestemte medikamentkombinasjonene er i stand til å effektivt korrigere PMP22-ekspresjon *in vitro*, gjenopprette normal myelinisering og nevron integritet, og følgelig forbedre CMT hos dyr *in vivo*. Resultatene viser også at disse kombinasjonene kan beskytte dyr mot kjemoterapi-indusert nevropati. Som et resultat kan disse preparatene anvendes for å forebygge eller redusere kjemoterapi-indusert nevropati, for derved å tillate pasienter å motta kjemoterapi i lengre perioder.

Foreliggende oppfinnelse beskriver også et preparat omfattende naltrekson, baklofen og en ytterligere særskilt PMP22-inhibitor som definert ovenfor.

Et ytterligere formål ifølge foreliggende oppfinnelse er et preparat som beskrevet ovenfor ytterligere omfattende ett eller flere farmasøytisk akseptable hjelpestoffer eller bærere (dvs. et farmasøytisk preparat).

Et annet formål ifølge foreliggende oppfinnelse angår et preparat som beskrevet ovenfor for behandling av CMT eller en beslektet lidelse.

Et ytterligere formål ifølge foreliggende oppfinnelse angår anvendelse av en kombinasjon av forbindelser som beskrevet ovenfor for fremstilling av et medikament for behandling av CMT eller en beslektet lidelse.

Foreliggende oppfinnelse beskriver også en fremgangsmåte for behandling av CMT eller en beslektet lidelse, hvor fremgangsmåten omfatter å administrere til et individ med behov derfor en effektiv mengde av et preparat som definert ovenfor.

Et ytterligere formål ifølge foreliggende oppfinnelse er en fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat, hvor fremgangsmåten omfatter å blande de ovennevnte forbindelsene i et egent hjelpestoff eller bærer.

Foreliggende oppfinnelse beskriver også en fremgangsmåte for behandling av CMT1a hos et individ, hvor fremgangsmåten omfatter å administrere til individet med behov derfor en effektiv mengde av en forbindelse eller kombinasjon av forbindelser som beskrevet ovenfor.

Foreliggende oppfinnelse beskriver videre en fremgangsmåte for behandling av toksisk nevropati hos et individ, hvor fremgangsmåten omfatter å administrere til individet med behov derfor en effektiv mengde av en forbindelse eller kombinasjon av forbindelser som beskrevet ovenfor.

Foreliggende oppfinnelse beskriver også en fremgangsmåte for behandling av ALS hos et individ, hvor fremgangsmåten omfatter å administrere til individet med behov derfor en effektiv mengde av en forbindelse eller kombinasjon av forbindelser som beskrevet ovenfor.

Behandling i henhold til oppfinnelsen kan utføres som medikamentkombinasjon og/eller i forbindelse med hvilken som helst annen behandling. Den kan gis hjemme, på legens kontor, en klinikk, på en poliklinikk, eller et sykehus, slik at legen kan observere behandlingens effekt inngående og foreta eventuelle nødvendige justeringer.

Behandlingsvarigheten avhenger av stadium av sykdommen som behandles, alder og tilstand av pasienten, og hvordan pasienten responderer på behandlingen.

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

Dose, hyppighet og administreringsvei for hver komponent av kombinasjonen kan kontrolleres uavhengig. For eksempel kan ett medikament administreres oralt mens det andre medikamentet kan administreres intramuskulært. Kombinasjonsterapi kan gis med jevne mellomrom i sykluser som omfatter hvileperioder slik at pasientens kropp har en sjanse til å komme seg fra eventuelle hittil uforutsette bivirkninger. Medikamentene kan også formuleres sammen slik at én administrering leverer begge forbindelsene.

Formulering av farmasøytiske preparater

Administrering av hvert medikament av kombinasjonen kan finne sted ved hvilken som helst egnet metode som resulterer i en konsentrasjon av medikamentet som, kombinert med den andre komponenten, er i stand til å forbedre pasientens tilstand (som kan bestemmes f.eks., *in vitro* ved en effekt på økt ekspresjon av PMP22 når den når de perifere nervene).

Selv om det er mulig å administrere de aktive ingrediensene av kombinasjonen som det rene kjemikaliet er det foretrukket å tilby dem som et farmasøytisk preparat, også referert til i denne konteksten som farmasøytisk formulering. Mulige preparater omfatter slike som er egnet for oral, rektal, topikal (inkludert transdermal, bukkal og sublingval), eller parenteral (inkludert subkutan, intramuskulær, intravenøs og intradermal) administrering.

Mer vanlig forskrives disse farmasøytiske formuleringene til pasienten i "pasientpakninger" inneholdende en rekke doseringsenheter eller andre midler for administrering av doserte enhetsdoser for anvendelse under en særskilt behandlingsperiode i en enkelt pakning, vanligvis en blisterpakning. Pasientpakninger har en fordel fremfor tradisjonelle forskrivninger, hvor en farmasøyt deler opp en pasients tilførsel av et farmasøytisk middel fra en bulk forsyning, ved at pasienten alltid har tilgang til pakningsvedlegget inneholdt i pasientpakningen, som vanligvis overses i tradisjonelle forskrivninger. Inkludering av et pakningsvedlegg har blitt vist å forbedre pasientens etterlevelse med legens instruksjoner. Følgelig omfatter oppfinnelsen videre en farmasøytisk formulering, som tidligere beskrevet heri, i kombinasjon med pakningsmateriale egnet for nevnte formuleringer. I en slik pasientpakning kan den tiltenkte anvendelsen av en formulering for kombinasjonsbehandlingen deduseres ved instruksjoner, utstyr, forskrifter, tilpasninger og/eller andre midler for å bidra til bruk av formuleringen mest passende for behandlingen. Slike mål gjør en pasientpakning spesielt egnet for og tilpasset til anvendelse for behandling med kombinasjonen ifølge foreliggende oppfinnelse.

Medikamentet kan inneholdes i hvilken som helst passende mengde i hvilken som helst egnet bærersubstans, og kan være til stede i en mengde på 1-99 vekt-% av den totale vekten av preparatet. Preparatet kan tilveiebringes i en doseform som er egnet for oral, parenteral (f.eks., intravenøs, intramuskulær), rektal, kutan, nasal, vaginal, inhalasjonsmiddel, hud (plaster), eller okulær administreringsvei. Følgelig kan preparatet være i form av, f.eks., tabletter, kapsler, piller, pulvere, granulater, suspensjoner, emulsjoner, løsninger, geler inkludert hydrogeler, pasta, salver, kremer, plaster,

drenche, osmotiske leveringsanordninger, suppositorier, klyster, injiserbare preparater, implantater, sprayer eller aerosoler.

De farmasøytiske preparatene kan formuleres i henhold til konvensjonell farmasøytisk praksis (se, f.eks., Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 og Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick og J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

Farmasøytiske preparater i henhold til oppfinnelsen kan formuleres til å frigi det aktive medikamentet hovedsakelig umiddelbart ved administrering eller ved hvilket som helst på forhånd bestemt tidspunkt eller tidsperiode etter administrering.

Formuleringer med kontrollert frigjøring omfatter (i) formuleringer som frembringer en vesentlig konstant konsentrasjon av medikamentet i kroppen over en lengre tidsperiode; (ii) formuleringer som etter en på forhånd bestemt lag-tid frembringer en vesentlig konstant konsentrasjon av medikamentet i kroppen over en lengre tidsperiode; (iii) formuleringer som opprettholder medikamentvirkning i en på forhånd bestemt tidsperiode ved å opprettholde et relativt konstant, effektivt medikamentnivå i kroppen med ledsagende begrensning av uønskede bivirkninger forbundet med svingninger i plasmanivået av den aktive legemiddelsubstansen; (iv) formuleringer som lokaliserer medikamentvirkning ved, f.eks., romlig plassering av et preparat med kontrollert frigjøring i umiddelbar nærhet av eller i det syke vevet eller organet; og (v) formuleringer som målretter medikamentvirkning ved anvendelse av bærere eller kjemiske derivater for å levere medikamentet til en bestemt type målcelle.

Administrering av medikamenter i form av en formulering med kontrollert frigjøring er spesielt foretrukket i tilfeller hvor medikamentet i kombinasjon, har (i) en smal 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 terapeutisk indeks, TI, definert som forholdet mellom median letal dose (LD_{50}) og median effektiv dose (ED_{50})); (ii) et lite absorpsjonsvindu i mage-tarmkanalen; eller (iii) en svært kort biologisk halveringstid slik at hyppig dosering i løpet av en dag er nødvendig for å holde plasmanivået oppe på et terapeutisk nivå.

Hvilke som helst av en rekke strategier kan følges for å oppnå kontrollert frigjøring hvor hastigheten av frigjøring oppveier hastigheten av metabolisme av det

aktuelle medikamentet. Kontrollert frigjøring kan oppnås med passende valg av forskjellige formuleringsparametre og ingredienser, inkludert, f.eks., ulike typer av preparater med kontrollert frigjøring og drasjeringer. Følgelig blir medikamentet formulert med passende hjelpestoffer til et farmasøytisk preparat som, ved administrering, frigjør medikamentet på en kontrollert måte (enkelt- eller multipl enhet tablett- eller kapselpreparater, oljeløsninger, suspensjoner, emulsjoner, mikrokapsler, mikrosfærer, nanopartikler, plastere og liposomer).

Faste doseformer for oral anvendelse

Formuleringer for oral anvendelse omfatter tabletter inneholdende de(n) aktive ingrediensen(e) i en blanding med ikke-toksiske farmasøytisk akseptable hjelpestoffer. Disse hjelpestoffene kan være, for eksempel, inerte fortynningsmidler eller fyllmidler (f.eks., sukrose, mikrokrystallinsk cellulose, stivelser omfattende potetstivelse, kalsiumkarbonat, natriumklorid, kalsiumfosfat, kalsiumsulfat, eller natriumfosfat); granulerings- og desintegrasjonsmidler (f.eks., cellulosederivater inkludert mikrokrystallinsk cellulose, stivelser omfattende potetstivelse, krysskarmellosenatrium, alginater, eller alginsyre); bindemidler (f.eks., akasie, alginsyre, natriumalginat, gelatin, stivelse, pregelatinisert stivelse, mikrokrystallinsk cellulose, karboksymetylcellulose-natrium, metylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose, etylcellulose, polyvinylpyrrolidon, eller polyetylglykol); og glattemidler, flytfremmende midler, og antiadhesiver (f.eks., stearinsyre, silika eller talkum). Andre farmasøytisk akseptable hjelpestoffer kan være fargestoffer, smaksstoffer, plastiseringsmidler, fuktighetsbevarere, bufringsmidler, og lignende.

Tablettene kan være udrasjerte eller de kan være drasjert ved kjente teknikker, eventuelt for å forsinke desintegrasjon og absorpsjon i mage-tarmkanalen og derved gi en vedvarende virkning over en lengre periode. Drasjeringen kan tilpasses til å frigjøre den aktive legemiddelsubstansen i et på forhånd bestemt mønster (f.eks., for å oppnå en formulering med kontrollert frigjøring) eller den kan tilpasses til å ikke frigjøre den aktive legemiddelsubstansen før etter passering av magen (enterisk drasjering). Drasjeringen kan være en sukkerdrasjering, en filmdrasjering (f.eks., basert på hydroksypropylmetylcellulose, metylcellulose, metylhydroksyetylcellulose, hydroksypropylcellulose, karboksymetylcellulose, akrylat kopolymerer, polyetylglykol og/eller polyvinylpyrrolidon), eller et enterisk belegg (f.eks., basert på metakrylsyrekopolymer, celluloseacetat-ftalat, hydroksypropylmetylcellulose-ftalat, hydroksypropylmetylcellulose acetat succinat, polyvinylacetat-ftalat, skjellakk, og/eller etylcellulose). Et

tidsforsinkelsesmateriale slik som, f.eks. glycerylmonostearat eller glyceryldistearat kan anvendes.

De faste tablettpreparatene kan omfatte en drasjering egnet til å beskytte preparatet fra uønskede kjemiske endringer, (f.eks., kjemisk degradering før frigjøring av den aktive legemiddelsubstansen). Drasjeringen kan påføres på den faste doseringsformen på en lignende måte som den beskrevet i Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

Medikamentene kan blandes sammen i tablett, eller kan være oppdelt. For eksempel inneholdes et første medikament inni tablett, og et andre medikament er på utsiden, slik at en vesentlig andel av det andre medikamentet blir frigjort før frigjøring av det første medikamentet.

Formuleringer for oral anvendelse kan også presenteres som tyggetabletter, eller som harde gelatinkapsler hvori den aktive ingrediensen er blandet med et inert fast fortynningsmiddel (f.eks., potetstivelse, mikrokrySTALLinsk cellulose, kalsiumkarbonat, kalsiumfosfat eller kaolin), eller som myke gelatinkapsler hvori den aktive ingrediensen er blandet med vann eller et oljemedium, for eksempel, flytende parafin, eller olivenolje. Pulvere og granulater kan fremstilles ved anvendelse av ingrediensene nevnt ovenfor under tabletter og kapsler på en konvensjonell måte.

Preparater med kontrollert frigjøring for oral anvendelse kan, f.eks., konstrueres til å frigjøre det aktive medikamentet ved å kontrollere oppløsningen og/eller diffusjonen av den aktive legemiddelsubstansen.

Oppløsnings- eller diffusjonskontrollert frigjøring kan oppnås ved hensiktsmessig drasjering av en tablett, kapsel, pellett, eller granulatformulering av medikamenter, eller ved å inkorporere medikamentet i en passende matriks. En drasjering med kontrollert frigjøring kan omfatte ette eller flere av drasjeringssubstansene nevnt ovenfor og/eller, f.eks., skjellakk, bivoks, glycovoks, castor voks, carnauba-voks, stearylalkohol, glycerylmonostearat, glyceryldistearat, glyserol palmitostearat, etylcellulose, akrylharpiks, dl-polymelkesyre, celluloseacetatbutyrat, polyvinylklorid, polyvinylacetat, vinylpyrrolidon, polyetylen, polymetakrylat, metylmetakrylat, 2-hydroksymetakrylat, metakrylat hydrogeler, 1,3 butylenglykol, etylenglykolmetakrylat, og/eller polyetylenglykol. I en formulering med matriks med kontrollert frigjøring, kan matriksmaterialet også omfatte, f.eks., hydratisert metylcellulose, carnauba-voks og

stearylalkohol, carbopol 934, silikon, glyceryl tristearat, metylakrylat-metylmetakrylat, polyvinylklorid, polyetylen, og/eller halogenert fluorkarbon.

Et preparat med kontrollert frigjøring inneholdende ett eller flere av medikamentene ifølge de foreliggende kombinasjonene kan også være i form av en flytedyktig tablett eller kapsel (dvs., en tablett eller kapsel som, ved oral administrering, flyter på toppen av mageinnholdet i en viss tidsperiode). En flytende tablettformulering av medikamentet(/medikamentene) kan fremstilles ved granulering av en blanding av medikamentet(/medikamentene) med hjelpestoffer og 20-75 vekt-% av hydrokolloider, slik som hydroksyetylcellulose, hydroksypropylcellulose eller hydroksypropylmetylcellulose. De oppnådde granulene kan deretter presses sammen til tabletter. Ved kontakt med magesaft danner tabletten en hovedsakelig vanntett gelbarriere rundt overflaten. Denne gelbarrieren bidrar til å opprettholde en densitet på mindre enn én, for derved å tillate tabletten å forbli flytende i magesaften.

Væsker for oral administrering

Pulvere, dispergerbare pulvere, eller granuler egnet fremstilling av en vandig suspensjon ved tilsetning av vann er passende doseringsformer for oral administrering. Formulering som en suspensjon tilveiebringer den aktive ingrediensen i en blanding med et dispergerings- eller fuktemiddel, suspenderingsmiddel, og ett eller flere konserveringsmidler. Egnede suspenderingsmidler er, for eksempel, natriumkarboksymetylcellulose, metylcellulose, natriumalginat, og lignende.

Parenterale preparater

Det farmasøytiske preparatet kan også administreres parenteralt ved injeksjon, infusjon eller implantasjon (intravenøst, intramuskulært, subkutant, eller lignende) i doseringsformer, formuleringer, eller via egnede leveringsanordninger eller implantater inneholdende konvensjonelle, ikke-toksiske farmasøytisk akseptable bærere og adjuvanter. Formulering og fremstilling av slike preparater er velkjent for fagfolk innenfor området farmasøytisk formulering.

Preparater for parenteral anvendelse kan tilveiebringes i enhetsdoseformer (f.eks., i enkelt-dose ampuller), eller i hetteglass inneholdende flere doser og i hvilke et egnet konserveringsmiddel kan tilsettes (se nedenfor). Preparatet kan være i form av en løsning, en suspensjon, en emulsjon, en infusjonsanordning, eller en leveringsanordning for implantasjon eller det kan presenteres som et tørt pulver som skal rekonstitueres

med vann eller en annen egnet konstituent før anvendelse. Bortsett fra de(t) aktive medikamentet(/medikamentene), kan preparatet omfatte egnede parenteralt akseptable bærere og/eller hjelpestoffer. De(t) aktive medikamentet(/medikamentene) kan være inkorporert i mikrosfærer, mikrokapsler, nanopartikler, liposomer, eller lignende for kontrollert frigjøring. Preparatet kan omfatte suspenderings-, solubilisierungs-, stabiliserings-, pH-justerende midler, og/eller dispergeringsmidler.

De farmasøytiske preparatene ifølge oppfinnelsen kan være i en form egnet for steril injeksjon. For å fremstille et slikt preparat, blir de(t) egnede aktive medikamentet(/medikamentene) oppløst eller suspendert i en parenteralt akseptabel flytende konstituent. Blant akseptable konstituenten og løsningsmidler som kan anvendes er vann, vann justert til en egnet pH ved tilsetning av passende mengde av saltsyre, natriumhydroksid eller en passende buffer, 1,3-butandiol, Ringers løsning og isotonisk natriumkloridløsning. Den vandige formuleringen kan også inneholde ett eller flere konserveringsmidler (f.eks., metyl, etyl eller n-propyl p-hydroksybenzoat). I tilfeller hvor ett av medikamentene er kun sparsomt eller i liten grad oppløselig i vann, kan en oppløsningsforbedrer eller solubilisierungsmiddel tilsettes, eller løsningsmidlet kan omfatte 10-60 vekt-% propylenglykol eller lignende.

Parenterale preparater med kontrollert frigjøring kan være i form av vandige suspensjoner, mikrosfærer, mikrokapsler, magnetiske mikrosfærer, oljeløsninger, oljesuspensjoner, eller emulsjoner. Alternativt kan de(t) aktive medikamentet(/medikamentene) være inkorporert i biokompatible bærere, liposomer, nanopartikler, implantater, eller infusjonsanordninger. Materialer for anvendelse ved fremstilling av mikrosfærer og/eller mikrokapsler er, f.eks., biodegraderbare /bioeroderbare polymerer slik som polygalactin, poly-(isobutyl cyanoakrylat), poly(2-hydroksyetyl-L-glutamin). Biokompatible bærere som kan anvendes ved formulering av en parenteral formulering med kontrollert frigjøring er karbohydrater (f.eks., dekstraner), proteiner (f.eks., albumin), lipoproteiner eller antistoffer. Materialer for anvendelse i implantater kan være ikke-biodegraderbare (f.eks., polydimetyl siloksan) eller biodegraderbare (f.eks., poly(kaprolakton), poly(glykolsyre) eller poly(ortoestere)).

Rektale preparater

For rektal anvendelse omfatter egnede doseringsformer for et preparat suppositorier (emulsjon eller suspensjonstype), og rektale gelatinkapsler (oppløsninger eller suspensjoner). I en typisk suppositorieformulering er de(t) aktive medikamentet(/medikamentene) kombinert med en passende farmasøytisk akseptabel suppositoriebase

slik som kakaosmør, forestrede fettsyrer, glyserinert gelatin, og forskjellige vannløselige eller dispergerbare baser som polyetylglykol. Forskjellige additiver, forbedrere, eller surfaktanter kan innbefattes.

Perkutane og topikale preparater

De farmasøytiske preparatene kan også administreres topikalt på huden for perkutan absorpsjon i doseformer eller formuleringer inneholdende konvensjonelle ikke-toksiske farmasøytisk akseptable bærere og hjelpestoffer inkludert mikrosfærer og liposomer. Formuleringene omfatter kremer, salver, losjoner, linimenter, geler, hydrogeler, oppløsninger, suspensjoner, stick, sprayer, pasta, plastere, og andre typer av transdermale medikamentleveringssystemer. De farmasøytisk akseptable bærerne eller hjelpestoffene kan omfatte emulgeringsmidler, antioksidanter, bufringsmidler, konserveringsmidler, fuktighetsbevarere, penetreringsforbedrere, chelateringsmidler, geldannende midler, salvebaser, parfymer og hudbeskyttende midler.

Emulgeringsmidlene kan være naturlig forekommende gummier (f.eks., akasiegummi eller tragant)

Konserveringsmidlene, fuktighetsbevarerne, penetreringsforbedrerne kan være parabener, slik som metyl eller propyl p-hydroksybenzoat, og benzalkoniumklorid, glyserin, propylenglykol, urea, osv.

De farmasøytiske preparatene beskrevet ovenfor for topikal administrering på huden kan også anvendes i forbindelse med topikal administrering på eller nær den delen av kroppen som skal behandles. Preparatene kan tilpasses for direkte applikasjon eller for applikasjon ved hjelp av spesielle medikamentleveringsanordninger slik som dressinger eller alternativt plastere, puter, kompresser, strips, eller andre former for egnet fleksibelt materiale.

Doser og varighet av behandlingen

De vil forstås at medikamentene av kombinasjonen kan administreres ledsagende, enten i samme eller ulik farmasøytisk formulering eller sekvensielt. Dersom administreringen er sekvensiell, skulle forsinkelsen i administrering av én av de aktive ingrediensene ikke være slik at den mister fordelene av den effektive effekten av kombinasjonen av de aktive ingrediensene. Et minimumskrav til en kombinasjon ifølge foreliggende beskrivelse er at kombinasjonen skulle være ment for kombinert anvendelse

med fordelene av den effektive effekten av kombinasjonen av de aktive ingrediensene. Den tiltenkte anvendelsen av en kombinasjon kan deduseres ved utstyr, forskrifter, tilpasninger og/eller andre midler for å bidra til bruk av kombinasjonen i henhold til oppfinnelsen.

Terapeutisk effektive mengder av medikamentene ifølge foreliggende foreliggende oppfinnelse kan anvendes sammen for fremstilling av et medikament anvendelig for å redusere effekten av økt ekspresjon of PMP22-gen; gjenopprettelse av normal myelinisering og nerve integritet, forebygge eller redusere risikoen for å utvikle CMT-sykdom, stanse eller saktne progresjonen av CMT-sykdom når den først har blitt klinisk manifestert, og forebygge eller redusere risikoen for en første eller etterfølgende forekomst av en nevropatisk hendelse.

Selv om de aktive legemidlene ifølge foreliggende oppfinnelse kan administreres i oppdelte dosert, for eksempel to eller tre ganger daglig, er en enkelt daglig dose av hvert medikament i kombinasjonen foretrukket, hvor en enkelt daglig dose av alle medikamentene i et enkelt farmasøytisk preparat (enhetsdoseform) er mest foretrukket.

Administrering kan finne sted én til flere ganger daglig i flere dager til flere år, og kan til og med finne sted for resten av livet til pasienten. Kronisk eller i det minste periodisk gjentatt langvarig administrering vil bli indikert i de fleste tilfeller.

- Betegnelsen "enhetsdoseform" refererer til fysisk adskilte enheter (slik som kapsler, tabletter, eller fylte sprøytesylindere) passende som enhetsdoser for humane individer, hvor hver enhet inneholder en på forhånd bestemt mengde av aktivt materiale eller materialer beregnet til å gi den ønskede terapeutiske effekten, i forbindelse med den nødvendige farmasøytiske bæreren.

Mengden av hvert legemiddel i kombinasjonen foretrukket for en enhetsdose vil avhenge av flere faktorer inkludert administreringsveien, kroppsvekt og alder av pasienten, alvorlighetsgraden av den nevropatiske skaden forårsaket av CMT-sykdom eller risiko for eventuelle potensielle bivirkninger med tanke på den generelle helsestatusen for personen som skal behandles.

I tillegg kan farmakogenomikk (effekten av genotype på farmakinetikk, farmakodynamikk eller effektprofil av et terapeutisk middel)-informasjon om en bestemt pasient påvirke dosen som anvendes.

Med unntak av når det responderes på spesielt svekkende CMT sykdomstilfeller når høyere doser kan være krevet, eller ved behandling av barn når lavere doser skulle velges, vil den foretrukne dosen av hvert legemiddel i kombinasjonen vanligvis være innenfor området for doser ikke over de som vanligvis forskrives for langvarig vedlikeholdsbehandling eller som er vist å være sikker i de store fase 3 kliniske studiene.

For eksempel,

- for Rapamycin, fra omtrent 1 til omtrent 100 µg/kg per dag, typisk fra 1 til 50 µg/kg, for eksempel mellom 5 og 30 µg/kg/dag.
- for Mifepriston, fra omtrent 1 til omtrent 300 µg/kg per dag, typisk fra 10 til 200 µg/kg, for eksempel mellom 10 og 80 µg/kg/dag.
- for Naltrekson, fra omtrent 1 til omtrent 100 µg/kg per dag, typisk fra 1 til 50 µg/kg, for eksempel mellom 1 og 20 µg/kg/dag.
- for Pilocarpin, fra omtrent 1 til omtrent 100 µg/kg per dag, typisk fra 1 til 50 µg/kg, for eksempel mellom 1 og 20 µg/kg/dag.
- for Baklofen, fra omtrent 1 til omtrent 300 µg/kg per dag, typisk fra 10 til 200 µg/kg, for eksempel mellom 20 og 100 µg/kg/dag.
- for Metimazol, fra omtrent 1 til omtrent 100 µg/kg per dag, typisk fra 1 til 50 µg/kg, for eksempel mellom 1 og 20 µg/kg/dag.

Den mest foretrukne dosen vil korrespondere til mengder fra 1 % opp til 10 % av de som vanligvis forskrives for langvarig vedlikeholdsbehandling.

Det vil forstås at mengden av medikamentet faktisk administrert vil bli bestemt av en lege, i lys av de relevante omstendighetene inkludert lidelsen eller lidelsene som skal behandles, det eksakte preparatet som skal administreres, alder, vekt og respons hos den individuelle pasienten, alvorlighetsgraden av pasientens symptomer, og den valgte administreringsveien. Derfor er de ovennevnte doseområdene ment å gi generell veiledning og støtte for beskrivelsene heri, men er ikke ment å begrense omfanget av oppfinnelsen.

Eksempler**A. Fremstilling av medikamentkombinasjoner**

Følgende medikamentkombinasjoner ble fremstilt:

	Molekyl	dose
Blanding1	Sorbitol	2,1 mg/kg/dag
	S-Baklofen (-)	60 µg/kg/dag
	Naltrekson	7 µg/kg/dag

	Molekyl	dose
Blanding2	Rapamycin	15 µg/kg/dag
	Mifepriston	40 µg/kg/dag

	Molekyl	dose
Blanding3	Rapamycin	15 µg/kg/dag
	Mifepriston	40 µg/kg/dag
	Pilokarpin	7 µg/kg/dag

	Molekyl	dose
Blanding4	Rapamycin	15 µg/kg/dag
	Mifepriston	40 µg/kg/dag
	Baklofen	60 µg/kg/dag

	Molekyl	dose
Blanding5	Rapamycin	15 µg/kg/dag
	Mifepriston	40 µg/kg/dag
	Metimazol	4,2 µg/kg/dag

	Molekyl	dose
Blanding6	Rapamycin	15 µg/kg/dag
	Naltrekson	7 µg/kg/dag
	Metimazol	4,2 µg/kg/dag

	Molekyl	dose 1	dose 2	dose 3
Blanding7	Sorbitol	10,5 mg/kg/day	2,1 mg/kg/day	1,05 mg/kg/dag
	(RS) Baklofen	0,3 mg/kg/day	60 µg/kg/day	30 µg/kg/dag
	Naltrekson	35 µg/kg/day	7 µg/kg/day	3,5 µg/kg/dag

B. *In vitro*-forsøk

1. PMP22 ekspresjonsanalyser av Schwann-celler behandlet med Blanding1-6

1.1 Cellekultur

1.1.1: Kommersielt tilgjengelige rotte primære Schwann-celler

Hetteglass med rotte Schwann-celler (SC) primærkultur (Sciencell nr. R1700) blir tint opp, sådd ut ved en tetthet på 10 000 celler/cm² i "Sciencell Schwann cell medium" (basalmedium fra Sciencell nr. R1701) i poly-L-lysin forhåndsbelagte 75 cm² kolber. Kulturmediet er sammensatt av basalmedium, 5 % Føtalt Bovint Serum (3H-Biomedical AB nr. 1701-0025), 1 % Schwann-celle vekstsupplement (3H Biomedical AB nr. 1701-1752), 1 % Gentamicin (Sigma nr. G1397) og 10 µM Forskolin (Sigma nr. F6886) for å fremme deres proliferasjon.

Etter at konfluens er nådd (4 til 10 dager avhengig av celle-batch), blir Schwann-celler rensset ved forsiktig risting eller ved thy1.1 immunpanning som muliggjør SC-isolering fra adherente fibroblaster, for å frembringe kulturer som er minst 95 % rene. SC blir deretter tellet (Tryptanblå-metode) og sådd ut i poly-L-lysin forhåndsbelagt 75 cm² kolbe i samme SC-medium. Ved konfluens blir celler rensset, trypsinisert (trypsin-EDTA 1x fortynnet fra Invitrogen nr. 1540054), fortynnet i PBS uten kalsium og magnesium) tellet og platet ut i 12-brønns plater (140 000 celler/brønn) i Sciencell Schwann-celle medium med 5 % FBS, 1 % cellevekst-supplement (CGS), 40 µg/ml gentamicin og 4 µM Forskolin.

1.1.2 Spesialfremstilte rotte primære Schwann-celler

Primære Schwann-cellekulturer (SC) blir etablert fra isjasnerver fra nyfødte Sprague-Dawley-rotter (mellom P0 og P2). Alle nyfødte rotter blir avlivet og isolert i en Petriskål. Disseksjon blir utført under sterile betingelser.

Dorsal huden blir fjernet fra baklabben og nedre torso. Isjasnerven blir isolert og overført til en kulturplate inneholdende iskald Leibovitz (L15, Invitrogen nr. 11415) supplert med 1 % penicillin/streptomycin-løsning (50UI/ml og 50 µg/ml, henholdsvis; Invitrogen nr. 15070) og 1 % bovint serumalbumin (BSA, Sigma A6003). Begge nervene per rotte blir overført til et 15 ml rør inneholdende iskald L15. L15-mediet blir deretter fjernet og erstattet av 2,4 ml DMEM (Invitrogen nr. 21969035) med 10 mg/ml kollagenase (Sigma nr. A6003). Nerver blir inkubert i dette mediet i 30 minutter ved 37 °C. Mediet blir deretter fjernet og begge nervene blir dissosiert ved trypsin (10 % trypsin EDTA 10 x, Invitrogen nr 15400054) fortynnet i PBS uten kalsium og magnesium (Invitrogen nr. 2007-03) i 20 min ved 37 °C. Reaksjonen blir stanset ved tilsetning av DMEM

inneholdende DNase I grad II (0,1 mg/ml Roche diagnostic nr. 104159) og føtalt kalveserum (FCS 10 %, Invitrogen nr. 10270). Cellesuspensjonen ble triturerert med en 10 ml pipette og passert gjennom et filter i et 50 ml rør (Swinnex 13 mm filterenheter, Millipore, med 20 µm nylon-maske filtre, Fisher). Cellesuspensjonen blir sentrifugert ved 350g i 10 min ved romtemperatur (RT) og pelletene blir suspendert i DMEM med 10 % FCS og 1 % penicillin/streptomycin. Celler blir tellet (Tryptanblå-metode) og sådd ut i Falcon 100 mm Primaria vevskulturplater ved en tetthet på $5 \cdot 10^5$ til 10^6 celler/plate.

Etter én dags dyrking blir mediet byttet til DMEM, 10 % FCS, 1 % penicillin/streptomycin og 10 µM cytosin b-D-arabinofuranosid (Sigma nr. C1768). 48 timer senere blir medium fjernet og celler blir vasket tre ganger med DMEM. SC dyrkingsmediet blir deretter tilsatt, sammensatt av DMEM, 10 % FCS, 1 % penicillin/streptomycin, 2 µM Forskolin (Sigma nr. F6886), 10 µg/ml bovin hypofyse-ekstrakt (PEX, Invitrogen nr. 13028). Mediet blir erstattet hver andre-tredje dag.

Etter 8 dagers dyrking (4 til 10 dager avhengig av celle-batcher), når Schwann-celler konfluens og kulturen, inneholdende en stor mengde av kontaminerende fibroblaster, blir rensset ved thy 1.1 immunpanning-metoden. Etter denne rensingen blir celler suspendert i dyrkingsmedium ved 10 000 celler/cm² i poly-L-lysin forhåndsbelagte 75 cm² kolber. Straks de når konfluens blir celler rensset, trypsinisert (trypsin-EDTA), tellet og sådd ut på 12-brønns plater (100 000 celler/brønn).

1.1.3: Medikament-inkubasjon

Etter at celler er sådd ut i 12-brønns plater blir mediet erstattet av et definert medium bestående av en blanding av DMEM-F12 (Invitrogen nr. 21331020) komplettert med 1 % N2-supplement (Invitrogen nr. 17502), 1 % L-Glutamin (Invitrogen nr. 25030024) 2,5 % FBS (Sciencell nr. 0025), 0,02 µg/ml kortikosteron (Sigma nr. C2505), 4 µM Forskolin og 50 µg/ml gentamycin. Vekstfaktorer er ikke tilsatt til dette mediet, for å fremme SC-differensiering.

24 timer senere blir mediet erstattet av et definert medium (DMEM-F12) komplettert med 1 % Insulin-Transferrin-Selen- X (ITS, Invitrogen nr. 51300), 16 µg/ml av Putrescine (Sigma nr. P5780), 0,02 µg/ml kortikosteron og 50 µg/ml gentamicin. Ved dette trinnet er hverken progesteron eller forskolin til stede i mediet. En dag senere blir Schwann-celler stimulert ved kombinasjoner av medikamenter i løpet av 24 timer (3 brønner/ betingelse). Preparering av hver forbindelse blir utført like før den tilsettes til cellkulturmediet.

Medikamenter blir tilsatt til et definert medium sammensatt av DMEM-F12, med 1 % Insulin-Transferrin-Selen-X (ITS, Invitrogen nr. 51300), 16 µg/ml putrescin, 0,02 µg/ml kortikosteron, 10 nM progesteron og 50 µg/ml gentamicin. Ved fravær av Forskolin under medikament-stimulering unngås adenylat syklase-metning.

1.2. Rensing av Schwann-celler ved Thy1.1 immunpanning.

For å unngå fibroblastkultur-kontaminering blir Schwann-celler rensset ved anvendelse av klon Thy1.1 (ATCC TIB-103™) immunpanning-metoden.

Antistoff-forhåndsbelagte 100 mm bakterie Petriskåler blir preparert som følger: disse platene blir vasket tre ganger med PBS og behandlet med 20 ml Tris HCl-løsning 50 mM, pH 9,5, med 10 µg/ml geit Anti-Mus IgM MU-antistoff (Jackson ImmunoResearch nr. 115-005-020) over natten ved 4 °C; deretter rensset 3 ganger med PBS og behandlet med en løsning av PBS med 0,02 % BSA og supernatant oppnådd fra T11D7e2 hybridomkultur (ATCC nr. TIB-103) inneholdende Thy1.1 IgM-antistoffet i 2 timer ved romtemperatur. Til slutt blir platene vasket tre ganger med PBS før cellesuspensjonene tilsettes.

SC blir løsnet med trypsin EDTA. Så snart majoriteten av celler er i suspensjon, blir trypsin nøytralisert med DMEM-10 % FBS og cellene blir sentrifugert. Pelletten av dissosierte celler blir resuspendert i 15 ml medium med 0,02 % BSA ved en tetthet på $0,66 \times 10^6$ celler per ml (maksimum) og overført til Petriskål (omtrent 6,6 millioner celler/10 ml/plate på 100 mm).

Cellesuspensjonen blir inkubert i den Thy 1.1-belagte Petriskålen i 45 min ved 37 °C med forsiktig risting hvert 15. min for å unngå ikke-spesifikk binding. Majoriteten av fibroblastceller som uttrykker Thy1.1 adhereres til platen. Ved slutten av inkubasjonen blir cellesuspensjonen gjenvunnet og sentrifugert. Denne cellesuspensjonen inneholder i teorien kun Schwann-celler. Celler blir sentrifugert og cellepellet blir suspendert i dyrkingsmedium med 10 µM Forskolin ved 16 000 celler/cm² i T75 cm² kolbe Poly-L-Lysin-behandlet.

1.3 - Kvantitativ revers transkriptase polymerase-kjedereaksjon (Q-RT-PCR)

Kvantitativ RT-PCR blir anvendt for å sammenligne nivåene av PMP22-mRNA etter medikament-stimulering, i forhold til husholdnings Ribosomal L13A-mRNA i rotte Schwann-celle primærkultur.

Etter rensing med kald sterilisert PBS, blir totalt RNA fra hver celleprøve ekstrahert og rensset fra SC ved anvendelse av Qiagen RNeasy micro kit (Qiagen nr. 74004). Nukleinsyrer blir kvantifisert ved Nanodrop spektrofotometer ved anvendelse av 1 µl RNA-prøve. RNA-integriteten blir bestemt ved et BioAnalyzer (Agilent)-apparat.

RNA blir revers transkribert til cDNA i henhold til standardmetode. cDNA-templater for PCR-amplifikasjon blir syntetisert fra 200 ng totalt RNA ved anvendelse av

SuperScript II revers-transkriptase (Invitrogen nr. 18064-014) i 60 min ved 42 °C i nærvær av oligo(dT), i et endelig volum på 20 µl.

cDNA blir underlagt PCR-amplifikasjon ved anvendelse av "LightCycler® 480" system (Roche Molecular Systems Inc.) Hvert cDNA blir fortynnet fem ganger før det blir anvendt for PCR-amplifikasjon. 2,5 µl av disse cDNA går inn i PCR reaksjonsløsningen (endelig volum på 10 µl). Preliminære forsøk sikret at kvantitering ble utført i den eksponensielle fasen av amplifikasjonsprosessen for begge sekvenser og at ekspresjon av referansegenet var homogen i de forskjellige kulturbetingelsene.

PCR-reaksjon blir utført ved amplifikasjon av 500 nM av forover-primer fra rotte PMP22 (NM_017037), 5-GGAAACGCGAATGAGGC-3 (SEQ ID NO: 1), og 500 nM av revers primer 5-GTTCTGTTTGGTTTGGCTT-3 (SEQ ID NO: 2) (amplifikasjon av 148 bp). Et 152 bp fragment av RPL13A ribosomalt (NM_173340) RNA blir amplifisert parallelt i separate reaksjoner for normalisering av resultatene ved anvendelse av en 500 nM forover-primer 5-CTGCCCTCAAGGTTGTG-3 (SEQ ID NO: 3), og en 500 nM av revers primer 5-CTTCTTCTCCGGTAATGGAT-3 (SEQ ID NO: 4).

Vi anvendte FRET kjemi for å utføre RT-Q-PCR-analyse. FRET prober er sammensatt av 0,3 µM Pmp22-FL-5-GCTCTGAGCGTGCATAGGGTAC (SEQ ID NO: 5) eller Rpl13A-FL-5-TCGGGTGGAAGTACCAGCC (SEQ ID NO: 6), merket ved 3'-enden med en donor fluorofofarge (Fluorescein). 0,15 µM Red640 prober er definert som følger: Pmp22-red-5'-AGGGAGGGAGGAAGGAAACCAGAAA (SEQ ID NO: 7) eller Rpl13A-red-5'-TGACAGCTACTCTGGAGGAGAAACGGAA (SEQ ID NO: 8) merket ved 5'-enden med en akseptor fluorofofarge (Rhodamin rød 640).

Hver PCR-reaksjon inneholdt 2,5 µl cDNA-templat i et endelig volum på 10 µl master mix kit (Roche nr. 04-887301001).

De følgende PCR-betingelsene anvendes: 10 sek ved 95 °C, 10 sek ved 63 °C og 12 sek ved 72 °C og 30 sek ved 40 °C (Førti amplifikasjonssykluser). De relative nivåene av PMP22 genekspresjon blir målt ved å bestemme forholdet mellom produktene dannet fra målgnet PMP22 og den endogene interne standarden RPL13A.

1.4 - PMP22 protein-ekspresjonsanalyse ved strømningscytometri (FACS)

Åtte timer, 24 timer og 48 timer etter medikament-inkubasjon blir supernatanter gjenvunnet, sentrifugert og frosset. SC blir løst med trypsin-EDTA. Så snart majoriteten av celler er i suspensjon, blir trypsin nøytralisert ved anvendelse av DMEM med 10 % FCS.

Supernatanter med celler blir gjenvunnet og sentrifugert. Pelletene av celler blir overført til mikrorør, vasket i PBS én gang og fiksert med en spesifikk løsning (AbCys nr.

Reagent A BUF09B). 10 minutter senere blir celler rensset én gang med PBS og holdt ved 4 °C.

Fem dager etter cellefiksering, blir alle cellepreparater med forskjellige inkuberingstider merket ved anvendelse av følgende metode:

Celler blir sentrifugert ved 7000 rpm i 5 minutter og pellettene blir suspendert i en løsning av permeabilisering (AbCys nr. Reagent B BUF09B) og merket med primært PMP22-antistoff (Abcam nr. ab61220, 1/50) i 1 time ved romtemperatur. Celler blir deretter sentrifugert ved 7000 rpm i 5 minutter og cellepellettene blir rensset én gang i PBS. Et sekundært antistoff blir tilsatt, koblet til Alexa Fluor 488 (geit anti-kanin IgG, Molecular Probes nr. A11008, 1/100), i én time ved romtemperatur. Celler blir deretter sentrifugert ved 7000 rpm i 5 minutter og cellepellett blir rensset én gang i PBS. Merkingen blir økt ved tilsetning av et tertiært antistoff koblet til Alexa Fluor 488 (kylling anti-geit IgG, Molecular Probes nr. A21467, 1/100) for én times inkubasjon ved romtemperatur. Celler blir deretter rensset én gang i PBS. Kontroll uten noe antistoff (umerkede celler) blir utført for å bestemme nivået av autofluorescens og tilpasset følsomheten av fotomultiplikatorer. Kontroll med både sekundært og tertiært antistoff men uten primært antistoff, blir utført for å vurdere ikke-spesifikk binding av antistoffer.

Datainnsamling og analyse blir utført med et FACS Array cytometer og FACS Array programvare (Becton Dickinson) for 5000 celler. Forward Scatter (FSC) korrelert med cellevolum (størrelse) og Side Scatter (SSC) avhengig av indre kompleksitet av celler (kornethet) blir analysert. For ekspresjon av PMP22 blir analyse utført innenfor totale celler og prosent av positive celler blir beregnet. Positive celler er celler med fluorescensintensitet høyere enn kontrollen med sekundært antistoff.

For å kvantifisere antallet av SC, blir celler i kontrollmedium analysert ved anvendelse av antistoffer anti-S100 Protein.

Celler blir preparert i henhold til følgende metode: Schwann-celler blir merket med antistoff anti-S100 Protein (Dako nr. S0311, 1/100) i 1 time ved romtemperatur. Dette antistoffet er merket i henhold til metode beskrevet ovenfor for PMP22 immunmerking men uten inkubasjon med tertiært antistoff.

1.5. Medikament-inkubasjon og aktivitet

Medikamenter blir inkubert i 24 timer eller 48 timer i det samme definerte mediet som beskrevet ovenfor (3 brønner/betingelse) i fravær av Forskolin for å unngå adenylat syklase stimulerings-meting, men i nærvær av 10 nM progesteron. Etter medikament-inkubasjon, blir supernatanter gjenvunnet og Schwann-celler blir frosset for RT-Q-PCR-analyse.

Disse forsøkene er oppsummert i Tabell 1.

Kombinasjon	PMP22-ekspressjon
Blanding1	Nedregulering
Blanding2	Nedregulering
Blanding3	Nedregulering
Blanding4	Nedregulering
Blanding5	Nedregulering
Blanding6	Nedregulering

2. Vurdering av synergistisk effekt av forbindelser i Blanding7 i en ko-kultur-modell for CMT.

En modell av ko-kultur ble anvendt som en *in vitro*-modell av CMT1A. Denne modellen av myelinisering består av ko-dyrking av sensoriske nevroner og Schwann-celler fra hann PMP22 Transgene (TG) dissosierte dorsale rotganglion (DRG).

Formålet med denne studien er å vurdere effekten av 3 testforbindelser (+/- baklofen, naltrekson og sorbitol) og Blanding7 (en blanding av disse tre medikamentene) på myeliniseringsprosessen. Effekten av de 3 testforbindelsene, og blanding derav på myelinisering, blir vurdert ved evaluering av myelin basisk protein (MBP)-ekspressjon i nærvær av askorbinsyre.

2.1 Materialer og metoder

Femten dagers gestasjon drektige hunnrotter blir avlivet ved cervikal dislokasjon. Embryoene blir fjernet fra uterus og er ved lignende føtalt stadium av utvikling.

2.1.1 Genotyping

En del av hvert embryo-hode (3 mm^3) blir plassert i et 2 ml rør DNase-fritt. DNA blir ekstrahert med SYBR Green Extract-N-Amp tissue PCR kit (Sigma, ref. XNATG-1KT). 120 μl av ekstraksjonsløsning (Kit Sigma, ref. XNATG-1KT) ble plassert på hver del av embryohode. Hodene blir inkubert i 10 min. ved romtemperatur. Ved slutten av denne inkubasjonen blir hodene inkubert i 5 minutter ved 95 °C i ekstraksjonsløsningen. Umiddelbart etter denne siste inkubasjonen blir 100 μl nøytraliserende løsning tilsatt, hvert DNA-ekstrakt blir fortynnet ved 1/40 med sterilt ultrarent ("ultrapure") vann (Biosolve, ref. 91589) og lagret ved +4°C inntil anvendelse. Genotypingen av hunn (F) og hann (M)-embryoer blir utført under disseksjonen av DRG, med settet Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem, 4385612). Kjønn av hvert embryo blir bestemt

ved anvendelse av hann SRY-genet. SRY-primerene er levert av Pharnext (SRY-F (SEQ ID NO:9): 5'-GAGAGAGGCACAAGTTGGC-3'; SRY-R (SEQ ID NO:10): 5'-GCCTCCTGGAAAAAGGGCC-3'). SRY-primere blir fortynnet ved 3 µM i sterilt ultrarent vann (Biosolve, ref. 91589). En blanding for PCR blir fremstilt med ultrarent vann (4 µl per prøve), primer ved 3 µM (2 µl per prøve) og Master Mix (10 µl per prøve). I en PCR 96-brønns plate, blir 16 µl PCR-blanding anbrakt i hver brønn. 4 µl av hvert fortynnet DNA blir tilsatt i henhold til en planlagt avsetning. PCR blir kjørt ved anvendelse av 7599 fast RT-PCR system (Applied Biosystem), med følgende program:

Start: 95 °C - 20 sek

45 sykluser: 95 °C - 10 sek, 65 °C - 10 sek, 72 °C - 30 sek (datainnsamling)

Smeltekurve: 95 °C - 15 sek, 64 °C - 1 min, 90 °C - 30 sek (kontinuerlig datainnsamling), 60 °C 15 sek. Amplifikasjons-plot og smeltekurver blir analysert med 7500 programvare (Applied Biosystems).

Resultatene for hver prøve blir sammenlignet med negativ kontroll (ultrarent vann) og med positiv kontroll (TG/Hann og WT/Hunn), for å konkludere med hensyn til genotypen av hvert embryo.

2.1.2 Sensoriske nevroner og Schwann-celle kokulturer

Dorsale rotganglioner fra rotte blir dyrket som tidligere beskrevet av Cosgaya et al, 2002 og Rangaraju et al, 2008.

Hvert embryo blir avlivet på numererte petriskåler (35 mm i diameter). Hodet av hvert embryo blir utskjært, plassert i 1,5 ml rør DNase-fritt; DNA blir ekstrahert med Extract-N-Amp Tissue Kit (Sigma Aldrich). Genotypingen (Hann (M) og hunn (F), villtype og PMP22 transgen) blir foretatt med settet Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem). Denne genotypingen blir utført parallelt med disseksjon av dorsal rotganglion (DRG), slik at ved slutten av disseksjonen er kun én type av kultur (DRG fra transgen hann) utført. DRG fra hvert embryo blir oppsamlet, plassert i iskaldt medium fra Leibovitz (L15, Invitrogen). Ved slutten av disseksjonen blir DRG fra TGM samlet og dissosiert ved trypsinering (trypsin EDTA, 0,05 %; Invitrogen) i 20 min ved 37 °C. Reaksjonen stanses ved tilsetning av DMEM inneholdende 10 % føtalt bovint serum (FBS) i nærvær av DNAase I (Roche). Suspensjonen blir triturerert med en 10 ml pipette. Celler blir deretter sentrifugert ved 350 x g i 10 min. ved romtemperatur. Pelletten av dissosierte celler blir resuspendert i neurobasal medium (Invitrogen), inneholdende 2 % av B27 (Invitrogen), 1 % penicillin-streptomycin (Invitrogen), 1 % i L-glutamin og 50 ng/ml NGF (Sigma). Dette mediet er neuronal-mediet. Viable celler blir tellt i et Neubauer cytometer ved anvendelse av trypanblå eksklusjonstest (Sigma) og sådd ut på basis av 10000 celler per brønn i 96-brønns plater (Greiner) behandlet med poly-L-lysin.

Platene blir opprettholdt ved 37 °C i en fuktet inkubator, i en atmosfære av luft (95 %)-CO₂ (5 %). Halvparten av standard neuronal kulturmediet blir byttet ut annenhver dag. Kulturene blir opprettholdt i standard neurobasalmedium i 7 dager for å tillate Schwann-cellene å gå inn i sensorisk nevron nevrittene. På dag 7 blir kulturene gitt standard nevronalmedium supplert eller ikke med 50 µg/ml askorbinsyre for å initiere basal lamina-dannelse og myelinisering.

2.1.3. Medikament-inkubasjon

På dag 7 blir følgende test-forbindelser (alene eller i kombinasjon) tilsatt til mediet med 50 µg/ml askorbinsyre:

- (RS)-baklofen
- natrekson
- D-sorbitol
- Blanding7= kombinasjon av de 3 individuelle forbindelsene.

Disse forbindelsene eller forbindelse-kombinasjonen blir testet ved følgende konsentrasjoner (Tabell 2):

		Dose 1	Dose 2	Dose 3	Dose 4	Dose 5	Dose 6	Dose 7
Individuelle medika- menter	Naltrekson	5µM	1µM	200nM	40nM	8nM	1.6nM	320pM
	D-Sorbitol	500µM	100µM	20µM	4µM	800nM	160nM	32nM
	(RS)- baklofen	5µM	1µM	200nM	40nM	8nM	1.6nM	320pM
Blanding7	Naltrekson	5µM	1µM	200nM	40nM	8nM	1.6nM	320pM
	D-Sorbitol	500 µM	100µM	20µM	4µM	800nM	160nM	32nM
	(RS)- baklofen	5µM	1µM	200nM	40nM	8nM	1.6nM	320pM

Tabell 2. Konsentrasjon av individuelle medikamenter eller i kombinasjon anvendt for *in vitro*-studier av MBP-ekspresjon i TG DRG/SC kokulturer.

Testforbindelsene blir inkubert i 5 forskjellige tidsrom: 5, 9, 10, 11 og 13 dager.

Tre separate og uavhengige kulturer av DRG (fra TG embryo hannrotter) blir utført. Disse betingelsene blir vurdert i nærvær av askorbinsyre, 6 brønner per betingelse. Løsningen klar til bruk for alle testforbindelsene blir ektemporært fremstilt fra en stock-løsning, lagret ved -20 °C. Denne løsningen blir fremstilt én gang i uken. Halvparten av standard neuronal mediet supplert med testforbindelsene og askorbinsyre (hver ved konsentrasjonen 1x) blir byttet ut annenhver dag.

2.1.4 Mergingsprotokoll

Etter 5, 9, 10, 11 og 13 dagers inkubasjon blir celler fiksert ved en kald løsning av etanol (95 %) og eddiksyre (5 %) i 10 min. Cellene blir permeabilisert og blokkert med PBS inneholdende 0,1 % saponin og 10 % geit-serum i 15 min. Deretter blir cellene inkubert med en spesifikk markør for myelin: polyklonalt antistoff anti-myelin basisk protein (MBP)-antistoff (Sigma 118K0431).

Dette antistoffet vises med Alexa Fluor 568 geit anti-kanin IgG og Alexa Fluor 488 geit anti-mus IgG (Molecular probe 687621, 623962). Kjerner av nevroner blir merket ved en fluorescerende markør (Hoechst solution, SIGMA ref. B1155).

2.1.5. Dataprosessering

Per brønn blir det tatt 20 bilder ved anvendelse av InCell Analyzer™ 1000 (GE Healthcare) med 20x forstørrelse. Alle bilder blir tatt ved samme betingelser. Analyse av total lengde av myeliniserte aksoner ble utført automatisk (lengde og område rundt aksoner) ved anvendelse av Developer programvare (GE Healthcare). Alle verdier vil bli uttrykt som gjennomsnitt $\pm$ s.e. gjennomsnitt. Statistiske analyser blir utført ved forskjellige betingelser (ANOVA fulgt av Fisher's PLSD-test når tillatt).

2.2. Resultater

Synergistisk effekt av medikamenter ved effekten av Blanding7

En viktig synergistisk effekt av medikamenter som utgjør Blanding7-kombinasjonen er observert ved MBP-ekspresjon. På dag 10 (= 17 dagers dyrking), økte faktisk kombinasjon av (RS)-baklofen, naltrekson og D-sorbitol MBP-ekspresjon betydelig ved dosene 1 og 6 som vist i Figurene 1A og 2A. I motsetning til dette hadde de ovennevnte medikamentene anvendt individuelt ingen vesentlig effekt sammenlignet med kontroll (Figurene 1B-D og 2B-D).

En signifikant effekt på MBP-ekspresjon er også registrert etter 10 dagers inkubasjon ved dosene 2, 3, 4, 5 og 7 av Blanding7 (Figur 3A).

Denne effekten er fortsatt observert på dag 11 med dosene 2-7 (Figur 3B) i form av en tydelig klokkeformet kurve.

C. Forsøk *in vivo* i CTM dyremodell

Vi testet forbindelsene med hensyn til terapeutisk effekt i en rotte-modell.

De eksperimentelle gruppene er dannet med unge rotter av begge kjønn separat.

Rottene blir anvist til gruppene ifølge randomiseringsplanen basert på kroppsvekten. I noen forsøk er randomiseringen basert på ytelsen hos rottene i stang-testen. Begge kjønn er representert ved separate kontrollgrupper som er numerisk like eller større enn behandlingsgruppene.

Rottene blir behandlet kronisk med medikamenter - tvangsforet eller injisert ved Alzet osmotisk subkutan pumpe (DURECT Corporation Cupertino, CA), avhengig av biotilgjengeligheten av hvert medikament i løpet av 3 eller 6 uker. I alle *in vivo*-forsøkene utført blir Blanding7 administrert ved gavage.

Dyrene blir veid to ganger per uke for å justere dosene til økende kroppsvekt. Dersom den osmotiske pumpen blir valgt for administrering av behandlingen, blir dosene av medikamentet beregnet på grunnlag av den estimerte gjennomsnittlige kroppsvekten av dyrene forventet for deres alder over perioden av pumpevarigheten (6 uker). Pumpene blir re-implantert om nødvendig, med egnet anestesi-metode.

Adferdstester

Hver tredje eller fjerde uke blir dyrene underlagt en adferstest. Hver test blir utført av samme undersøker i samme rom og på samme tid på dagen; denne homogeniteten blir opprettholdt gjennom hele forsøket. Alle behandlinger og genotypebestemmelse er blindet for undersøkeren. "Stang-test" og "grepstyrke" har blitt hovedsakelig anvendt for å vurdere ytelsen gjennom hele studien. Planen for stang-testen kan endres ettersom dyret vokser (for å unngå påvirkning på grunn av læring, for eksempel).

Analysen av grepstyrke muliggjør påvisning av subtile forskjeller i grep-ytelsen som synes å være sammensatt av muskelkraft, sensitivitetsstatus (for eksempel kan smertefulle taktile følelser endre målte verdier av kraften), adferdskomponent ("motivasjon"). Verdiene er ulike mellom for- og bakben og avhenger i høy grad av alderen av dyrene.

Grepstyrke-testen måler styrken med hvilken et dyr holder fast til et grep med dets forlabber eller dets baklabber hver for seg. Et dynamometer er plassert med et grep for å måle styrken (Force Gauge FG-5000A). Rotten blir holdt av eksperimentatoren på en

måte slik at den holder fast grepet enten med dens forlabber eller med dens baklabber og drar forsiktig rotten bakover helt til den løsner grepet. Kraften målt når dyret løsner grepet blir registrert.

To suksessive forsøk som måler styrken av forlabbene og to suksessive forsøk som måler styrken av baklabbene per dyr blir utført; kun maksimal score (ett for forlabbene og ett for baklabbene) blir notert (i N).

Stang-testen

Stang-testen evaluerer rotters evne til å vedbli på en festet stang. Pmp22-rotter som fremviser muskelsvakhet, oppviser et funksjonstap i denne testen (Sereda et al, 1996). Rotten blir plassert på dens fire labber på midten av stangen (diameter: 2,5 cm; lengde: 50 cm; 30 cm over bordet). Forsøk blir utført fortløpende; antallet og varigheten av forsøk i våre eksperimenter har vært avhengig av batcher av dyrene. Denne variabiliteten i testingen har blitt innført for å bestemme oppstillingen passende for beste deteksjon av motorisk defisitt hos CMT-rottene i løpet av forsøkene.

Ytelses indeks blir registrert ved hver sesjon:

- Antall forsøk nødvendig for å holde i 60 sek (eller 30 sek for batch 1, sesjon 1 og 2) på staven.
- Tiden tilbrakt på stangen (dvs. fall latensen) i hvert forsøk og gjennomsnittet for sesjonen. I de eksperimentelle metodene hvor sesjonen ender etter at rotten har oppholdt seg i en cut-off tid, dvs. 30 eller 60 s, på staven, blir en utførelse av cut-off tiden (30 s eller 60 s) tilskrevet forsøk ikke fullført (f.eks.: for batch 8, for et dyr som oppholder seg på staven mindre enn 10 sek i forsøk 1, 2 og 3, deretter i 60 sek for forsøk 4 og 5, 60 s er tillagt forsøk 6 til 10).
- Antall fall.

Generell helsevurdering

Kroppsvekt, åpenbare tegn (utseende av pelsen, kroppsholdning, gange, skjelving osv.) hos dyrene blir registrert gjennom hele forsøket. Graderingsskala blir anvendt for registrering: 0= normal, 1=unormal.

Gangen

Hver rotte blir observert i et nytt rottebur (dimensjoner 55 x 33 x 18cm) uten kullet i fem minutter. Gangen hos rotter blir evaluert med 4 parametre:

- Score 0: normal gange (fluid)

- Score 1: unormal gange (ikke fluid eller rotten har en lett halting)
- Score 2: moderat manglende evne (rotten drar på den ene foten og er i stand til å plassere den riktig og gå)
- Score 3: alvorlig i manglende evne (rotten drar på den ene eller begge baklabbene men er ikke i stand til å plassere den/dem riktig).

Skråplan-test

Det skyvbare apparatet hadde et 30x50 cm pleksiglassplan som kunne helles ved en vinkel på 0° (horisontalt) til 60°. Hver rotte ble initielt plassert på skråplanet ved 25° vinkel med hodet opp-posisjonen (hodet opp orientering); to forsøk atskilt med 1 min blir utført. 30 min senere blir samme forsøk gjennomført på et skråplan med vinkel på 35 ° deretter på skråplan med 40° vinkel. I løpet av denne tiden ble rotten returnert til buret sitt. Planet blir renset etter hvert forsøk.

Rottenes ytelse blir evaluert ved 4 forskjellige scores:

- Score 0: ingen glidning
- Score 1: litt glidning (én eller to labber)
- Score 2: en moderat glidning (4 labber) men ikke før enden av planet
- Score 3: rotten glir helt til bunnen av planet.

Ytterligere tester

Når hensiktsmessig blir rottene underlagt elektrofysiologisk evaluering, histologisk måling og pmp RNA ekspresjonsnivå i isjasnerven blir kvantifisert.

Kvantifisering av pmp22-RNA i isjasnerve ved kvantitativ RT-PCR

Totalt RNA ble isolert fra venstre isjasnerve ved anvendelse av Quiazol (ref. N °79306, Qiagen GmbH, Tyskland) fulgt av ett-trinns rensemetode med RNeasy Mini Kit (ref. N °74106, Qiagen GmbH, Tyskland) beskrevet av produsentens protokoll (Qiagen-RNeasy Fibrous tissue Handbook). DNA-kontaminering ble fjernet ved kløyving med RNase-free DNase I ved bruk av DNA-fritt kit (Qiagen-Rnase-free DNase set 1500 Kunits, ref N° 1023460).

RNA-konsentrasjoner blir estimert ved NanoDrop ND-1000 og en test for kvalitetskontroll ble utført ved Agilent RNA 6000 nanochips på Agilent 2100 Bioanalyzer.

Revers transkripsjon og real-time PCR: Kvantitativ RT-PCR (RT-Q-PCR) ble utført som følger: 80 ng av totalt RNA ble revers transkribert ved anvendelse av SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) med Oligo(dT)12-18 (Invitrogen, Carlsbad, CA) i et 20 µl reaksjonsvolum.

Real-time PCR ble utført med et hurtig "thermal cycler" system (LightCycler® 480 II, 384-Well, Roche, Sveits). Amplifikasjoner ble utført i et 10 µl totalt volum med primer-konsentrasjon optimalisert mellom 130 nM og 1 µM. Primere og templat er supplert med LightCycler 480 SYBR Green I Master (2 x kons. Roche, Cat. Ref nr. 04 887 352 001). Nukleotider, MgCl₂, Taq DNA polymerase og buffer er inkludert i blandingen. En amplifikasjonsprotokoll innlemmet en initiell inkubasjon ved 95 °C i 10 min for aktivering av Taq DNA polymerase fulgt av 45 sykluser, med en 95 °C denaturering i 10 s, 60 °C annealing i 40 s og 72 °C, forlengelse i 10s, (deteksjon av fluorescerende produkt ble utført ved slutten av den 72 °C forlengelsesperioden ved en enkelt akvisisjonsmodus) og endte ved en syklus av smeltekurve med 95 °C denaturering i 5 s, 63 °C annealing i 60 s og 95 °C (fra 63 °C til 95 °C er ramp raten 0,11 °C/s og deteksjon av det fluorescerende produktet var kontinuerlig). For å bekrefte amplifikasjonsspesifisiteten, ble PCR-produktet fra hvert primerpar underlagt en smeltekurve-analyse. Relativ kvantifisering ble utført basert på krysningpunktet (Cp-verdi) for hver av PCR-prøvene. Det punktet ved hvilket fluorescensen av en prøve stiger over bakgrunnsfluorescensen kalles krysningpunktet (Cp) for prøven. *Rattus norvegicus* Myelin Protein Zero (MPZ)-genet ble anvendt for normalisering (Sereda et al., 2006). Sekvensene av primerene (syntetisert av Eurofins MWG Operon, Tyskland) anvendt for RT-Q-PCR-analysen er:

PMP22 – forover: 5'-TGTACCACATCCGCCTTGG-3' (SEQ ID NO: 11) og

PMP22 – revers: 5'-GAGCTGGCAGAAGAACAGGAAC-3' (SEQ ID NO: 12).

MPZ- forover: 5'-TGTTGCTGCTGTTGCTCTTC-3' (SEQ ID NO: 13) og

MPZ-revers: 5'-TTGTGAAATTTCCCCTTCTCC-3' (SEQ ID NO: 14).

Resultater

Blanding1-preparat forbedret stang-test ytelse gjennom hele behandlingsprosedyren (Fig 4).

Blanding1 forbedrer gange-score hos transgene rotter etter 3 og 6 ukers behandling som vist i figur 5.

Blanding1 øker ytelsene hos transgene rotter etter 3, 6, 9 og 12 ukers behandling i skrålplan-testen ved 25° beskrevet i figur 6.

Figur 7 illustrerer den positive effekten av Blanding2 på gange-score hos transgene rotter ved 25, 35 og 40° i skrålplan-testen.

Blanding7 (dose 3) reduserer i betydelig grad pmp22 RNA genekspressjonen i isjasnerven hos pmp22 transgene rotter (Figur 9).

Ytelsene hos pmp22-rotter behandlet med Blanding7 (dose 2 og dose 3) blir forbedret i skråplan-testen ved 35° (Figur 10). Nærmere bestemt tilhører 29 og 33 % av rottene god ytelse-gruppen, sammenlignet med 5 % for TG placebogruppen, og 29 og 11 % av rottene tilhører dårlig ytelse-gruppen sammenlignet med 60 % for TG placebogruppen. P-verdi (versus TG-placebo) er lik 0,0152 for TG rottene behandlet med Blanding7-dose 2 og p-verdi er lik 0,002 for TG rotter behandlet med Blanding7-dose 3 versus TG-placebo).

Blanding7-dose 3 øker i betydelig grad fall latenstiden for PMP22-rotter i stang-test etter 9 ukers behandling (Figur 11): svart prikket linje, $p=4,56 \cdot 10^{-2}$, $n=18$. Signifikant forskjell mellom TG placebo-rotter (svart, jevn linje, $n=20$) og WT placebo-rotter (grå jevn linje, $p=3,82 \cdot 10^{-7}$, $n=18$) er også observert.

Figur 12 illustrerer forbedringen av grepstyrken hos pmp22-rotter behandlet med Blanding7-dose 3.

Figur 13 viser signifikant korrelasjon mellom stang-test latensen (etter 9 ukers behandling med Blanding7-dose 3) og ekspresjonsnivået av pmp22-RNA.

Figur 14 fremviser signifikant korrelasjon mellom stang-test latenstiden etter 9 ukers behandling med Blanding7-dose 3 og ledningshastigheten for den sensitive nerven (hale).

Lignende resultater kan frembringes for andre kombinasjoner (se Tabell 3).

Tabell 3

Kombinasjon	PMP22 rotte sykdom fenotype
Blanding1	Forbedring
Blanding2	Forbedring
Blanding3	Forbedring
Blanding4	Forbedring
Blanding5	Forbedring
Blanding6	Forbedring

Disse data viser at, *in vivo* muliggjør kombinasjonene og regimene ifølge foreliggende oppfinnelse effektiv behandling av CMT.

D. In vivo-effekt i en modell av toksisk nevropati

Medikamentbehandlingene eller regimene blir oralt administrert fra dagen før den første intraperitoneale injeksjon av Oxaliplatin 3mg/kg (D -1) inntil dagen før den siste test-dagen (D16). Dyr som tilhører den Oxaliplatin-behandlede gruppen blir dosert daglig med destillert vann (10 ml/kg). Dyr blir dosert med den testede behandlingen og destillert vann daglig om morgenen mens Oxaliplatin blir administrert på ettermiddagen.

På test-dagene (dvs. D1, D4, D10), blir behandlingen og destillert vann administrert etter testen. Angående test-dagen (D4), inkludert forbindelser og konstituent administreringer og Oxaliplatin-injeksjon, blir behandlingen og destillert vann administrert før injeksjon av Oxaliplatin etter testen. Dyr fra den referanse-behandlede gruppen blir dosert kun under test-dagene (dvs. D1, D4, D10 og D17).

Kald allodyni blir vurdert ved å måle responsene på termal ikke-nociceptiv stimulering (aceton-test) på D1 (ca. 24 t etter første injeksjon av Oxaliplatin 3 mg/kg (akutt effekt av Oxaliplatin)), på D4, D10 og (kronisk effekt av Oxaliplatin) og på D17 (rest-effekt av Oxaliplatin én uke etter fullføring av behandling).

Testing blir utført ved anvendelse av aceton-testen 2 t etter administrering av referansen. Referanse-substansen er Gabapentin, 100 mg/kg, per os (én gang per dag x 4 test-dager).

Aceton-test

Kald allodyni blir vurdert ved anvendelse av aceton-testen. I denne testen blir latens for tilbaketreking av baklabb målt etter applikasjon av en dråpe aceton på overflaten av fotsålene på begge baklabbene (reaksjonstid) og intensiteten av responsen blir scoret (kald score).

Reaksjonstid for kjølige effekten av aceton blir målt innen 20 sek (cut-off) etter aceton-applikasjon. Responser på aceton blir også gradert i følgende 4-punkts skala: 0 (ingen respons); 1 (hurtig tilbaketreking, risting av labben); 2 (langvarig tilbaketreking eller tydelig risting med labben); 3 (gjentatt risting med labben med slikking eller biting).

Seks forsøk med rotter blir utført. For hver eksperimentell gruppe blir resultatene uttrykt som kumulativ kald score definert som summen av de 6 scorene for hver rotte sammen

± SEM. Minimum score er 0 (ingen respons på noen av de 6 forsøkene) og maksimal mulig score er 18 (gjentatt risting og slikking eller biting av labber på hvert av de seks forsøkene).

Gabapentin-kilde: Zhejiang Chiral Medicine Chemicals, Kina

Oxaliplatin-kilde: Sigma, Frankrike

Resultatene er vist i Figur 8. De viser tydelig en beskyttende effekt av preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse på oxaliplatin-indusert nevropati.

E. In vivo-effekt i en modell av ALS

Dyremodell

Vi har valgt SOD1^{G93A} rottemodell (utviklet av Howland et al) for å etterligne amyotrofisk lateralsklerose patologien. Denne modellen overuttrykker det muterte SOD1-genet i ryggmargen, mange hjerneregioner så vel som perifere vev. Debut av motornevron-sykdommen i denne modellen er omtrent ved 115 dager; den viser seg som unormal gange med baklabbe. På få dager oppstår paralyse av baklabbe.

Eksperimentelle metoder

Vi oppnådde kolonier ved krysning av oppdretts SOD1^{G93A} -rotter med Sprague Dawley hunnrotter. Heterozygote SOD1^{G93A}-rotter ble identifisert med polymerasekjedereaksjon (PCR) av hale-DNA med primere spesifikke for hSOD1 [1]. Dyr ble holdt i et rom med kontrollert belysning (lys på kl. 0500-1900) og temperatur (23 ± 1 °C), og gitt fri tilgang til mat og vann. Alle dyreforsøkene i foreliggende studie ble utført i overensstemmelse med standard retningslinjer for dyrevelferd.

Måling av kroppsvekt ble utført hver uke og atferdstester startet ved en alder på 60 dager og fortsatte helt til endepunktet. Behandlingene ble administrert hver dag per oral eller subkutan administreringsvei fra en alder på 5 uker.

1. Observasjonstest: karakterisering av det generelle aspektet

Hver rotte ble observert i et nytt rottebur (dimensjoner 55x33x18 cm) uten kull i fem minutter. 5 forskjellige parametre blir registrert:

Gange

- score 0: normal gange (fluid)
- score 1: unormal gange (ikke fluid eller rotten har en svak halting)
- Score 2: moderat manglende evne (rotten drar på den ene foten og er i stand til å plassere den riktig og gå)

- Score 3: alvorlig manglende evne (rotten drar på den ene eller begge baklabbene men er ikke i stand til å plassere den/dem riktig).

Pels-aspekt

- score 0: ren og silkemyk pels
- score 1: piloereksjon eller skitten pels

Skjelving

- score 0: ingen skjelving
- score 1: skjelving

Kroppsholdning

- score 0: normal
- score 1: unormal (flattrykt eller krummer ryggen)

Posisjon av baklabb

- score 0: normal
- score 1: strekke ut baklabber

2. Motorisk score-testen: karakterisering av motorisk defisitt

Denne testen evaluerer rottenes evne til å rette seg opp innen 30 sek fra å være snudd til den ene eller andre siden (retterefleks) (Gale et al) .

Et ikke-parametrisk scoringssystem ble anvendt ifølge disse kriteriene (Matsumoto et al, Thonhoff et al):

- score 0: rotten er ikke i stand til å rette seg opp fra den ene eller andre siden innen 30 sek
- score 1: rotten er ikke i stand til å rette seg opp fra kun én side innen 30 sek
- score 2: rotten er i stand til å rette seg opp fra begge sider innen 30 sek men er ikke i stand til å stå i buret; den drar alltid en del av kroppen
- score 3: rotten er i stand til å rette seg opp fra begge sider innen 30 sek, er ikke i stand til å stå i buret men drar ikke noen deler av kroppen
- score 4: rotten er i stand til å rette seg opp fra begge sider innen 30 sek, er i stand til å stå i buret men har synlige funksjonelle mangler
- score 5: rotten er i stand til å rette seg opp fra begge sider innen 30 sek, er i stand til å stå i buret og ingen synlige funksjonelle mangler.

Endepunktet for sykdom er fastsatt ved score 0; rotten blir deretter avlivet.

3. Skråplan-test : karakterisering av motorisk defisitt

Det skyvbare apparatet hadde et 30x50 cm plexiglassplan som kunne helles ved en vinkel på 0° (horisontalt) til 60°. Hver rotte ble initielt plassert på skråplanet ved 25° vinkel i hodet opp-posisjonen (hodet opp orientering); to forsøk atskilt med 1 min blir

utført. 30 min senere blir samme forsøk gjennomført på et skråplan med vinkel på 35 ° deretter på skråplan med 40° vinkel. Under denne tiden ble rotten returnert til buret sitt. Planet blir renset etter hvert forsøk.

Ytelsene for rotter blir evaluert ved 4 forskjellige scores:

- score 0: ingen glidning
- score 1: litt glidning (én eller to labber)
- score 2: en moderat glidning (4 labber) men ikke før enden av planet
- score 3: rotten glir helt til bunnen av planet.

4. Trådduk-testen : karakterisering av motorisk evne i vanskelig situasjon

En trådduk ble plassert i kontakt med en eske på toppen (ved en vinkel på 70°) og kanten av et bord ved bunnen. Hver rotte ble plassert på bunnen av trådduken og motivert til å klatre opp ved å plassere deres kullsøsken i esken på toppen. Hver rotte ble trenet én gang pr uke (3 forsøk).

Det registrerte parametret var latenstiden for å nå toppen av trådduken.

5. Åpent felt-testen : karakterisering av bevegelsesaktiviteten

Bevegelsesaktiviteten ble målt i en pleksiglass-eske (45x45x30 cm, Acti-Track ved BIOSEB, Lyon, Frankrike) med 16 fotocellestråler som følger de to aksene, 1 og 5 cm over gulvet.

Den spontane og undersøkende aktiviteten av hver rotte ble evaluert i løpet av 3 timer. 4 parametre blir registrert (den totale tilbakelagte avstanden, antall reise seg på bakbeina, prosentandel av tilbakelagt avstand og av tid tilbrakt midt i det åpne feltet).

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 $\alpha 6 \beta 4$ integrin, and its absence alters the Schwann cell basal lamina. *J Neurosci*. 2006; 26(4):1179-1189.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Constable AL, Armati PJ. DMSO induction of the leukotriene LTC₄ by Lewis rat Schwann cells. *J Neurol Sci* 1999; 162(2): 120-126.

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

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.

Diep QN, Benkirane K, Amiri F, Cohn JS, Endemann D, Schiffrin EL. PPAR alpha activator fenofibrate inhibits myocardial inflammation and fibrosis in angiotensin II-infused rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2004; 36 (2): 295-304.

Dracheva S, Davis KL, Chin B, Woo DA, Schmeidler J, Haroutunian V. Myelin-associated mRNA and protein expression deficits in the anterior cingulate cortex and hippocampus in elderly schizophrenia patients. *Neurobiol Dis*. 2006 Mar;21(3):531-540.

D'Urso D, Ehrhardt P, Müller HW. Peripheral myelin protein 22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. *J Neurosci*. 1999; 19(9):3396-3403 .

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

Fortun J, Li J, Go J, Fenstermaker A, Fletcher BS, Notterpek L. Impaired proteasome activity and accumulation of ubiquitinated substrates in a hereditary neuropathy model. *J Neurochem* 2005; 92:1531-1541.

Fortun J, Go JC, Li J, Amici SA, Dunn WA Jr, Notterpek L. Alterations in degradative pathways and protein aggregation in a neuropathy model based on PMP22 overexpression. *Neurobiol Dis*. 2006; 22(1):153-164.

Fortun J, Verrier JD, Go JC, Madorsky I, Dunn WA, Notterpek L. The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of cytoplasmic chaperones. *Neurobiol Dis*. 2007; 25(2): 252-265.

Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol*. 1985 Apr; 88(1):123-34.

Galvez AS, Ulloa JA, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros LF, Lavandero S. Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis: differential effects of sorbitol and mannitol. *J Biol Chem*. 2003; 278(40):38484-38494.

Groyer G, Eychenne B, Girard C, Rajkowski K, Schumacher M, Cadepond F. Expression and functional state of the corticosteroid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in Schwann cells. *Endocrinology*. 2006; 147(9):4339-4350.

Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Feb 5; 99(3):1604-9. Epub 2002 Jan 29.

Kantamneni S, Corrêa SA, Hodgkinson GK, Meyer G, Vinh NN, Henley JM,

Nishimune A. GISP: a novel brain-specific protein that promotes surface expression and function of GABA(B) receptors. *J Neurochem.* 2007;100(4):1003-17.

Khajavi M, Shiga K, Wiszniewski W, He F, Shaw CA, Yan J, Wensel TG, Snipes GJ, Lupski JR. Oral curcumin mitigates the clinical and neuropathologic phenotype of the Trembler-J mouse: a potential therapy for inherited neuropathy. *Am J Hum Genet.* 2007; 81(3): 438-453.

Kobsar I, Hasenpusch-Theil K, Wessig C, Müller HW, Martini R. Evidence for Macrophage-Mediated Myelin Disruption in an Animal Model for Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 1A. *J. Neurosci Res* 2005; 81:857-864.

Lange CA, Shen T et al. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *PNAS USA.* 2000; 97: 1032-1037.

Le-Niculescu H, Kurian SM, Yehyawi N, Dike C, Patel SD, Edenberg HJ, Tsuang MT, Salomon DR, Nurnberger JI Jr, Niculescu AB. Identifying blood biomarkers for mood disorders using convergent functional genomics. *Mol Psychiatry.* 2008 Feb 26. [Epub ahead of print].

Li WW, Le Goascogne C, Ramaugé M, Schumacher M, Pierre M, Courtin F. Induction of type 3 iodothyronine deiodinase by nerve injury in the rat peripheral nervous system. *Endocrinology.* 2001; 142(12):5190-5197.

Lupski JR, Wise CA, Kuwano A, Pentao L, Parke JT, Glaze DG, Ledbetter DH, Greenberg F, Patel PI. Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet.* 1992 ;1(1): 29-33.

Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Okano H. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats.. *J Neurosci Res.* 2006 Jan; 83(1):119-33.

Mäurer M, Kobsar I, Berghoff M, Schmid CD, Carenini S, Martini R. Role of immune cells in animal models for inherited neuropathies: facts and visions. *J Anat.* 2002; 200(4): 405-414.

Melcangi RC, Cavarretta IT, Ballabio M, Leonelli E, Schenone A, Azcoitia I, Miguel Garcia-Segura L, Magnaghi V. Peripheral nerves: a target for the action of neuroactive steroids. *Brain Res Rev.* 2005; 48(2): 328-338.

Mercier G, Turque N, Schumacher M. Rapid effects of triiodothyronine on immediate-early gene expression in Schwann cells. *Glia.* 2001; 35(2):81-89.

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

Meyer zu Horste G, Prukop T, Liebetanz D, Mobius W, Nave KA, Sereda MW. Antiprogestosterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Ann Neurol.* 2007; 61 (1): 61-72.

Miller AL, Garza AS, Johnson BH, Thompson EB. Pathway interactions between MAPKs, mTOR, PKA, and the glucocorticoid receptor in lymphoid cells. *Cancer Cell Int.* 2007; 28:7:3

Muja N, Blackman SC, Le Breton GC, DeVries GH. Identification and functional characterization of thromboxane A2 receptors in Schwann cells. *J Neurochem.* 2001; 78(3):446-456.

Muller DL, Unterwald EM. In Vivo Regulation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase (ERK) and Protein Kinase B (Akt) Phosphorylation by Acute and Chronic Morphine. *JPET* 2004; 310:774-782.

Nambu H, Kubo E, Takamura Y, Tsuzuki S, Tamura M, Akagi Y. Attenuation of aldose reductase gene suppresses high-glucose-induced apoptosis and oxidative stress in rat lens epithelial cells. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008; 82(1):18-24.

Nave KA, Sereda MW, Ehrenreich H. Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies--from basic to clinical research. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007; 3(8): 453-464.

Niemann S., Sereda M.W., Rossner M., Stewart H., Suter U., Meinck H.M., Griffiths I.R., Nave K-A. The "CMT rat": peripheral neuropathy and dysmyelination caused by transgenic overexpression of PMP22. *Ann. N.- Y. Acad. Sci.* 1999; 883:254-261.

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

Obrietan K, van den Pol AN. GABAB receptor-mediated inhibition of GABAA receptor calcium elevations in developing hypothalamic neurons. *J Neurophysiol.* 1998; 79(3):1360-1370.

Ogata T, Iijima S, Hoshikawa S, Miura T, Yamamoto S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S Opposing extracellular signal-regulated kinase and Akt pathways control Schwann cell myelination. *J Neurosci.* 2004; 24(30):6724-6732.

Ohsawa Y, Murakami T, Miyazaki Y, Shirabe T, Sunada Y. Peripheral myelin protein 22 is expressed in human central nervous system. *J Neurol Sci.* 2006; 247(1):11-15.

Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontes M. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nature Med.* 2004; 10(4): 396-401.

Perea J, Robertson A, Tolmachova T, Muddle J, King RH, Ponsford S, Thomas PK, Huxley C. Induced myelination and demyelination in a conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(10):1007-1018.

Rangaraju S., Madorsky I., Pileggi JG, Kamal A., Notterpek L., Pharmacological induction of the heat shock response improves myelination in a neuropathic model. *Neurobiology of Disease*. 2008; 32(105-115).

Roa BB, Garcia CA, Suter U, Kulpa DA, Wise CA, Mueller J, Welcher AA, Snipes GJ, Shooter EM, Patel PI, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med*. 1993; 329(2): 96-101.

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.

Robert F, Guennoun R, Désarnaud F, Do-Thi A, Benmessahel Y, Baulieu EE, Schumacher M. Synthesis of progesterone in Schwann cells: regulation by sensory neurons. *Eur J Neurosci*. 2001; 13(5): 916-924.

Roux KJ, Amici SA, Notterpek L. The temporospatial expression of peripheral myelin protein 22 at the developing blood-nerve and blood-brain barriers. *J Comp Neurol*. 2004; 474(4):578-588.

Sancho S, Young P, Suter U. Regulation of Schwann cell proliferation and apoptosis in PMP22-deficient mice and mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 2001; 124(Pt 11): 2177-2187.

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

Sereda MW, Meyer zu Horste G, Suter U, et al. Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med* 2003; 9: 1533-1537.

Sereda MW, Nave KA. Animal models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A). *Neuromol Med* 2006; 8: 205-215.

Stirnweiss J, Valkova C, Ziesché E, Drube S, Liebmann C. Muscarinic M2 receptors mediate transactivation of EGF receptor through Fyn kinase and without matrix metalloproteases. *Cell Signal*. 2006; 18(8):1338-1349.

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

Suter U, Welcher AA, Ozcelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U, Billings-Gagliardi S, Sidman RL, Shooter EM. Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature*. 1992; 356(6366): 241-244.

Thonhoff JR, Jordan PM, Karam JR, Bassett BL, Wu P. Identification of early disease progression in an ALS rat model. *Neurosci Lett*. 2007 Mar 30; 415(3):264-8. Epub 2007 Jan 14.

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

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

Tu H, Rondard P, Xu C, Bertaso F, Cao F, Zhang X, Pin JP, Liu J. Dominant role of GABAB2 and Gbetagamma for GABAB receptor-mediated-ERK1/2/CREB pathway in cerebellar neurons. *Cell Signal*. 2007; 19(9):1996-2002.

Uht RM, Anderson CM, Webb P, Kushner PJ. Transcriptional activities of estrogen and glucocorticoid receptors are functionally integrated at the AP-1 response element. *Endocrinology*. 1997 Jul;138(7):2900-2908.

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

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.

Walter IB. Nuclear triiodothyronine receptor expression is regulated by axon-Schwann cell contact. *Neuroreport*. 1993; 5(2):137-140.

Walter IB, Deruaz JP, de Tribolet N. Differential expression of triiodothyronine receptors in schwannoma and neurofibroma: role of Schwann cell-axon interaction. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1995; 90(2):142-149.

Welch WJ, Brown CR. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones*. 1996;1(2):109-115.

Woodhams PL, MacDonald RE, Collins SD, Chessell IP, Day NC. Localisation and modulation of prostanoid receptors EP1 and EP4 in the rat chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pain*. 2007; 11(6):605-613.

SEKVENSLISTER

<110> PHARNEXT
 <120> Nye preparater for behandling av CMT og beslektede lidelser
 <130> B888PC00
 <140> EP 09 305506.9
 <141> 2009-06-02
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> kunstig sekvens
 <220>
 <223> forover-primer rotte PMP22
 <400> 1
 ggaaacgcga atgaggc 17
 <210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> kunstig sekvens
 <220>
 <223> revers primer_rotte PMP22
 <400> 2
 gttctgtttg gtttgctt 19
 <210> 3
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> kunstig sekvens
 <220>
 <223> forover-primer_RPL13A
 <400> 3
 ctgccctcaa gggtgtg 17
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> kunstig sekvens
 <220>
 <223> revers primer_RPL13A
 <400> 4
 cttcttcttc cggtaatgga t 21
 <210> 5
 <211> 22

<212> DNA
 <213> kunstig sekvens

<220>
 <223> forover-primer_Pmp22-FL

<400> 5
 gctctgagcg tgcatagggt ac 22

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> kunstig sekvens

<220>
 <223> forover-primer_Rp113A-FL

<400> 6
 tcgggtggaa gtaccagcc 19

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> kunstig sekvens

<220>
 <223> revers primer_Pmp22-red

<400> 7
 agggaggag gaaggaaacc agaaa 25

<210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> kunstig sekvens

<220>
 <223> revers primer_Rp113A-red

<400> 8
 tgacagctac tctggaggag aaacggaa 28

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> kunstig sekvens

<220>
 <223> SRY - forover

<400> 9
 gagagaggca caagttggc 19

<210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> kunstig sekvens

<220>
 <223> SRY - revers

<400> 10
 gcctcctgga aaaagggcc 19

<210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> kunstig sekvens

<220>
 <223> PMP22- forover

<400> 11
 tgtaccacat ccgccttgg 19

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> kunstig sekvens

<220>
 <223> PMP22 - revers

<400> 12
 gagctggcag aagaacagga ac 22

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> kunstig sekvens

<220>
 <223> MPZ - forover

<400> 13
 tgttgctgct gttgctcttc 20

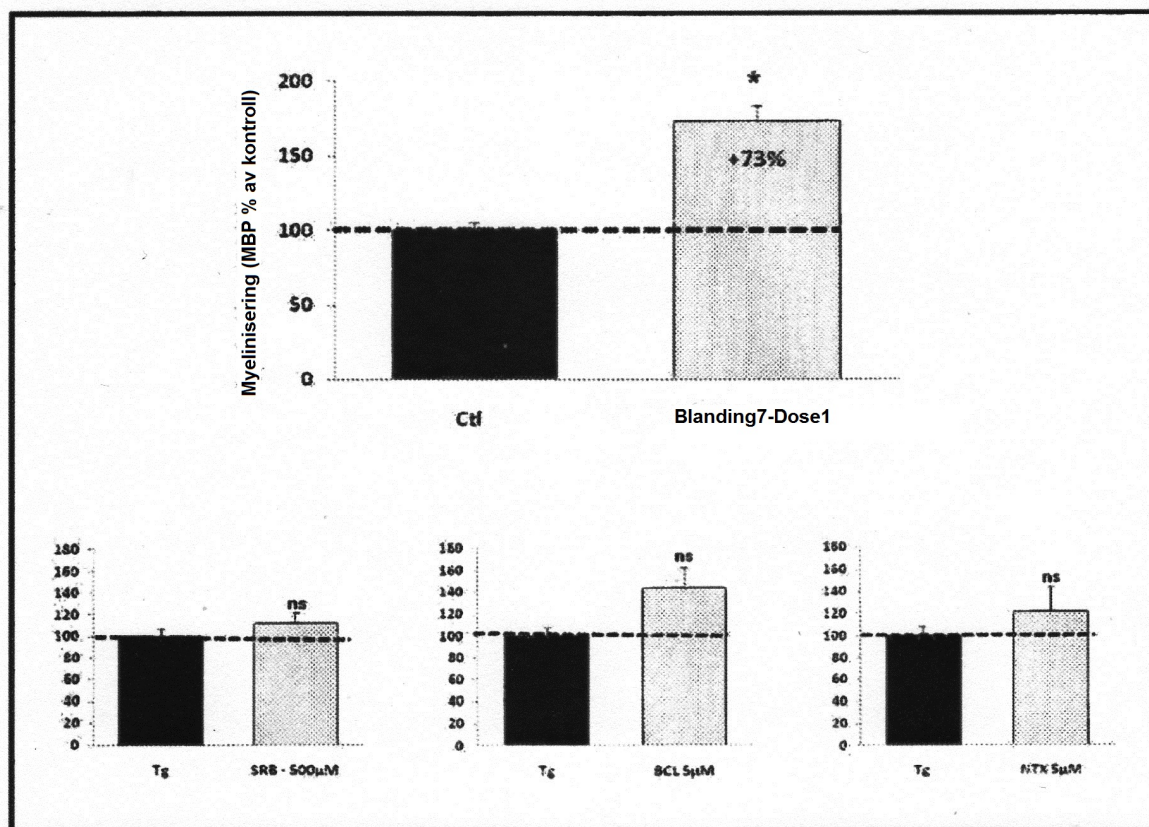
<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> kunstig sekvens

<220>
 <223> MPZ - revers

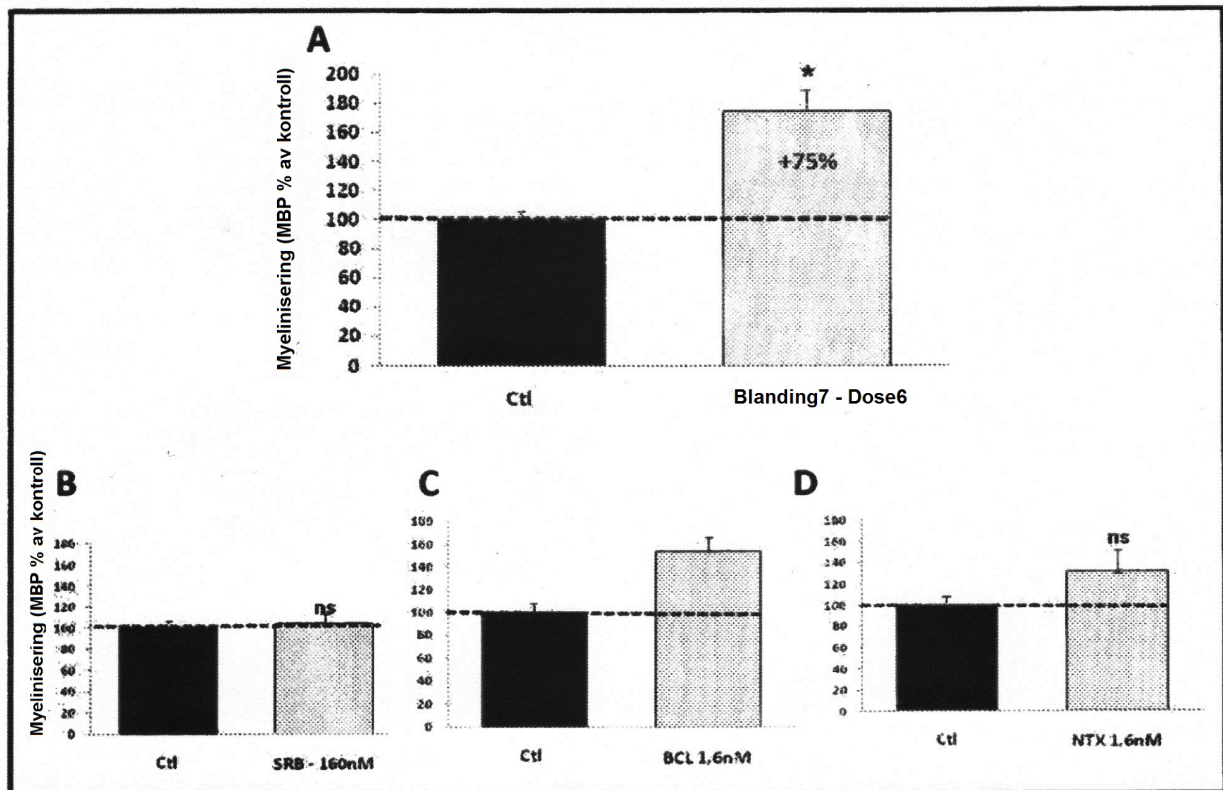
<400> 14
 ttgtgaaatt tccccttctc c 21

Patentkrav

- 1.** Preparat som omfatter baklofen, D-sorbitol og naltrekson, salter, enantiomerer eller racemater derav, for samtidig, separat eller sekvensiell administrering til et mammalsk individ.
- 2.** Preparat ifølge krav 1, som videre omfatter et farmasøytisk egnet hjelpestoff eller bærer.
- 3.** Preparat ifølge krav 1 eller 2, hvor nevnte forbindelser er formulert med et biomolekyl, en micelle eller liposom-dannende lipider eller olje-i-vann-emulsjoner, eller pegylerte eller faste nanopartikler eller mikropartikler for oral eller parenteral eller intratekal administrering.
- 4.** Preparat ifølge hvilke som helst av de foregående kravene, som er en flytende formulering egnet for oral administrering.
- 5.** Preparat ifølge hvilke som helst av de foregående kravene, for anvendelse ved behandling av Charcot-Marie-Tooth ("CMT") sykdom, en toksisk nevropati eller amyotrofisk lateralsklerose ("ALS") hos et mammalsk individ.
- 6.** Preparat ifølge krav 5, for anvendelse ved behandling av CMT1A hos et mammalsk individ.
- 7.** Preparat for anvendelse ifølge krav 5 eller 6, hvor det mammalske individet er et humant individ.
- 8.** Baklofen, D-sorbitol og naltrekson, salter, enantiomerer eller racemater derav, for samtidig, separat eller sekvensiell administrering for anvendelse ved behandling av CTM-sykdom, en toksisk nevropati eller ALS hos et mammalsk individ.

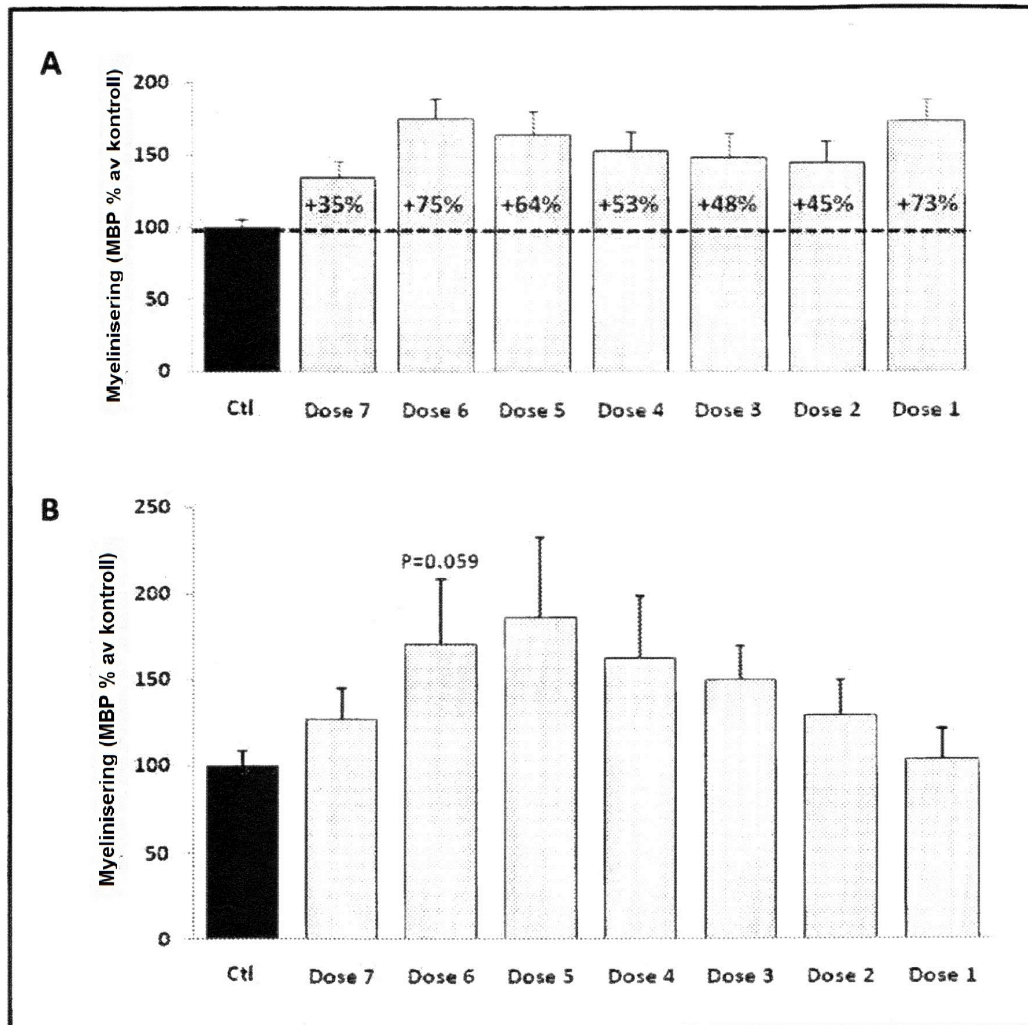
**Figur 1**

2/11

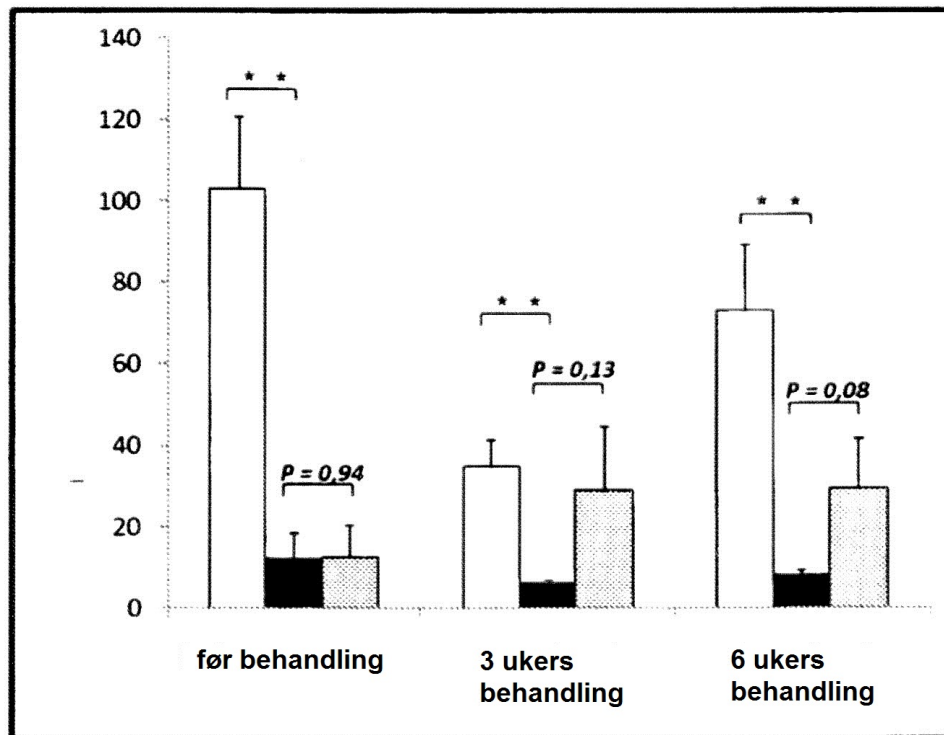


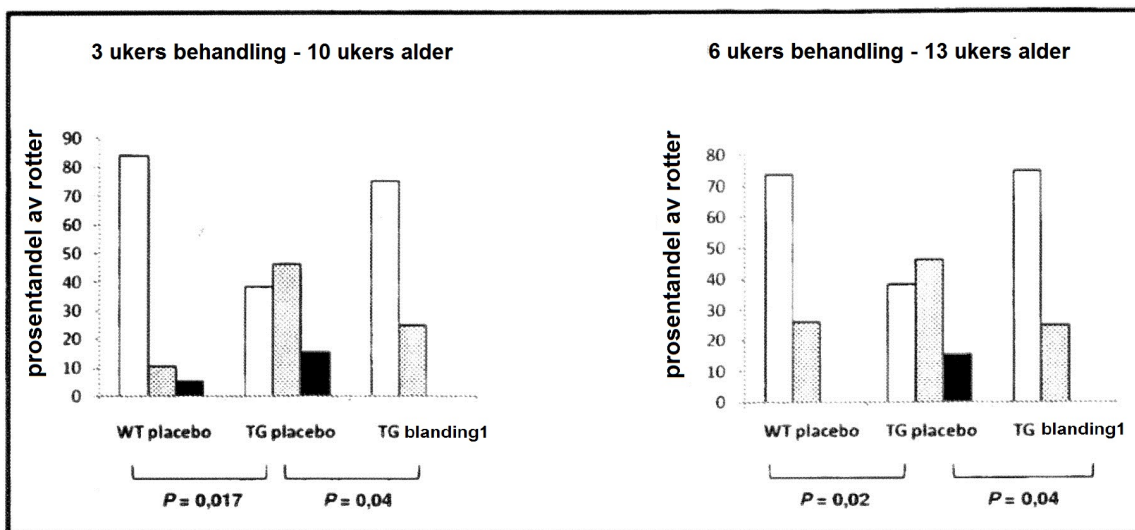
Figur 2

3/11

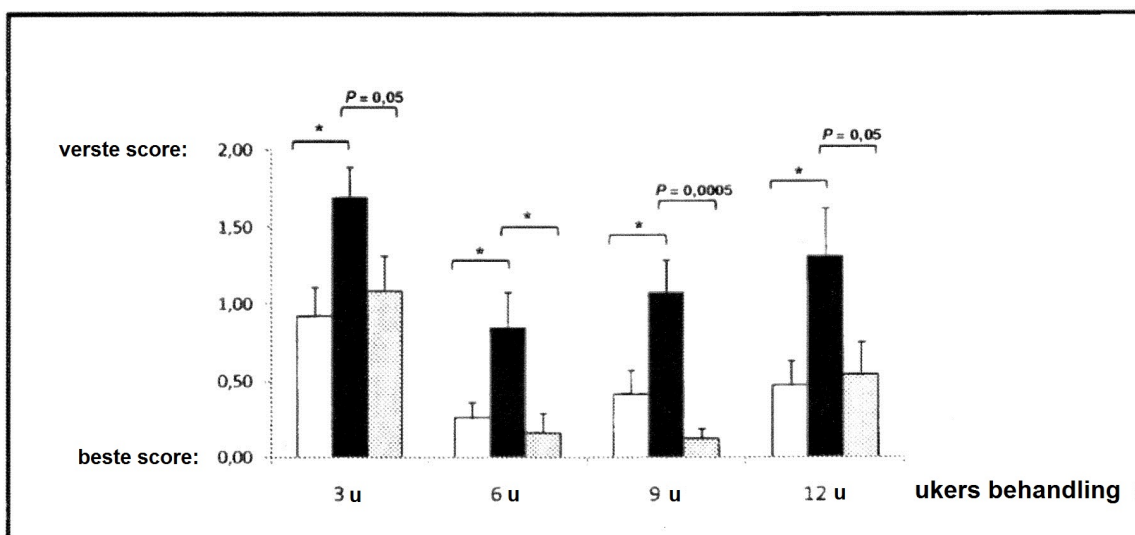


FIGUR 3

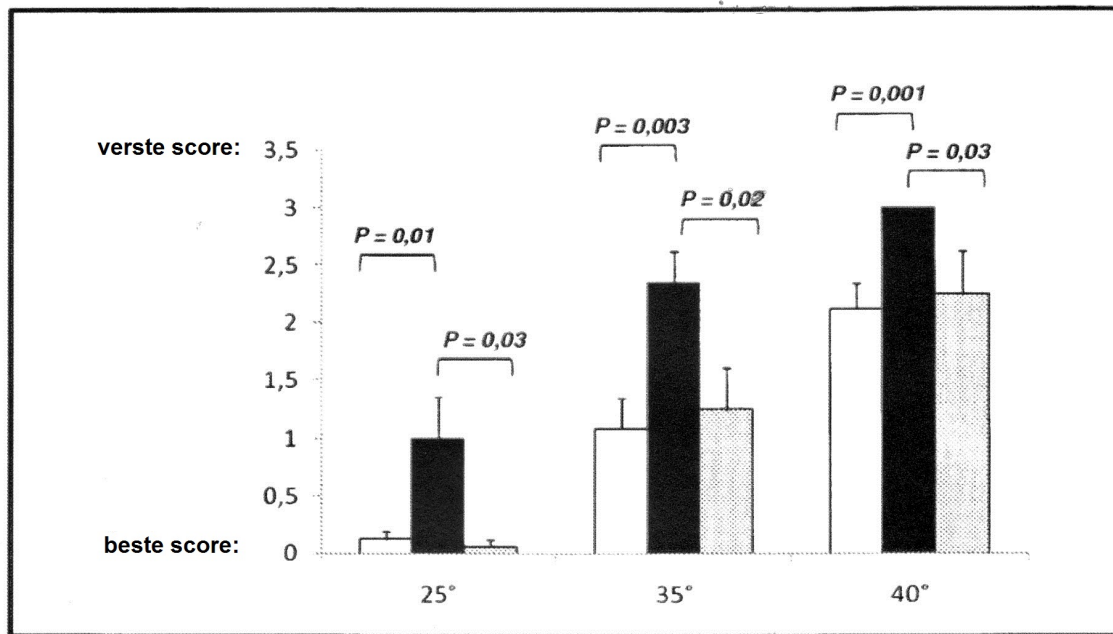
**Figur 4**



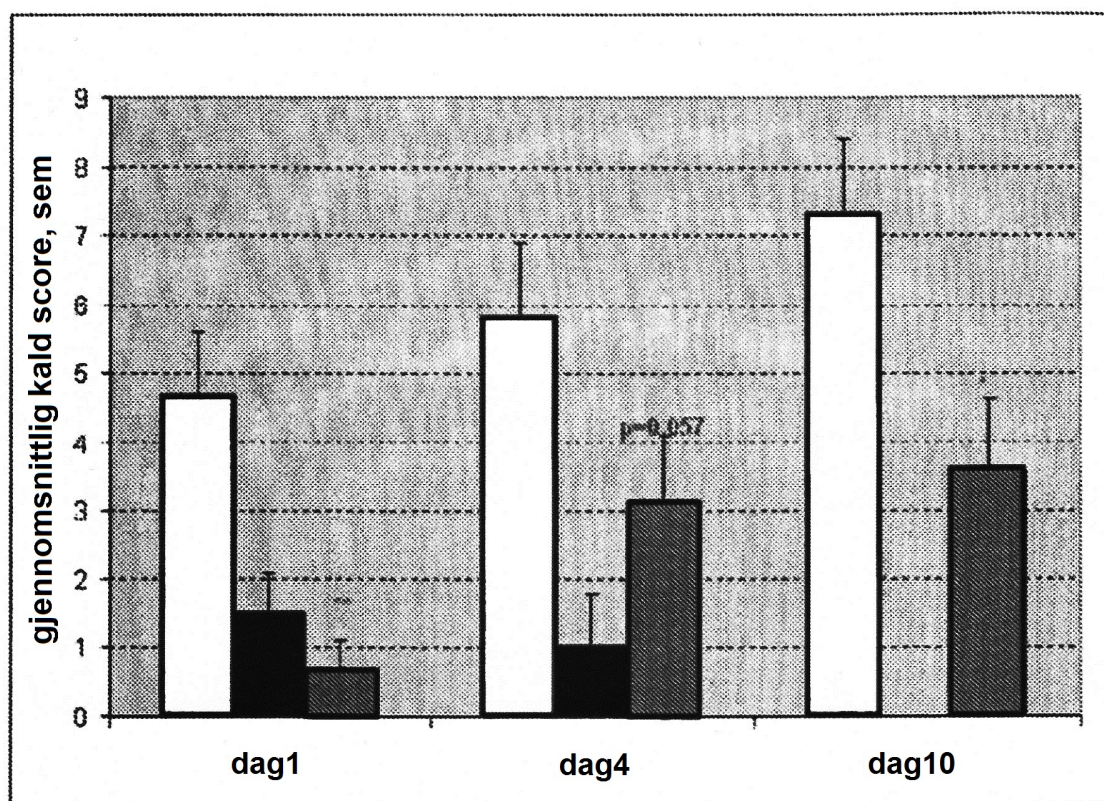
Figur 5



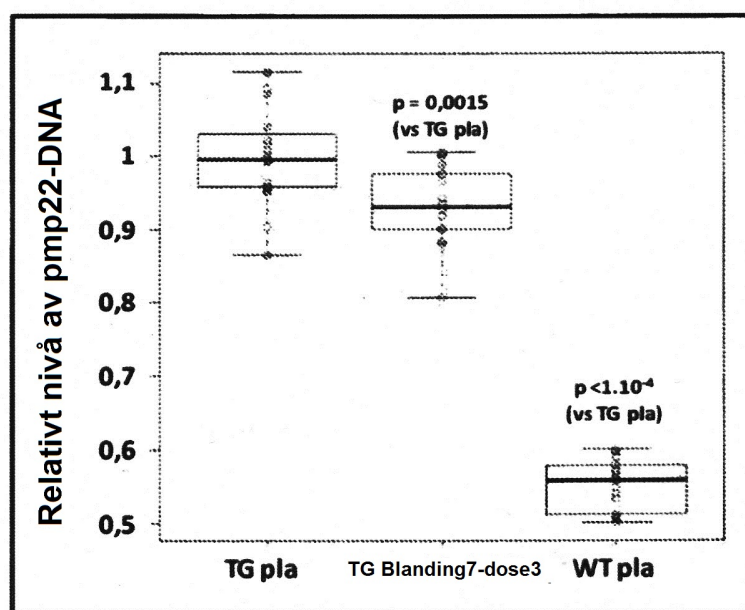
Figur 6



Figur 7



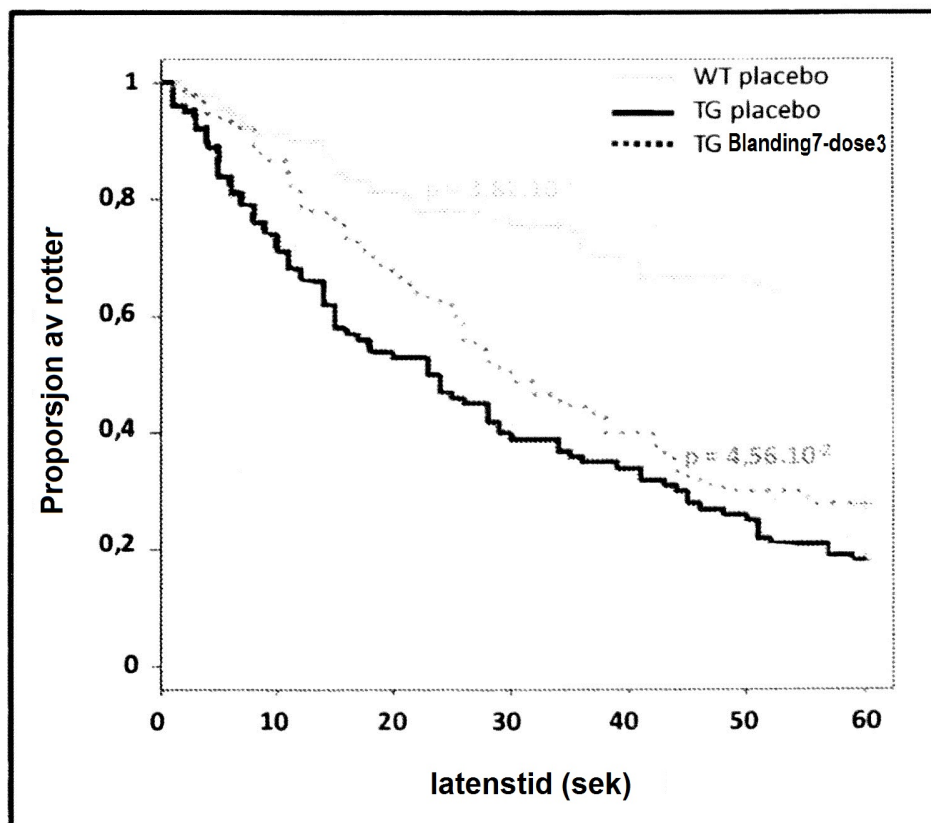
Figur 8



Figur 9

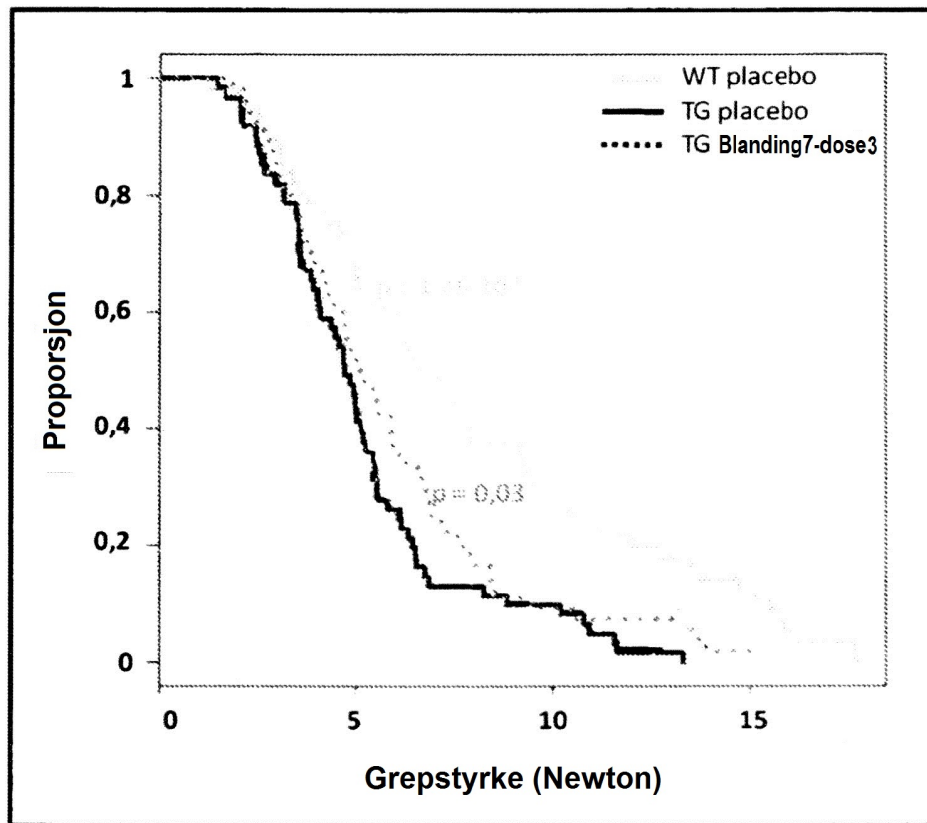
Grupper for ytelse i skråplan-test				<i>p-verdi (vs TG placebo)</i>
	Dårlig score	Middels score	God score	
WT placebo	11%	21%	68%	0,0003
TG placebo	60%	35%	5%	-
Blanding7-dose2	29%	41%	29%	0,0152
Blanding7-dose3	11%	56%	33%	0,0020

Figur 10

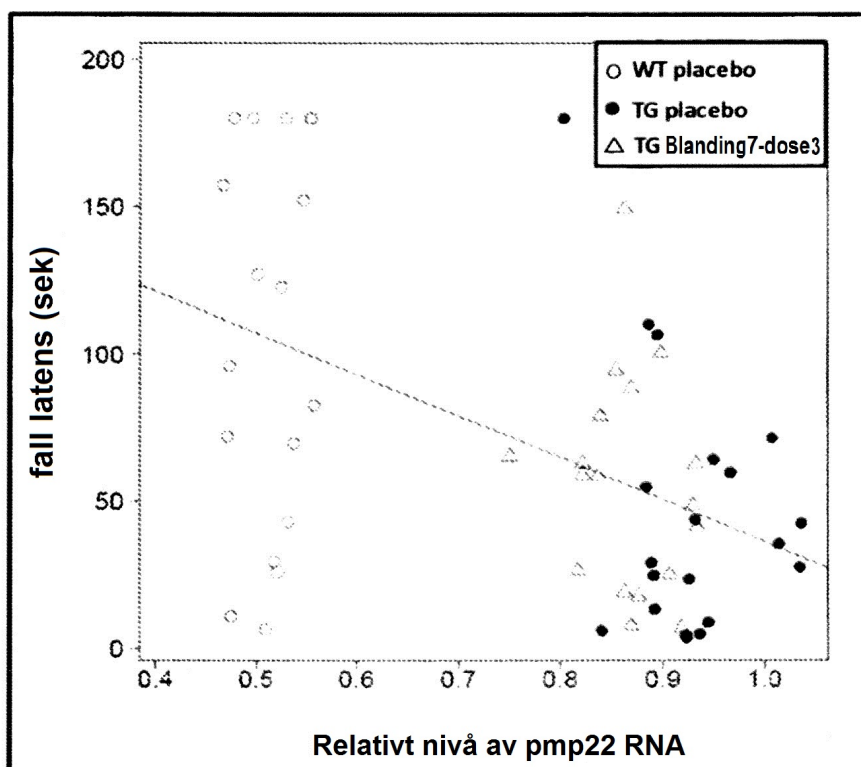


Figur 11

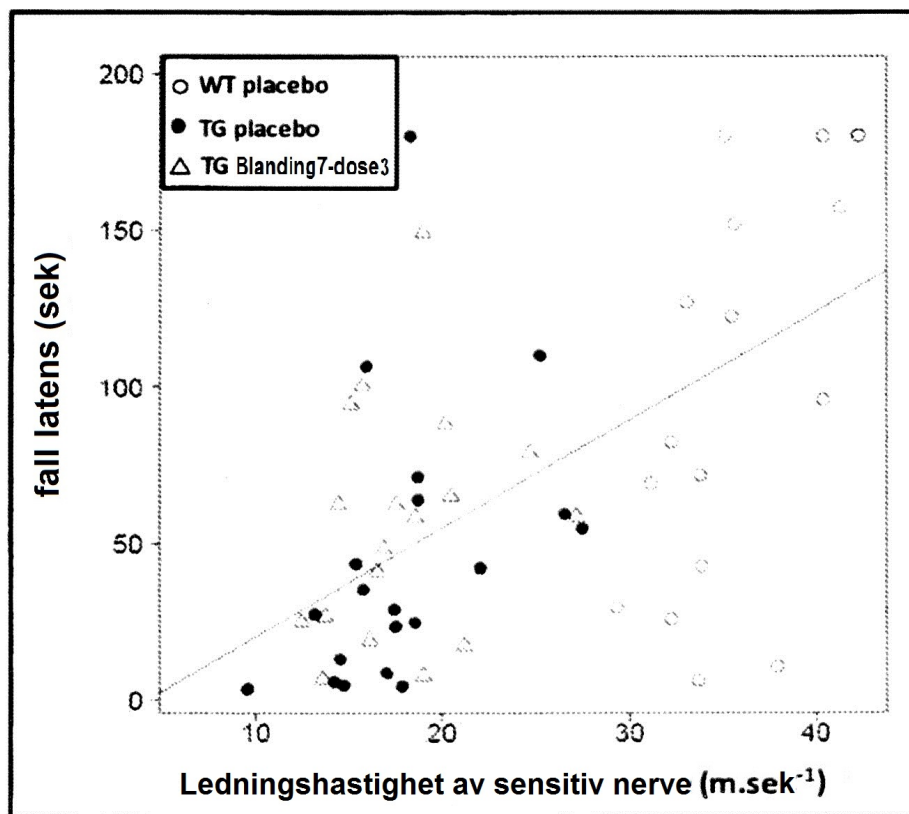
9/11



Figur 12

**Figur 13**

11/11



Figur 14