



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 110013

(13) C2

(51) МПК

A61K 31/197 (2006.01)

A61K 31/4178 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

A61K 31/047 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2011 15274	(72) Винахідник(и):	Коен Даніель (FR), Набірочкін Сергій (FR), Чумаков Ілія (FR)
(22) Дата подання заявки:	28.05.2010	(73) Власник(и):	ФАРНЕКСТ, Pépinière Sante Cochin, 29 rue Faubourg Saint Jacques, F-75014 Paris, France (FR)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.11.2015	(74) Представник:	Слободянюк Оксана Олександрівна, реєстр. №216
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	09305506.9	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	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 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 WO 2006/117573 A, 09.11.2006 WO 2004/006911 A, 22.01.2004
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	02.06.2009		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.04.2012, Бюл.№ 8		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.11.2015, Бюл.№ 21		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2010/057438, 28.05.2010		

## (54) ЗАСТОСУВАННЯ КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ШАРКО-МАРІ-ТУТА І ПОВ'ЯЗАНИХ З НЕЮ РОЗЛАДІВ

## (57) Реферат:

Винахід стосується композиції, яка містить як активні інгредієнти: (i) баклофен, (ii) D-сорбіт і (iii) сполуку, вибрану з пілокарпіну, метимазолу, міфепристону, налтрексону, рапаміцину, флурбіпрофену й кетопрофену, їх солей, енантіомерів або рацематів, і фармацевтично прийнятний наповнювач або носій, і її застосування для виробництва лікарського засобу для лікування хвороби Шарко-Марі-Тута та пов'язаних з нею розладів.

UA 110013 C2

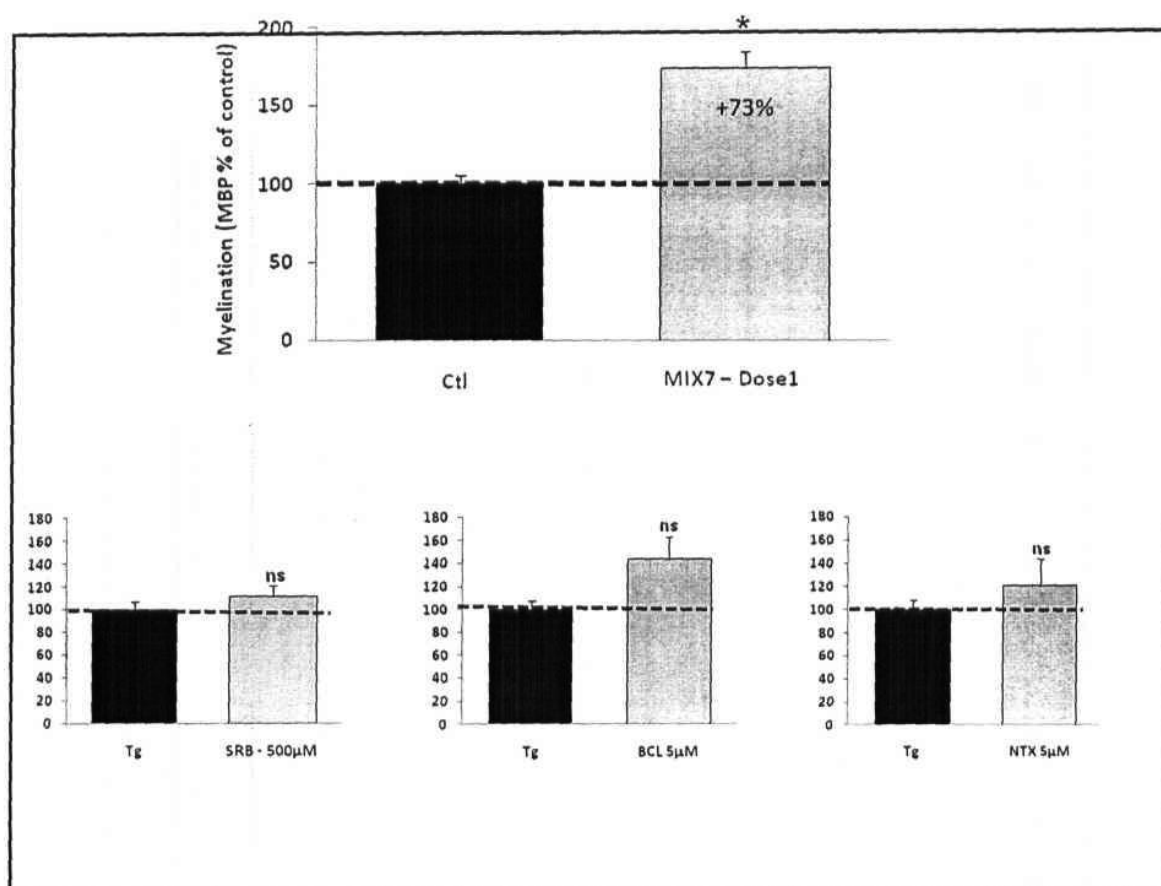


Fig. 1

Даний винахід відноситься до композицій і способів лікування хвороби Шарко-Марі-Тута та пов'язаних з нею розладів.

Хвороба Шарко-Марі-Тута ("ШМТ") є одиночною генетичною периферійною полінейропатією. Дане захворювання зустрічається приблизно у 1 із 2500 населення, і є найпоширенішим спадковим порушенням периферійної нервової системи. Її початок зазвичай проявляється у перші або другі десять років життя, хоча вона може бути виявленою й у немовлят. Хвороба розвивається хронічно з поступовою нервово-м'язовою дегенерацією. Хвороба призводить до інвалідності з випадками, які супроводжуються неврологічним болем і екстремальною м'язовою недієздатністю. ШМТ є однією з найбільш вивчених генетичних патологій із приблизно 30000 випадками у Франції. Хоча більшість пацієнтів із ШМТ мають дуплікацію фрагмента хромосоми 17, що містить ген мієліну: PMP22 (форма ШМТ 1A), два десятки генів залучені в різні форми ШМТ. Таким чином, хоча дана патологія є моногенною за походженням, вона проявляє клінічну гетерогенність завдяки можливим модуляторним генам. Гени, мутуючі у хворих ШМТ, є кластеризованими навколо тісно зв'язаних молекулярних шляхів, які впливають на процеси диференціювання шванівських клітин або нейронів або, які змінюють взаємодію даних клітин у периферійних нервах.

Аналіз загальнодоступних даних, які описують молекулярні механізми й патологічні прояви захворювання ШМТ 1A, дозволив виділити кілька пріоритетних функціональних клітинних модулів - регуляція транскрипції гена PMP22, білок PMP22 згортання / деградації, проліферація й апоптоз шванівських клітин, загибель нейронів, осадження й корекція екстра-клітинного матрикса, імунна відповідь - як потенційні законні цілі для ШМТ-відповідних терапевтичних втручань. Сукупний вплив цих розрегульованих функціональних модулів на виникнення й прогресування патологічних проявів Шарко-Марі-Тута виправдовує потенційну ефективність комбінаторного лікування ШМТ.

Міжнародна патентна заявка N° PCT/EP2008/066457 описує спосіб ідентифікації кандидатів у лікарські препарати для лікування хвороби Шарко-Марі-Тута шляхом створення динамічної моделі патології й виділення функціональних клітинних шляхів, які є актуальними в регулюванні захворювання ШМТ.

Міжнародна патентна заявка N° PCT/EP2008/066468 описує композиції для лікування хвороби Шарко-Марі-Тута, які містять, щонайменше, дві сполуки, обрані із групи багатьох кандидатів у лікарські препарати.

Сутність винаходу

Метою даного винаходу є створення нових терапевтичних комбінацій для лікування ШМТ і пов'язаних з нею розладів. Таким чином, винахід відноситься до композицій і способів лікування ШМТ і пов'язаних з нею розладів, зокрема, токсичної нейропатії й бічного аміотрофічного склерозу, застосовуючи специфічні комбінації лікарських препаратів.

Даний винахід більш конкретно відноситься до композиції, яка містить баклофен, сорбіт і сполуки, обрані з поміж пілокарпіну, метимазолу, міфепристону, налтрексона, рапаміцину, флурбіпрофену та кетопрофену, їхніх солей або пролікарських препаратів, для одночасного, роздільного або послідовного введення ссавцеві.

Переважно даний винахід відноситься до композиції, яка містить баклофен, сорбіт і налтрексон, для одночасного, роздільного або послідовного введення ссавцеві.

Даний винахід також відноситься до композиції, яка містить (а) рапаміцин, (б) міфепристон або налтрексон, і (с) модулятор PMP22, для одночасного, роздільного або послідовного введення ссавцеві.

У конкретному варіанті здійснення модулятор PMP22 вибирається з поміж ацетазоламиду, альбутеролу, амілориду, аміноглутетіміду, аміодарону, азтреонаму, баклофену, балсалазиду, бетаїну, бетанехолу, бікалутаміду, бромокриптину, буметаніду, буспірону, карбахолу, карбамазепіну, карбімазолу, цевімеліну, ципрофлоксацину, клонідину, куркуміну, циклоспорину, діазепаму, диклофенаку, динопростону, дисульфіраму, D-сорбіту, дутастериду, естрадіолу, екземестану, фелбамату, фенофібрату, фінастериду, флумазенілу, флунітразепаму, флурбіпрофену, флурореміду, габапентину, галантаміну, галоперидолу, ібупрофену, ізопротеренолу, кетоконазолу, кетопрофену, L-карнітину, ліотироніну (T3), літію, лозартану, локсапіну, мелоксикаму, метапротеренолу, метарамінолу, метформіну, метахоліну, метимазолу, метилергоновіну, метопрололу, метирапону, міконазолу, міфепристон, надололу, налоксону, налтрексона; норфлоксацину, пентазоцину, феноксибензаміну, фенілбутирату, пілокарпіну, піоглітазону, празозину, пропілтіоурацилу, ралоксифену, рапаміцину, рифампіцину, сімвастатину, спіронолактону, такролімусу, тамоксифену, трегалози, трилостану, вальпроевої кислоти, їх солей або пролікарських препаратів.

Даний винахід також відноситься до композиції, яка містить рапаміцин і міфепристон, для

одночасного, роздільного або послідовного введення ссавцеві.

Додатково даний винахід відноситься до композиції, як зазначено вище, яка додатково містить один або декілька фармацевтично прийнятних наповнювачів або носіїв (тобто фармацевтична композиція).

5 Даний винахід також відноситься до композиції, як зазначено вище, для лікування ШМТ або пов'язаного з нею розладу.

Додатково даний винахід відноситься до застосування комбінації сполук, як зазначено вище, для виготовлення лікарського засобу для лікування ШМТ або пов'язаного з нею розладу.

10 Додатково даний винахід відноситься до способу лікування ШМТ або пов'язаного з нею розладу, який включає введення суб'єктові, який потребує такого лікування, ефективної кількості вказаної вище композиції.

Додатково даний винахід відноситься до способу приготування фармацевтичної композиції, який передбачає змішування згаданих вище сполук у відповідному наповнювачі або носіїві.

15 Даний винахід також відноситься до способу лікування ШМТ 1А у суб'єкта, який включає введення суб'єктові, який потребує такого лікування, ефективної кількості вказаної вище сполуки або комбінації сполук.

Додатково даний винахід відноситься до способу лікування токсичної нейропатії в суб'єкта, який включає введення суб'єктові, який потребує такого лікування, ефективної кількості вказаної вище сполуки або комбінації сполук.

20 Додатково даний винахід відноситься до способу лікування ALS у суб'єкта, який включає введення суб'єктові, який потребує такого лікування, ефективної кількості вказаної вище сполуки або комбінації сполук.

25 Кожне з різних застосувань або способів лікування, розкритих в описі, також може включати необов'язковий етап діагностики пацієнта, який має ШМТ або пов'язаний з нею розлад, зокрема, ШМТ 1А, або виявлення людини з ризиком розвитку ШМТ або пов'язаного з нею розладу, зокрема, ШМТ 1А.

30 У зв'язку із цим додатково даний винахід відноситься до способу лікування ШМТ, особливо ШМТ 1А, який передбачає (1) оцінку того, чи має суб'єкт ШМТ, зокрема, ШМТ 1А і (2) лікування суб'єкта, який має ШМТ, зокрема, ШМТ 1А ефективною кількістю комбінації сполук, як описано вище. Визначення того, чи має суб'єкт ШМТ, зокрема, ШМТ 1А, можна зробити за допомогою різних тестів, відомих у даній галузі, таких як аналізи ДНК.

Винахід може використовуватися для лікування ШМТ або пов'язаного з нею розладу в будь-якого ссавця, особливо, у людини, бажано, ШМТ 1А.

Перелік фігур

35 Фігура 1. Синергетичний ефект комбінації лікарських препаратів, доза 1: ефект А) суміш 7 (доза 1, день 10), В) D-сорбіт (SRB, 500 мкМ, день 10), С) (R / S)-баклофен (BCL, 5 мкМ, день 10) і D) налтрексон (NTX, 5 мкМ, день 10) на експресію MBP. \*:  $p < 0,05$ : суттєво відрізняється від контролю (=аскорбінова кислота) (однофакторний дисперсійний аналіз із наступним апостеріорним тестом Фішера); ns: статистично не розрізняється.

40 Фігура 2. Синергетичний ефект комбінації лікарських препаратів, доза 6 А) суміш 1 (доза 6, 10-й день), В) SRB (160 нМ, день 10), С) BCL (1,6 нМ, день 10) і D) NTX (1,6 нМ, день 10) на експресію MBP. \*:  $p < 0,05$ : суттєво відрізняється від контролю (= аскорбінова кислота) (однофакторний дисперсійний аналіз із наступним апостеріорним тестом Фішера); ns: статистично не розрізняється.

45 Фігура 3. Позитивний ефект суміш 7 (7 доз) А) на 10 день і В) на 11-й день у спільній інкубації з аскорбіновою кислотою в спільних культурах PMP22 TG на експресію MBP у відсотках від контролю (= аскорбінова кислота). Однофакторний дисперсійний аналіз із наступним апостеріорним тестом Фішера.

50 Фігура 4. Позитивний ефект на пацюках-самцях трьох і шести тижнів лікування за допомогою суміші 1, визначений із застосуванням тесту із палкою. Затримки вимірювали як середнє двох перших аналізів випробувань (білі стовпчики представляють контрольних пацюків, які одержували плацебо, чорні стовпчики представляють трансгенних пацюків, які одержували плацебо; сірі стовпчики представляють трансгенних пацюків, які одержували суміш 1. \*\*  $p < 0,01$ . Статистика реалізується із двостороннім тестом Стюдента).

55 Фігура 5. Позитивний ефект на ходу пацюків-самців трьох і шести тижнів (відповідно, лівий і правий графік лікування композицією суміші 1 (білі стовпчики представляють вільну ходу; сірі стовпчики представляють ускладнену ходу; чорні стовпчики представляють пацюків із серйозним проблемами ходи. Статистика реалізується із двостороннім тестом Стюдента).

60 Фігура 6. Позитивний ефект на пацюках-самцях композиції суміші 1 у пацюків із застосуванням тесту похилої площини (25°). Пацюків перевіряли через 3, 6, 9 і 12 тижнів

лікування (білі стовпчики представляють контрольних пацієнтів, які одержували плацебо, чорні стовпчики представляють трансгенних пацієнтів, які одержували плацебо; сірі стовпчики представляють трансгенних пацієнтів, які одержували суміш 1. \*  $p < 0,05$ . Статистика реалізується із двостороннім тестом Стюдента).

5 Фігура 7. Позитивний ефект на самках пацієнтів 3-х тижнів лікування композицією суміш 2 у пацієнтів із застосуванням тесту похилої площини (білі стовпчики представляють контрольних пацієнтів, які одержували плацебо, чорні стовпчики представляють трансгенних пацієнтів, які одержували плацебо; сірі стовпчики представляють трансгенних пацієнтів, які одержували суміш 2. \*\*  $p < 0,01$ . Статистика реалізується із двостороннім тестом Стюдента).

10 Фігура 8. Захисний ефект суміші 1 на оксаліплатин-індуковану невропатію на пацюках-самцях (білі стовпчики представляють пацієнтів дикого типу, які одержували плацебо, чорні стовпчики представляють пацієнтів дикого типу, які одержували порівнюваний продукт габапентин; сірі стовпчики представляють пацієнтів дикого типу, які одержували суміш 1. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Статистика реалізується із двостороннім тестом Стюдента).

15 Фігура 9. Значне зниження експресії *mp22* РНК у оброблених трансгенних тварин, у порівнянні із трансгенними пацюками *MP22*, яке спостерігається після 9 тижнів лікування сумішшю 7-дозою 3 (*MP22* як ген для порівняння, Середа та ін., 1996) ( $p = 0,0015$ ). Трансгенна інтеграція й гіперекспресія гена *mp22* також були підтверджені; *mp22* РНК у трансгенних пацієнтів *MP22* була в 1,8 рази гіперекспресована, у порівнянні з контролем пацієнтів з одного приплоду дикого типу ( $p < 1.10^{-4}$ ). Екстракцію *mp22* РНК проводили із сідничних нервів 16-тижневих пацієнтів-самців ( $n = 18$  для дикого типу,  $n = 20$  для трансгенних пацієнтів і  $n = 18$  для *TG*, які одержували суміш 7-дозу 3). Статистичний аналіз був виконаний за допомогою *t*-тесту Уелча.

25 Фігура 10. Аналіз кластеризації проводили оцінкою тесту похилої площини при  $35^\circ$  (для поширення в класах з поганими, середніми й гарними результатами у всіх точках часу оцінки 3, 6 і 9 тижнів лікування, проаналізовані разом). Істотну відмінність спостерігали між *WT* і *TG* плацебо: 68 % *WT* належало до групи з гарними результатами й тільки 5 % із плацебо належало до цієї групи ( $p = 0,0003$ ). Суміш 7 доза 2 і доза 3 поліпшували результати *TG* пацієнтів. Статистичний аналіз виконували із застосуванням тренд-тесту на 5 %-вому рівні значимості ( $n = 18$  для пацієнтів *WT* плацебо,  $n = 20$  для пацієнтів *TG* плацебо,  $n = 17$  для *TG*, що одержували суміш 7-дозу 2,  $n = 18$  для *TG*, що одержували суміш 7-дозу 3).

30 Фігура 11. Затримки падіння *TG* пацієнтів у тесті з поперечною після 9 тижнів лікування сумішшю 7-дозою 3 аналізували за допомогою моделі Коксу із сендвіч-оцінкою дисперсії, і порівнюючи з порівняльним *Tg*-плацебо, застосовуючи журнальний ранг-тест на 5 %-вому рівні значимості. Суміш 7-доза 3 значно збільшувала затримку падіння пацієнтів *TG* після 9 тижнів лікування.

40 Фігура 12. Сила хватки груп дикого типу, трансгенних плацебо й трансгенних тварин, які одержували суміш 7-дозу 3 щодня протягом 9 тижнів, моделювали за допомогою моделі Коксу із сендвіч-оцінкою дисперсії у всі моменти часу після лікування (3, 6 і 9 тижнів), і порівнювали з еталонним *TG* плацебо, застосовуючи журнальний ранг-тест на 5 %-вому рівні значимості. Відповідні *p*-значення були представлені на кривих Каплана-Мейера. Спостерігалось значне зменшення сили хватки передніх лап трансгенних пацієнтів плацебо (чорний проста лінія,  $n = 21$ ), у порівнянні з пацюками *WT* (сіра проста лінія,  $p = 1.45.10^{-5}$ ,  $n = 19$ ). Лікування сумішшю 7-дозою 3 значно збільшувало силу передніх лап (чорна пунктирна лінія,  $p = 0,03$ ,  $n = 18$ ).

45 Фігура 13. Тест кореляції Пірсона показав значну кореляцію між часом затримки падіння в тесті з поперечною (після 9 тижнів лікування) і рівнем експресії *mp22* РНК:  $p = 1,6.10^{-4}$  (*WT*, *Tg*-плацебо й *TG*, які одержували суміш 7-дозу 3, проаналізовані разом),  $p = 0,07$  (*Tg*-плацебо й *TG*, які одержували суміш 7-дозу 3, проаналізовані разом).

Чим нижчою була експресія *mp22* РНК, тем кращими були результати тесту із перешкодою.

50 Самці були 16 тижневими ( $n = 18$  для *Wt*-пацієнтів, білі кружки;  $n = 20$  для *Tg*-плацебо, чорні кружки й  $n = 18$  для *TG*, які одержували суміш 7-дозу 3, білі трикутники).

55 Фігура 14. Тест кореляції Пірсона показав значну кореляцію між часом затримки падіння в тесті з поперечною (після 9 тижнів лікування) і швидкістю проведення чутливого нерва (НТС):  $p = 1,34.10^{-6}$  (*WT*, *TG* і *Tg*-плацебо, які одержували суміш 7-дозу 3, проаналізовані разом) і  $p = 0,04$  (*Tg*-плацебо й *TG*, які одержували суміш 7-дозу 3, проаналізовані разом). Чим вищою була швидкість проведення, тем кращими були результати тесту із перешкодою. Самці були 16 тижневими ( $n = 18$  для *Wt*-пацієнтів, білі кружки;  $n = 20$  для *Tg*-плацебо, чорні кружки й  $n = 18$  для *TG*, які одержували суміш 7-дозу 3, білі трикутники).

Докладний опис винаходу

60 Даний винахід відноситься до нових терапевтичних підходів для лікування ШМТ або

пов'язаних з нею розладів. Винахід розкриває нові комбінації лікарських препаратів, які дозволяють ефективну корекцію таких захворювань, і можуть бути застосованими для будь-якого ссавця.

У контексті цього винаходу, ШМТ включає ШМТ 1А, ШМТ 1В, ШМТ 1С, ШМТ 1D, ШМТ 1Х, ШМТ 2А, ШМТ 2В, ШМТ 2D, ШМТ 2Е, ШМТ 2-Р0, ШМТ 4А, ШМТ 4В1, ШМТ 4В2, ШМТ 4D, ШМТ 4F, ШМТ 4, або АR-ШМТ 2А, більш бажано, ШМТ 1А.

У контексті даного винаходу термін "ШМТ-пов'язаний розлад" позначає інші захворювання, пов'язані з аномальною експресією РМР22, що призводить до ненормальної мієлінізації й втрати нейронів. Термін "ШМТ-пов'язаний розлад", зокрема, включає хворобу Альцгеймера (AD), старече слабоумство типу хвороби Альцгеймера (SDAT), хворобу Паркінсона, деменцію тіла Льюїса, судинну деменцію, аутизм, легке когнітивне порушення (MCI), пов'язане з віком погіршення пам'яті (AAMI), а також проблему, пов'язану зі старінням, постенцефалітний паркінсонізм, шизофренію, депресію, біполярне захворювання й інші розлади настрою, хворобу Хантингтона, захворювання рухових нейронів, включаючи латеральний аміотрофічний склероз (ALS), розсіяний склероз, ідіопатичну невропатію, діабетичну невропатію, токсичну невропатію, у тому числі, невропатію, індуковану медикаментозним лікуванням, невропатію, спровоковану ВІЛ-інфекцією, радіацією, важкими металами й авітамінозними станами, спричинену пріонами нейродегенерацію, у тому числі, хворобу Крейтцфельда-Якоба (ХКЯ), губчасту енцефалопатію великої рогатої худоби (BSE), GSS, FFI, синдроми Куру й Альпера.

У кращому варіанті здійснення "ШМТ-пов'язаний розлад" позначає токсичну невропатію, особливо, медикаментозну невропатію або ALS.

Термін "лікування" розладу, як він тут використовується, включає лікування, попередження, профілактику, пригнічення або зменшення спровокованого розладом болю. Строк лікування передбачає, зокрема, контроль над прогресуванням хвороби й супутніх симптомів.

Крім того, термін "сполука" позначає хімічні сполуки, спеціально зазначені в додатку, а також будь-яку фармацевтичну композицію з їх прийнятною сіллю, гідратом, складним ефіром, простим ефіром, ізомерами, рацематом, кон'югатами, проліками. Сполуки, перераховані в цій заявці, можна також ідентифікувати з відповідним номером КАС.

Таким чином, кращими сполуками, які можуть бути застосованими у винаході, є баклофен (CAS 1134-47-0) і його можливі солі, енантіомери, рацемати, проліки й похідні; сорбіт (CAS 50-70-4) і його можливі солі, енантіомери, рацемати, проліки й похідні; налтрексон (CAS 16590-41-3) і його можливі солі, енантіомери, рацемати, проліки й похідні; міфепристон (CAS 84371-65-3) і його можливі солі, енантіомери, рацемати, проліки й похідні; пілокарпін (CAS 54-71-7) і його можливі солі, енантіомери, рацемати, проліки й похідні; метимазол (CAS 60-56-0) і його можливі солі, енантіомери, рацемати, проліки й похідні; кетопрофен (CAS 22071-15-4) і його можливі солі, енантіомери, рацемати, проліки й похідні; флурбіпрофен (5104-49-4) і його можливі солі, енантіомери, рацемати, проліки й похідні; і рапаміцин (CAS 53123-88-9) і його можливі солі, енантіомери, рацемати, проліки й похідні.

Додатковими сполуками, застосованими у винаході, є ацетазоламід (CAS 59-66-5) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; альбутерол (CAS 18559-94-9) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; амілорид (CAS 2016-88-8) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; аміноглютетимід (CAS 125-84-8) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; амідарон (CAS 1951-25-3) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; азтреонам (CAS 78110-38-0) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; баклофен (CAS 1134-47-0) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; балсалазид (CAS 80573-04-2) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; бетаїн (CAS 107-43-7) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; бетанехол (CAS 674-38-4) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; бікалутамід (CAS 90357-06-5) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; бромокриптин (CAS 25614-03-3) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; буметанід (CAS 28395-03-1) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; буспірон (CAS 36505-84-7) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; карбахол (CAS 51-83-2) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; карбамазепін (CAS 298-46-4) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; цевімелін (CAS 107233-08-9) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; ципрофлоксацин (CAS 85721-33-1) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; клонідин (CAS 4205-90-7) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; куркумін (CAS 458-37-7) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; циклоспорин (CAS 59865-13-3) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; діазепам (CAS 439-14-5) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; диклофенак (CAS 15307-86-5) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; динопростон (CAS 363-24-6) і його можливі солі, енантіомери, проліки й

похідні; дисульфірам (CAS 97-77-8) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; D-сорбіт (CAS 50-70-4) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; дутастерид (CAS 164656-23-9) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; естрадіол (CAS 50-28-2) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; екземестан (CAS 107868-30-4) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; фелбамат (CAS 25451-15-4) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; фенофібрат (CAS 49562-28-9) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; фінастерид (CAS 98319-26-7) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; флумазеніл (CAS 78755-81-4) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; флунітразепам (CAS 1622-62-4) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; флурбіпрофен (CAS 5104-49-4) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; фурсемід (CAS 54-31-9) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; габапентин (CAS 60142-96-3) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; галантамін (CAS 357-70-0) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; галоперідол (CAS 52-86-8) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; ібупрофен (CAS 15687-27-1) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; ізопротеренол (CAS 7683-59-2) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; кетоназол (CAS 65277-42-1) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; кетопрофен (CAS 22071-15-4) і його можливі солі, енантіомери, рацемати, проліки й похідні; L-карнітин (CAS 541-15-1) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; ліотиронін (T3) (CAS 6893-02-3) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; літій (CAS 7439-93-2) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; лозартан (CAS 114798-26-4) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; локсапін (CAS 1977-10-2) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; мелоксикам (CAS 71125-38-7) і його можливі солі, енантіомери, рацемати, проліки й похідні; метапротеренол (CAS 586-06-1) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; метарамінол (CAS 54-49-9) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; метформін (CAS 657-24-9) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; метахолін (CAS 55-92-5) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; метимазол (CAS 60-56-0) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; метилергоновін (CAS 113-42-8) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; метопролол (CAS 37350-58-6) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; метирапон (CAS 54-36-4) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; міконазол (CAS 22916-47-8) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; міфепристон (CAS 84371-65-3) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; надолол (CAS 42200-33-9) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; налоксон (CAS 465-65-6) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; налтрексон (CAS 16590-41-3) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; норфлоксацин (CAS 70458-96-7) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; пентазоцин (CAS 359-83-1) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; феноксибензамін (CAS 59-96-1) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; фенілбутират (CAS 1821-12-1) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; пілокарпін (CAS 54-71-7) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; піоглітазон (CAS 111025-46-8) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; празозин (CAS 19216-56-9) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; пропілтіоурацил (CAS 51-52-5) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; ралоксифен (CAS 84449-90-1) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; рапаміцин (CAS 53123-88-9) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; рифампіцин (CAS 13292-46-1) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; сімвастатин (CAS 79902-63-9) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; спіронолактон (CAS 52-01-7) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; такролімус (CAS 104987-11-3) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; тамоксифен (CAS 10540-29-1) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; трегалоза (CAS 99-20-7) і її можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; трилостан (CAS 13647-35-3) і його можливі солі, енантіомери, проліки й похідні; вальпроєва кислота (CAS 99-66-1) і її можливі солі, енантіомери, рацемати, проліки й похідні.

Термін "комбінація" позначає лікування, при якому кілька лікарських препаратів одночасно вводять суб'єктові для досягнення біологічного ефекту. У комбінованій терапії лікарські препарати можна вводити разом або окремо, у той же самий час або послідовно. Крім того, лікарські препарати можна вводити за допомогою різних шляхів і протоколів.

Винахід тепер розкриває ідентифікацію й активності особливих комбінацій лікарських препаратів, які відносяться до ефективного лікування ШМТ. Більш конкретно, винахід розкриває нові потрібні комбінації, які виявляють значний ефект у лабораторних та у природних умовах на ШМТ або пов'язані з нею розлади.

У зв'язку із цим, даний винахід відноситься до композиції, яка містить баклофен, сорбіт і сполуку, обрану з поміж пілокарпіну, метимазолу, міфепристону, налтрексону, рапаміцину, флурбіпрофену й кетопрофену, їхніх солей, енантіомерів, рацематів, або проліків.

Більш бажано, винахід відноситься до композиції, яка містить баклофен, сорбіт і сполуку, обрану з поміж пілокарпіну, метимазолу, міфепристону, налтрексона й кетопрофену.

У найкращому варіанті здійснення даний винахід відноситься до композиції, яка містить налтрексон, баклофен і сорбіт, для одночасного, роздільного або послідовного введення ссавцеві.

Бажано, у наведених вище композиціях, сорбіт є D-сорбітом і баклофен є RS-баклофеном або S-баклофеном, краще, RS-баклофеном.

Винахід також відноситься до композиції, яка містить:

(а) рапаміцин,

(б) міфепристон або налтрексон і

(с) модулятор RMP22,

для одночасного, роздільного або послідовного введення ссавцеві.

Даний винахід також відноситься до композиції, яка містить:

(а) рапаміцин,

(б) міфепристон і

(с) модулятор RMP22,

для одночасного, роздільного або послідовного введення ссавцеві.

Модулятором RMP22 може бути будь-яка сполука, яка модулює шлях RMP22 у клітині й суттєво впливає або сприяє нормалізації мієлінової організації та/або інгібуванню втрати нейронів. Модулятор RMP22 можна вибирати з поміж ацетазоламід, альбутеролу, амілориду, аміноглютетиміду, амідарону, азтреонаму, баклофену, балсалазиду, бетаїну, бетанехолу, бікалутаміду, бромокриптину, буметаніду, буспірону, карбахолу, карбамазепіну, карбімазолу, цевімеліну, ципрофлоксацину, клонідину, куркуміну, циклоспорину, діазепаму, диклофенаку, динопростону, дисульфіраму, D-сорбіту, дутастериду, естрадіолу, екземестану, фелбамату, фенотібу, фінастериду, флумазенилу, флунітразепаму, флурбіпрофену, фурсеміду, габапентину, галантаміну, галоперідолу, ібупрофену, ізопротеренолу, кетоконазолу, кетопрофену, L-карнітину, ліотироніну (Т3), літію, лозартану, локсапіну, мелоксикаму, метапротеренолу, метарамінолу, метформіну, метахоліну, метимазолу, метилергоновіну, метопрололу, метирапону, міконазолу, міфепристону, надололу, налоксону, налтрексона; норфлоксацину, пентазоцину, феноксифену, фенілбутирату, пілокарпіну, піоглітазону, празозину, пропілтіоурацилу, ралоксифену, рапаміцину, рифампіцину, симвастатину, спіронолактону, такролімусу, тамоксифену, трегалози, трилостану, солі вальпроєвої кислоти або їх проліків.

У кращому варіанті здійснення сполука (с) вибирається з поміж пілокарпіну, метимазолу й баклофену. У цьому зв'язку найкраща композиція даного винаходу містить:

(а) рапаміцин,

(б) міфепристон і

(с) сполуку, обрану з поміж пілокарпіну, метимазолу і баклофену,

для одночасного, роздільного або послідовного введення ссавцеві.

Конкретні приклади таких композицій включають композиції, які містять:

- Рапаміцин; міфепристон і пілокарпін;

- Рапаміцин; міфепристон і баклофен;

- Рапаміцин; міфепристон і метимазол; або

- Рапаміцин; налтрексон і метимазол.

Експериментальний розділ показує, що дані особливі комбінації лікарських препаратів здатні ефективно коректувати експресію RMP22 у лабораторних умовах, відновлювати нормальну мієлінізацію й цілісність нейронів, і, таким чином, поліпшувати перебіг ШМТ у тварин у природних умовах. Результати також показують, що дані комбінації можуть захистити тварин від нейропатії. У результаті, дані композиції можна застосовувати для запобігання або зменшення викликані хіміотерапією нейропатії, тим самим дозволяючи пацієнтам одержувати хіміотерапію протягом більш тривалого часу.

Іншим завданням даного винаходу є композиція, яка містить налтрексон, баклофен і додатковий окремий інгібітор RMP22, як визначено вище.

Даний винахід також відноситься до композиції, як зазначено вище, що додатково містить один або декілька фармацевтично прийнятних наповнювачів або носіїв (тобто фармацевтична композиція).

Даний винахід також відноситься до композиції, як зазначено вище, для лікування ШМТ або пов'язаного з нею розладу.

Даний винахід також відноситься до застосування комбінації сполук, як зазначено вище, для виготовлення лікарського засобу для лікування ШМТ або пов'язаного з нею розладу.



Даний винахід також розкриває спосіб лікування ШМТ або пов'язаного з нею розладу, причому спосіб передбачає введення суб'єктові, який потребує такого лікування, ефективної кількості сполуки або комбінації описаних вище сполук.

5 Даний винахід також розкриває спосіб приготування фармацевтичної композиції, причому спосіб передбачає змішування вищезгаданих сполук у відповідному наповнювачі або носії.

Більш конкретно даний винахід розкриває спосіб лікування ШМТ 1А у суб'єкта, причому спосіб передбачає введення суб'єктові, який потребує такого лікування, ефективної кількості вказаної вище сполуки або комбінації сполук.

10 Додатковим конкретним завданням даного винаходу є спосіб лікування токсичної нейропатії у суб'єкта, причому спосіб передбачає введення суб'єктові, який потребує такого лікування, ефективної кількості вказаної вище сполуки або комбінації сполук.

Додатково даний винахід розкриває спосіб лікування ALS у суб'єкта, причому спосіб передбачає введення суб'єктові, який потребує такого лікування, ефективної кількості вказаної вище сполуки або комбінації сполук.

15 Терапія відповідно до винаходу може виконуватися як комбінація лікарських препаратів і/або в комбінації з будь-якою іншою терапією. Вона може надаватися вдома, в офісі лікаря, у клініці, в амбулаторному відділенні лікарні або в лікарні, так, що лікар може безпосередньо спостерігати за терапевтичними ефектами й вносити будь-які необхідні зміни.

20 Тривалість лікування залежить від стадії захворювання, яке підлягає лікуванню, віку й стану пацієнта й від того, як пацієнт реагує на лікування.

Крім того, особа, яка має більш високий ризик розвитку додаткового нейропатичного розладу (наприклад, людина, яка є генетично схильною, або яка страждає, наприклад, на діабет або яка проходить онкологічне лікування тощо), може одержувати профілактичне лікування, щоб полегшити або затримати можливу нейропатичну відповідь.

25 Дозуванням, частотою й способом введення кожного компонента комбінації можна керувати незалежно. Наприклад, один лікарський препарат можна застосовувати перорально, у той час як другий лікарський препарат можна вводити внутрішньом'язово. Комбінована терапія може проводитися циклами включення й відключення, які включають періоди відпочинку, так що організм пацієнта має шанс на відужання від будь-яких ще непередбачених побічних ефектів.

30 Лікарські препарати також можна поєднувати, так щоб одне введення доставляло обидва лікарських препарати.

Склад фармацевтичних композицій

35 Уведення кожного лікарського препарату комбінації можливо будь-яким придатним способом, який призводить до концентрації лікарського препарату, який, у комбінації з іншим компонентом, здатний поліпшити стан пацієнта (що можна визначати, наприклад, у лабораторних умовах впливом на підвищену експресію РМР22 за досягненням периферійних нервів).

40 Хоча цілком можливо вводити активні інгредієнти комбінації у вигляді чистих хімічних речовин, бажано представити їх у вигляді фармацевтичної композиції, що також згадується в даному контексті як фармацевтичний препарат. Можливі композиції включають композиції, придатні для перорального, ректального, місцевого (у тому числі трансдермального, зацічного й під'язичного) або парентерального (включаючи підшкірне, внутрішньом'язове, внутрішньовенне й внутрішньошкірне) введення.

45 Найчастіше дані фармацевтичні препарати призначаються пацієнтові в "пакетах пацієнта", які містять дозатори або інші засоби для введення відміряних одиниць дози для застосування під час окремого періоду лікування в одному пакеті, як правило, блистерного упакування. Пакети пацієнта мають перевагу перед традиційними рецептами, у яких фармацевт відокремлює запас фармацевтичного препарату для пацієнта від основного запасу, у тому, що пацієнт завжди має доступ до вкладеного листка, який міститься в пакеті пацієнта, який, як правило, відсутній у традиційних рецептах.

50 Включення вкладеного листка, як було показано, поліпшує виконання пацієнтом вказівок лікаря. Таким чином, винахід додатково містить у собі фармацевтичний препарат, як описано тут вище, у комбінації з пакувальним матеріалом, придатним для зазначених лікарських препаратів. У такому пакеті пацієнта про цільове застосування лікарського препарату для комбінованого лікування можна судити за інструкціями, засобами, запасами, адаптаціями і/або іншими засобами, які мають допомогти найбільш зручно застосовувати лікарський препарат для лікування. Такі заходи роблять пакет пацієнта спеціально призначеним і пристосованим для застосування при лікуванні з комбінацією даного винаходу.

60 Лікарський препарат може міститися в будь-якій придатній кількості в будь-якій придатній речовині носія й може бути присутнім у кількості 1-99 % мас. від загальної ваги композиції.

Композицію можна надавати в лікарській формі, яка придатна для орального, парентерального (наприклад, внутрішньовенного, внутрішньом'язового), ректального, шкірного, носового, вагінального, інгаляційного, шкірного (ділянка) або очного шляху введення. Таким чином, композиція може бути у вигляді, наприклад, таблеток, капсул, пігулок, порошків, гранул, суспензій, емульсій, розчинів, гелів, включаючи гідрогелі, паст, мазей, кремів, пластирів, спреїв, осмотичних засобів доставки, супозиторіїв, клізм, ін'єкцій, імплантатів, спреїв і аерозолів.

Фармацевтичні композиції можна сформувати відповідно до звичайної фармацевтичної практики (див., наприклад, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20-е видання), під ред. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, ред. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

Фармацевтичні композиції згідно з винаходом можна сформувати так, щоб суттєве вивільнення активного препарату відбувалось відразу ж після введення або в будь-який заданий час або період часу після введення.

Препарати з регульованим вивільненням включають (I) препарати, які створюють практично постійну концентрацію лікарського препарату в організмі протягом тривалого періоду часу; (II) препарати, які після закінчення заданого часу відтермінування створюють практично постійну концентрацію лікарського препарату в організмі протягом тривалого періоду часу; (III) препарати, які підтримують дію лікарського препарату протягом заздалегідь визначеного періоду часу, зберігаючи відносно постійний, ефективний рівень лікарського препарату в організмі із супутньою мінімізацією небажаних побічних ефектів, пов'язаних з коливаннями в рівні плазми активної речовини лікарського препарату; (IV) препарати, які локалізують дію лікарського препарату за допомогою, наприклад, просторового розміщення композиції з регульованим вивільненням поруч із ураженою тканиною або органом або в них, і (V) препарати, які досягають дії лікарського препарату за допомогою носіїв або хімічних похідних для доставки лікарського препарату до певного типу клітин-мішеней.

Адміністрування лікарських препаратів у формі препарату контрольованого вивільнення є особливо бажаним у випадках, коли лікарський препарат у комбінації має (I) вузький терапевтичний індекс (тобто різниця між концентрацією в плазмі, яка приводить до шкідливих побічних ефектів або токсичних реакцій, і концентрацією в плазмі крові, що приводить до терапевтичного ефекту, є невеликою; загалом, терапевтичний індекс, TI, визначається як відношення середньої летальної дози (LD50) до середньої ефективної дози (ED50)); (II) вузький інтервал поглинання в шлунково-кишковому тракті, або (III) дуже короткий біологічний період напіврозпаду, так що для підтримання плазмового рівня на терапевтичному рівні потрібне часте введення дози протягом дня.

Кожну з ряду стратегій можна здійснювати з метою одержання контрольованого вивільнення, при якому швидкість вивільнення перевищує швидкість метаболізму лікарського препарату, про який мова йде. Контрольоване вивільнення можна одержувати шляхом відповідного вибору різних параметрів препаратів та інгредієнтів, у тому числі, наприклад, різних видів композицій контрольованого вивільнення й покриттів. Таким чином, лікарський препарат формується з відповідними допоміжними речовинами у фармацевтичній композиції, що, при введенні, вивільняє лікарський препарат у керованому режимі (композиції з однієї або декількох окремих таблеток або капсул, олійні розчини, суспензії, емульсії, мікрокапсули, мікросфери, наночастки, патчі та ліпосоми).

Тверді лікарські форми для перорального введення

Препарати для перорального введення включають таблетки, які містять активний інгредієнт(и) у суміші з нетоксичними фармацевтично прийнятними наповнювачами. Такими наповнювачами можуть бути, наприклад, інертні розріджувачі або наповнювачі (наприклад, сахароза, мікрокристалічна целюлоза, крохмалі, у тому числі картопляний крохмаль, карбонат кальцію, хлорид натрію, фосфат кальцію, сульфат кальцію, або фосфат натрію); розпушувачі, гранулюючі речовини й (наприклад, похідні целюлози, включаючи мікрокристалічну целюлозу, крохмалі, у тому числі картопляний крохмаль, кроскармелозу натрію, альгінати, або альгінову кислоту); зв'язуючі речовини (наприклад, акацію, альгінову кислоту, альгінат натрію, желатин, крохмаль, прежелатинізований крохмаль, мікрокристалічну целюлозу, карбоксиметилцелюлозу натрію, метилцелюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу, етилцелюлозу, полівінілпіролідон, або поліетиленгліколь) і змащувальні речовини, речовини, які сприяють ковзанню, і антиадгезиви (наприклад, стеаринова кислота, кремнезем, або тальк). Іншими фармацевтично прийнятними наповнювачами можуть бути барвники, ароматизатори, пластифікатори, зволожувачі, буферні агенти, тощо.

Таблетки можуть бути без покриття, або вони можуть бути покриті відомими способами, за бажанням, для того, щоб затримати розпад і поглинання в шлунково-кишковому тракті й, тим

самим, забезпечувати стійку дію протягом більш тривалого періоду. Покриття можна адаптувати до вивільнення активної речовини лікарського препарату в заданій моделі (наприклад, для того щоб добитися контрольованого вивільнення), або можна адаптувати так, щоб не вивільняти активну речовину лікарського препарату до проходження шлунка (кишкове покриття). Покриттям може бути цукрове покриття, плівкове покриття (наприклад, на основі гідроксипропілметилцелюлози, метилцелюлози, метил гідроксиетилцелюлози, гідроксипропілцелюлози, карбоксиметилцелюлози, акрилатних співполімерів, поліетиленгліколей і/або полівінілпіролідону) або кишкове покриття (наприклад, на основі співполімеру метакрилової кислоти, ацетатфталату целюлози, фталату гідроксипропілметилцелюлози, ацетатсукцинату гідроксипропілметилцелюлози, полівінілацетатфталату, шелаку, і/або етилцелюлози). Можна використовувати матеріал для відтермінування, такий як, наприклад, гліцерин або гліцерилдистеарат.

Композиції твердих лікарських форм можуть включати покриття, адаптоване для захисту композиції від небажаних хімічних змін (наприклад, хімічної деградації до вивільнення активної речовини лікарського препарату). Покриття можна наносити на тверду лікарську форму в подібній манері, як описано в Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

Лікарські препарати можна змішувати разом у таблетці або можна розділяти на частини. Наприклад, перший лікарський препарат міститься на внутрішній стороні таблетки, а другий лікарський препарат перебуває на зовнішній стороні, так що значна частина другого лікарського препарату вивільняється до вивільнення першого лікарського препарату.

Препарати для перорального введення можуть також бути представлені у вигляді жувальних таблеток, або у вигляді твердих желатинових капсул, у яких активний інгредієнт змішаний з інертним твердим розріджувачем (наприклад, картопляним крохмалем, мікрокристалічною целюлозою, карбонатом кальцію, фосфатом кальцію або каоліном), або у вигляді м'яких желатинових капсул, у яких активний інгредієнт змішують із водою або олійним середовищем, наприклад, з рідким парафіном або маслиною олією. Порошки й гранули можна приготувати, застосовуючи інгредієнти, згадані вище для таблеток і капсул, звичайним способом.

Композиції контрольованого вивільнення для перорального введення можуть, наприклад, бути створені для вивільнення активного лікарського препарату, контролюючи розчинення й/або поширення активної речовини лікарського препарату.

Контрольоване вивільнення розчиненням або дифузією може бути досягнуте відповідним покриттям композиції лікарських препаратів у вигляді таблеток, капсул, гранул, або гранулята, або включенням лікарського препарату до відповідного матрикса. Покриття контрольованого вивільнення може включати одну або кілька покриваючих речовин, згаданих вище, і/або, наприклад, шелак, бджолиний віск, гліковіск, касторовий віск, карнаубський віск, стеариловий спирт, гліцерилмоностеарат, гліцерилдистеарат, гліцеринпальмітостеарат, етилцелюлозу, акрилові смоли, DL-полімолочну кислоту, бутиратацетат целюлози, полівінілхлорид, полівінілацетат, вінілпіролідон, поліетилен, поліметакрилат, метилметакрилат, 2-гідроксиметакрилат, гідрогелі метакрилат, 1,3-бутиленгліколь, етиленглікольметакрилат, і/або поліетиленгліколи. У композиції матрикса контрольованого вивільнення матричний матеріал також може включати, наприклад, гідратовану метилцелюлозу, карнаубський віск і стеариловий спирт, карбопол 934, силікон, гліцеринтристеарат, метилакрилат-метилметакрилат, полівінілхлорид, поліетилен, і/або галогеновані фторвуглеводи.

Композиція контрольованого вивільнення, яка містить один або кілька лікарських препаратів комбінацій формули винаходу, може бути також у вигляді плавучої таблетки або капсули (наприклад, таблетки або капсули, яка при пероральному введенні плаває на поверхні шлункового вмісту протягом певного періоду часу). Композицію плавучої таблетки лікарського препарату(ів) можна одержати гранулюванням суміші лікарського препарату(ів) з наповнювачами й 20-75 % мас./мас. гідроколідів, такими як гідроксиетилцелюлоза, гідроксипропілцелюлоза або гідроксипропілметилцелюлоза. Отримані гранули можна потім пресувати в таблетки. При контакті зі шлунковим соком таблетки формують досить водонепроникний гелевий бар'єр навколо її поверхні. Цей гелевий бар'єр бере участь у підтримуванні щільності менше одиниці, що дозволяє таблетці залишатися на плаву в шлунковому соку.

Рідини для перорального введення

Порошки, дисперговані порошки або гранули, придатні для одержання водної суспензії шляхом додавання води, є зручними лікарськими формами для перорального введення. Композиція у вигляді суспензії забезпечує активний інгредієнт у суміші з диспергуючим або змочувальним агентом, суспендуючим агентом і одним або декількома консервантами.

Придатними суспендуючими агентами є, наприклад, карбоксиметилцелюлоза натрію, метилцелюлоза, альгінат натрію тощо.

Композиції для парентерального введення

5 Фармацевтична композиція може також вводитися парентерально ін'єкцією, інфузією або імплантацією (внутрішньовенні, внутрішньом'язові, підшкірні тощо) у лікарських формах, композиціях, або через придатні засоби доставки або імплантати, які містять звичайні, нетоксичні, фармацевтично прийнятні носії й допоміжні речовини. Композиція й підготовка таких композицій добре відомі фахівцям у даній галузі фармацевтичної композиції.

10 Композиції для парентерального введення можуть бути надані у формі одиної дози (наприклад, в ампулах, які містять одну дозу), або у флаконах, які містять кілька доз, і до яких може бути доданий придатний консервант (див. нижче). Композиція може мати вигляд розчину, суспензії, емульсії, інфузійного засобу, або засобу доставки для імплантації, або вона може бути представлена у вигляді сухого порошку, щоб бути відновленою водою або іншим придатним носієм перед використанням. Крім активного препарату(ів), композиція може містити 15 придатні парентерально прийнятні носії й/або наповнювачі. Активний препарат(и) може бути включений у мікросфери, мікрокапсули, наночастки, ліпосоми, або тому подібне для контрольованого вивільнення. Композиція може містити в собі суспендуючі, солюбілізуючі, стабілізуючі, рН-регулюючі агенти й/або диспергуючі агенти.

20 Фармацевтичні композиції відповідно до винаходу можуть перебувати у формі, придатній для стерильних ін'єкцій. Щоб підготувати таку композицію, придатні активні препарат(и) розчиняють або суспендують у парентерально прийнятному рідкому носії. До прийнятних носіїв і розчинників, які можна застосовувати, відносяться вода, вода, доведена до потрібного рН додаванням відповідного кількості соляної кислоти, гідроксиду натрію або придатного буфера, 1,3-бутандіол, розчин Рінгера й ізотонічний розчин хлориду натрію. Водний препарат може 25 також містити один або кілька консервантів (наприклад, метил-, етил або н-пропіл-п-гідроксибензоат). У випадках, коли один з лікарських препаратів є лише помірно або слабо розчинним у воді, може бути доданий посилюючий розчинення або розчинюючий агент, або розчинник може містити 10-60 % мас./мас. пропіленгліколю тощо.

30 Композиції для парентерального введення з контрольованим вивільненням можуть мати вигляд водної суспензії, мікросфер, мікрокапсул, магнітних мікросфер, олійних розчинів, олійних суспензій або емульсій. Крім того, активний препарат(и) можуть бути включені в біосумісні носії, ліпосоми, наночастки, імплантати, або інфузійні засоби. Матеріали для використання в підготовці мікросфер і/або мікрокапсул, наприклад, біодеструкційні/біоерозійні полімери, такі як полігалактин, полі-(ізобутилціаноакрилат), полі(2-гідроксиетил-L-глутамін). Біосумісними 35 носіями, які можуть бути використані при розробці парентеральної композиції контрольованого вивільнення, є вуглеводи (наприклад, декстрини), білки (наприклад, альбумін), ліпопротеїди або антитіла. Матеріали, які застосовуються в імплантатах, можуть бути не здатними біологічно розкладатися (наприклад, полідиметилсилоксан) або мати біодеструкційні властивості (наприклад, полі(капролактон), полі(гліколева кислота) або полі(ортоефіри)).

40 Композиції для ректального введення

Придатні лікарські форми для композиції для ректального введення містять включають супозиторії (типу емульсії або суспензії) і ректальні желатинові капсули (розчини або суспензії). У типовій супозиторній формі активний препарат(и) сполучаються з відповідною 45 фармацевтично прийнятною супозиторною основою, такою як масло какао, етерифіковані жирні кислоти, оброблений гліцеринований желатин, а також різні водорозчинні або дисперговані основи, такі як поліетиленгліколі. Можуть бути включені різні добавки, підсилювачі, або поверхнево-активні речовини.

Композиції для підшкірного й локального введення

50 Фармацевтичні композиції можуть також застосовуватися локально на шкірі для абсорбції крізь шкіру в лікарських формах або композиціях, які містять умовно нетоксичні фармацевтично прийнятні носії й наповнювачі, у тому числі, мікросфери й ліпосоми. Композиції включають креми, мазі, лосьйони, лініменти, гелі, гідрогелі, розчини, суспензії, палички, аерозолі, пасту, пластери та інші види трансдермальних систем доставки лікарських препаратів. Фармацевтично прийнятні носії або наповнювачі можуть включати емульгатори, антиоксиданти, буферні 55 речовини, консерванти, зволожувачі, підсилювачі проникнення, хелатуючі агенти, гелеутворюючі агенти, мазеві основи, парфуми й шкірозахисні засоби.

Емульгаторами можуть бути природні смоли (наприклад, аравійська камедь або трагакант).

60 Консервантами, зволожувачами, підсилювачами проникнення можуть бути парабени, такі, як метил- або пропіл-п-гідроксибензоат і хлорид бензалконію, гліцерин, пропіленгліколь, сечовина тощо.

Фармацевтичні композиції, описані вище для місцевого застосування на шкірі, також можна використовувати у зв'язку з місцевим застосуванням на або поруч із частиною тіла, яку потрібно лікувати. Композиції можна адаптувати для прямого застосування або для застосування за допомогою спеціальних засобів доставки ліків, таких як пов'язки або, альтернативно, пластирі, прокладки, губки, смуги або інші форми придатного гнучкого матеріалу.

Дозування й тривалість лікування

Слід мати на увазі, що лікарські препарати комбінації можна вводити одночасно, у тій же або іншій фармацевтичній формі, або послідовно. При послідовному введенні затримка у введенні одного з активних інгредієнтів повинна бути такою, щоб не втратити користі ефективного впливу комбінації активних інгредієнтів. Мінімальна вимога для комбінації відповідно до даного опису полягає в тому, що комбінація повинна бути призначена для спільного введення з вигодою ефективного впливу комбінації активних інгредієнтів. Передбачене використання комбінації можуть бути забезпечене засобами, запасами, адаптаціями і/або іншими засобами, щоб допомогти застосовувати комбінацію відповідно до винаходу.

Терапевтично ефективні кількості лікарських препаратів, які є предметом даного винаходу, можуть бути використані разом для одержання лікарського засобу, який застосовується для зменшення впливу підвищеної експресії гена RMP22; відновлення нормальної мієлінізації й нервової цілісності, запобігання або зниження ризику розвитку хвороби ШМТ, припинення або уповільнення прогресування хвороби ШМТ, як тільки вона починає проявлятися клінічно, і запобігання або зниження ризику першого або наступного виникнення нейропатичної події.

Хоча активні лікарські препарати даного винаходу можуть бути введені в кілька прийомів, наприклад, два або три рази на день, разова добова доза кожного лікарського препарату в комбінації є кращою, причому найкращою є разова добова доза всіх лікарських препаратів в одній фармацевтичній композиції (стандартна лікарська форма).

Уведення може бути відбуватися від одного до декількох раз на день протягом декількох днів до декількох років, а може бути навіть протягом життя пацієнта. Хронічне або, щонайменше періодично повторюване тривале введення, буде застосовуватися в більшості випадків.

Термін "стандартна дозована форма" відноситься до фізично дискретних одиниць (таких як капсули, таблетки, або наповнені циліндри шприца), які є придатними як одиничні дози для людини як суб'єкта, причому кожна одиниця містить певну кількість активного матеріалу або матеріалів, розраховану для одержання бажаного терапевтичного ефекту, у комбінації з необхідним фармацевтичним носієм.

Кількість кожного лікарського препарату в комбінації, яка є більш бажаною для одиничної дози, буде залежати від декількох факторів, у тому числі, методу введення, маси тіла й віку хворого, тяжкості нейропатичного ушкодження, заподіяного в результаті захворювання ШМТ, або ризику можливих побічних ефектів, що враховують загальний стан здоров'я людини, яка піддається лікуванню.

Крім того, фармакогеномна (вплив генотипу на фармакокінетичний, фармакодинамічний профіль або профіль ефективності терапії) інформація про конкретного пацієнта може вплинути на використовувану дозу.

Крім випадків, коли у відповідь на особливо тяжкі випадки захворювання ШМТ можуть знадобитися більш високі дози, а також при лікуванні дітей, коли повинні бути обрані більш низькі дози, кращою є така доза кожного препарату в комбінації, яка, як правило, лежить у діапазоні доз, не вище тих, які зазвичай призначаються для тривалого підтримуючого лікування або перевірених на безпеку у великій фазі 3 клінічних досліджень.

Наприклад,

- для рапаміцину від 1 до 100 мкг/кг на добу, як правило, від 1 до 50 мкг/кг, наприклад, від 5 до 30 мкг/кг/добу,

- для міфепристону від 1 до 300 мкг/кг на добу, як правило, від 10 до 200 мкг/кг, наприклад, від 10 до 80 мкг/кг/добу,

- для налтрексону від 1 до 100 мкг/кг на добу, як правило, від 1 до 50 мкг/кг, наприклад, від 1 до 20 мкг/кг/добу,

- для пілокарпіну від 1 до 100 мкг/кг на добу, як правило, від 1 до 50 мкг/кг, наприклад, від 1 до 20 мкг/кг/добу,

- для баклофену від 1 до 300 мкг/кг на добу, як правило, від 10 до 200 мкг/кг, наприклад, від 20 до 100 мкг/кг/добу,

- для метимазолу від 1 до 100 мкг/кг на добу, як правило, від 1 до 50 мкг/кг, наприклад, від 1 до 20 мкг/кг/добу.

Найкраще дозування буде відповідати кількостям від 1 % до 10 % тих, які звичайно

призначають для довгострокового підтримуючого лікування.

Слід мати на увазі, що кількість лікарського препарату, яка вводиться насправді, буде визначатися лікарем, з урахуванням відповідних обставин, у тому числі, умов або обставин лікування, точного складу комбінації для введення, віку, ваги й реакції конкретного пацієнта, тяжкості симптомів пацієнта й обраного способу введення. Таким чином, вище згадані діапазони доз приведені з метою загального орієнтування й підтримання викладеного тут керівництва, але вони не призначені для обмеження об'єму винаходу.

Наступні приклади наведені для ілюстрації, а не для обмеження.

Приклади

А. Приготування комбінацій лікарських препаратів

Наступні комбінації лікарських препаратів готувалися:

	Молекула	Доза
Суміш 1	Сорбітол	2,1 мг/кг/добу
	S-баклофен (-)	60 мкг/кг/добу
	Налтрексон	7 мкг/кг/добу

	Молекула	Доза
Суміш 2	Рапаміцин	15 мкг/кг/добу
	Міфепристон	40 мкг/кг/добу

	Молекула	Доза
Суміш 3	Рапаміцин	15 мкг/кг/добу
	Міфепристон	40 мкг/кг/добу
	Пілокарпін	7 мкг/кг/добу

	Молекула	Доза
Суміш 4	Рапаміцин	15 мкг/кг/добу
	Міфепристон	40 мкг/кг/добу
	Баклофен	60 мкг/кг/добу

	Молекула	Доза
Суміш 5	Рапаміцин	15 мкг/кг/добу
	Міфепристон	40 мкг/кг/добу
	Метимазол	4,2 мкг/кг/добу

	Молекула	Доза
Суміш 6	Рапаміцин	15 мкг/кг/добу
	Налтрексон	7 мкг/кг/добу
	Метимазол	4,2 мкг/кг/добу

	Молекула	Доза 1	Доза 2	Доза 3
Суміш 7	Сорбітол	10,5 мкг/кг/добу	2,1 мкг/кг/добу	1,05 мкг/кг/добу
	(RS) баклофен	0,3 мкг/кг/добу	60 мкг/кг/добу	30 мкг/кг/добу
	Налтрексон	35 мкг/кг/добу	7 мкг/кг/добу	3,5 мкг/кг/добу

В. Експерименти в лабораторних умовах

1. Аналізи експресії RMP22 на шванівських клітинах, оброблених сумішшю 1-6

1.1 Клітинна культура

1.1.1: Комерційно доступні щурячі первинні шванівські клітини

Флакони первинної культури щурячих шванівських клітин (SC) (Sciencell # R1700) розморожують і висівають при щільності 10000 клітин/см<sup>2</sup> в "Sciencell Schwann cell medium" (базальному середовищі від Sciencell # R1701) в 75 см<sup>2</sup> колбах, попередньо покритих полі-L-лізином. Поживне середовище складається з базального середовища, 5 % ембріональної телячої сироватки (3H-Biomedical AB #1701-0025), 1 % додаткового середовища росту шванівських клітин (3H Biomedical AB #1701-1752), 1 % гентаміцину (Sigma # G1397) і 10 мкм форсколіну (Sigma # F6886) для стимулювання їх проліферації.

Після досягнення злиття (від 4 до 10 днів, залежно від партії клітин), шванівські клітини очищають обережним перемішуванням або імуновисаджуванням thy1.1, які дозволяють

ізолювати SC від супутніх фібробластів для вирощування культур із чистотою не менше 95 %. SC потім підраховують (Тryptan синій метод) і висівають у те ж саме середовище SC в 75 см<sup>2</sup> колбу, попередньо вкриту полі-L-лізином. При злитті клітини промивають, трипсинізують (трипсин-EDTA, розведений 1x, Invitrogen # 1540054), розбавляють у ФСБ без кальцію й магнію), підраховують і поміщають в 12-коміркові чашки (140000 клітин/комірку) в Sciencell Schwann cell medium з 5 % FBS, 1 % додаткового клітинного середовища росту (CGS), 40 мкг/мл гентаміцину й 4 мкМ форсколіна.

#### 1.1.2 Виготовлені на замовлення щурячі первинні шванівські клітини

Первинні культури шванівських клітин (SC) одержують із сідничних нервів новонароджених пацюків Sprague-Dawley (між P0 і P2). Усіх новонароджених пацюків забивають та ізолюють у чашку Петрі. Препарування проводять за умов стерильності.

Дорсальну шкіру видаляють із задніх лап і нижньої частини тулуба. Сідничний нерв виділяють і переносять на культуральне блюдо із крижаним середовищем Лейбовіц (L15, Invitrogen # 11415) з додаванням 1 % розчину пеніциліну/стрептоміцину (50UI/мл і 50 мкг/мл, відповідно; Invitrogen # 15070) і 1 % бичачого сироваткового альбуміну (BSA, Sigma A6003). Обидва нерва пацюка переносять у пробірку, що містить 15 мл крижаний L15. Середовище L15 потім видаляють і заміняють 2,4 мл DMEM (Invitrogen # 21969035) з 10 мг/мл колагенази (Sigma # A6003). Нерви інкубують у даному середовищі протягом 30 хвилин при 37 °С. Середовище потім видаляють, і обидва нерви роз'єднують трипсином (10 % трипсин EDTA 10x, Invitrogen # 15400054), розведеним у ФСБ без кальцію й магнію (Invitrogen # 2007-03) протягом 20 хвилин при 37 °С. Реакцію зупиняють додаванням DMEM, що містить ДНКази I класу II (0.1 мг/мл Roche diagnostic # 104159) і фетальну телячу сироватку (FCS 10 %, Invitrogen # 10270). Клітинну суспензію розтирали піпеткою 10 мл і пропускали крізь фільтр у пробірку об'ємом 50 мл (Swinnex 13мм фільтрувальні установки, Millipore, з фільтрами з 20 мкм нейлонової сітки, Фішер). Клітинну суспензію центрифугують при 350g 10 хв. за кімнатної температури (RT) і осад суспендують в DMEM з 10 % FCS і 1 % пеніциліну/стрептоміцину. Клітини підраховують (Тryptan синій метод) і висівають у фальконових планшетах для тканинної культури 100 мм Primaria за щільності від 5 × 10<sup>5</sup> до 10<sup>6</sup> клітин/чашку.

Через добу культивування, середовище заміняють DMEM, 10 % FCS, 1 % пеніциліну/стрептоміцину й 10 мкМ цитозину b-D-арабінофуранозиду (Sigma # C1768). Через 48 годин середовище забирають, і клітини тричі промивають DMEM. Потім додають середовище росту SC, що складається з DMEM, 10 % FCS, 1 % пеніциліну/стрептоміцину, 2 мкМ форсколіну (Sigma # F6886), 10 мкг/мл екстракту бичачого гіпофіза (PEX, Invitrogen # 13 028). Середовище заміняють кожні 2-3 дні.

Через 8 днів культивування (від 4 до 10 днів, залежно від партій клітин) шванівські клітини досягають злиття, і культуру, яка містить велику кількість забруднюючих фібробластів, очищають методом імуновисаджування thy1.1. Після даного очищення клітини суспендують у середовищі росту при 10000 клітин/см<sup>2</sup> у колбах 75 см<sup>2</sup>, попередньо покритих полі-L-лізином. При досягненні злиття клітини промивають, трипсинізують (трипсин-EDTA), підраховують і поміщають в 12-коміркові чашки (100000 клітин/комірку).

#### 1.1.3 Інкубація лікарського препарату

Після приміщення клітин в 12-коміркові чашки середовище заміняють певним середовищем, яке містить DMEM-F12 (Invitrogen # 21331020), доповнене 1 % додаткового середовища N2 (Invitrogen # 17502), 1 % L-глутаміну (Invitrogen # 25030024), 2,5 % FBS (Sciencell # 0025), 0,02 мкг/мл кортикостерону (Sigma # C2505), 4 мкМ форсколіну й 50 мкг/мл гентаміцину. Фактори росту не додають до даного середовища, з метою сприяння диференціації SC.

Через 24 години середовище заміняють певним середовищем (DMEM-F12), доповненим 1 % інсулін-трансферин-селенів - X (ITS, Invitrogen # 51 300), 16 мкг/мл путресцину (Sigma # P5780), 0,02 мкг/мл кортикостерону й 50 мкг/мл гентаміцину. На даному етапі ні форсколін, ні прогестерон не присутні в середовищі.

Один день через шванівські клітини стимулюють комбінаціями лікарських препаратів протягом 24 годин (3 комірки/стан). Підготовку кожної сполуки проводять безпосередньо перед його додаванням до клітинного культурального середовища.

Лікарські препарати додають до певного середовища, яке складається з DMEM-F12 з 1 % інсулін-трансферин-селенів-X (ITS, Invitrogen # 51 300), 16 мкг/мл путресцину, 0,02 мкг/мл кортикостерону, 10 нм прогестерону й 50 мкг/мл гентаміцину. Відсутність форсколіну під час стимуляції лікарським препаратом дозволяє уникнути насичення аденілатциклази.

#### 1.2. Очищення шванівських клітин імуновисаджуванням thy1.1

Для запобігання забрудненню культури фібробластів шванівські клітини очищають за допомогою протоколу імуновисаджування клону Thy1.1 (ATCC TIB-103<sup>TM</sup>).

100 мм бактеріальні чашки Петрі, попередньо покриті антитілами, готують у такий спосіб: дані чашки тричі промивають ФСБ і обробляють 20 мл розчину 50 мМ Трис-НСІ, рН 9,5, з 10 мкг/мл козячого антимішачого Іgm Му-антитіла (Jackson Immunoresearch # 115-005-020) протягом ночі при 4 °С, потім промивають 3 рази ФСБ і обробляють розчином ФСБ із 0,02 % БСА й надосадовою рідиною, отриманою з гібридомної культури Т11D7е2 (АТСС # ТІВ-103), яка містить Thy1.1-іgm-антитіло, протягом 2 годин за кімнатної температури. Остаточо, планшети три рази промивають ФСБ до того, як додають клітинні суспензії.

SC відокремлюють трипсином-ЕДТА. Як тільки більшість клітин виявляється в суспензії, трипсин нейтралізують DMEM-10 % FBS і клітини центрифугують. Осад дисоційованих клітин ресуспендують в 15 мл середовища з 0,02 % БСА із щільністю  $0.66 \times 10^6$  клітин на мл (максимум) і переносять у чашки Петрі (близько 6,6 мільйона клітин /10 мл / чашку 100 мм).

Клітинну суспензію інкубують у чашці Петрі, покритій Thy 1.1, протягом 45 хв. при 37 °С з обережним перемішуванням кожні 15 хв., щоб запобігти неспецифічному зв'язуванню. Більшість фібробластних клітин, які експресують Thy1.1, зв'язуються із чашкою. Наприкінці інкубації клітинну суспензію видаляють і центрифугують. Дана клітинна суспензія теоретично містить тільки шванівські клітини. Клітини центрифугують, і осад клітин суспендують у середовищі росту з 10 мкМ форсколіну при  $16000 \text{ клітин/см}^2$  у колбі T75  $\text{см}^2$ , обробленому полі-L-лізином.

### 1.3 Кількісна полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскриптазою (К-ЗТ-ПЦР)

Кількісну ЗТ-ПЦР використовують для порівняння рівнів РМР22 мРНК після стимуляції лікарським препаратом відносно рибосомної РНК L13a щурячої первинної культури шванівських клітин (гена, який виконує базові клітинні функції).

Після ополіскування холодним стерильним ФСБ загальну РНК із кожного клітинного зразка вилучають і очищають із SC, використовуючи Qiagen Rneasy Micro Kit (Qiagen # 74 004). Нуклеїнові кислоти визначають кількісно спектрофотометром Nanodrop за допомогою 1 мкл зразка РНК. Цілісність РНК визначають апаратом Bioanalyzer (Agilent).

РНК назад транскрибують у кДНК у відповідності зі стандартним протоколом. Шаблони кДНК для ПЦР-ампліфікації синтезують із 200 нг загальної РНК за допомогою зворотної транскриптази Superscript II (Invitrogen # 18064-014) протягом 60 хв. при 42 °С у присутності оліго (дТ) у кінцевому об'ємі 20 мкл.

кДНК піддають ПЦР-ампліфікації з використанням системи "Lightcycler® 480" (Roche Molecular Systems, Inc). Кожну кДНК розбавляють у п'ять разів, перш ніж використовувати для ПЦР-ампліфікації. 2,5 мкл даної кДНК надходить у реакційний розчин ПЦР (кінцевий об'єм 10 мкл). Попередні експерименти гарантували, що кількісне визначення було зроблено в експонентній фазі процесу ампліфікації для обох послідовностей і що експресія гена порівняння була рівномірною в різних культуральних умовах.

ПЦР-реакцію проводять ампліфікацією 500 нМ прямого праймера щурячого РМР22 (NM\_017037), 5-GGAAACGCGAATGAGGC-3 (SEQ ID NO: 1) і 500 нМ зворотного праймера 5-GTTCTGTTTGGTTTGGCTT-3 (SEQ ID NO: 2) (ампліфікація 148-б.п.). Фрагмент 152-б.п. рибосомної RPL13A (NM\_173340) РНК ампліфікують паралельно в окремих реакціях для нормалізації успішності за допомогою 500 нМ прямого праймера на 5-CTGCCCTCAAGGTTGTG-3 (SEQ ID NO: 3) і 500 нМ зворотного праймера 5-CTTCTTCTTCCGGAATGGAT-3 (SEQ ID NO: 4).

Fret-хімію застосовували для виконання К-ЗТ-ПЦР аналізу. Fret-зонди складаються з 0,3 мкм РМР22-FL-5-GCTCTGAGCGTGCATAGGGTAC (SEQ ID NO: 5) або Rpl13A-FL-5-TCGGGTGGAAGTACCAGCC (SEQ ID NO: 6), мічених на своєму 3'-кінці флуорофорним барвником-донором (флуоресцеїн). 0.15 мкм Red640 зондів визначають у такий спосіб: 5'-red-rtpr22 AGGGAGGGAGGAAGGAAACCAGAAA (SEQ ID NO: 7) або Rpl13A-red-5'-TGACAGCTACTCTGGAGGAGAAACGGAA (SEQ ID NO: 8), мічених на своєму 5'-кінці флуорофорним барвником-акцептором (родамін червоний 640).

Кожна реакція ПЦР містила 2,5 мкл матричної кДНК у кінцевому об'ємі 10 мкл master mix kit (Roche # 04-887301001).

Застосовують наступні умови ПЦР: 10 сек при 95 °С, 10 сек при 63 °С і 12 сек при 72 °С і 30 сек при 40 °С (сорок циклів ампліфікації). Відносні рівні експресії гена РМР22 вимірюють визначенням співвідношення продуктів, зроблених із цільового гена РМР22 і ендогенного внутрішнього стандарту RPL13A.

### 1.4 Аналіз експресії білка РМР22 методом проточної цитометрії (FACS)

Через 8 годин, 24 години й 48 годин після інкубації лікарських препаратів супернатанти відокремлюють, центрифугують і заморожують. SC відокремлюють за допомогою трипсину-ЕДТА. Як тільки більшість клітин виявляється в суспензії, трипсин нейтралізують, застосовуючи DMEM з 10 % FCS.



Супернатанти із клітинами відокремлюють і центрифугують. Осад клітин переносять у мікропробірки, промивають один раз у ФСБ і фіксують певним розчином (Abscys #reagent A BUF09B). Через 10 хвилин клітини промивають один раз у ФСБ і зберігають при 4 °С.

Через п'ять днів після фіксації клітин усі клітинні препарати з різними часами інкубації мітять за допомогою наступного протоколу.

Клітини центрифугують при 7000 об./хв. протягом 5 хв. і осад суспендують у розчині пермеабілізації (Abscys # Reagent A BUF09B) і мітять первинним антитілом PMP22 (Abscam # ab61220, 1/50) протягом 1 години за кімнатної температури. Потім клітини центрифугують при 7000 об./хв. протягом 5 хвилин і клітинний осад промивають один раз у ФСБ. Додають вторинне антитіло, пов'язане з Alexa Fluor 488 (козячий анти-IgG кролика, Molecular Probes # A11008, 1/100) протягом однієї години за кімнатної температури. Потім клітини центрифугують при 7000 об./хв. протягом 5 хвилин клітинний осад промивають один раз у ФСБ. Мічення збільшується при додаванні третинного антитіла, пов'язаного з Alexa Fluor 488 (козячий анти-IgG курчати, Molecular Probes # A21467, 1/100) протягом однієї години інкубації за кімнатної температури. Потім клітини промивають один раз у ФСБ. Контроль без яких-небудь антитіл (немічені клітини) проводять, щоб визначити рівень автофлуоресценції й адаптувати чутливість фотомультіплікаторів. Контроль із обома вторинним і третинним антитілами, але без первинного антитіла проводять для оцінки неспецифічного зв'язування антитіл.

Збір даних і аналіз виконують із цитометром FACS Array і програмним забезпеченням FACS Array (Becton Dickinson) на 5000 клітинах. Аналізують розсіювання вперед (FSC), корельоване із клітинним об'ємом (розміром), і бічне розсіювання (SSC), яке залежить від внутрішньої складності їх клітин (гранулярності). Для експресії PMP22 проводять аналіз усередині всіх клітин і розраховують відсоток позитивних клітин. Позитивними клітинами є клітини з інтенсивністю флуоресценції вищою, ніж контроль із вторинним антитілом.

Для того щоб визначити число клітин SC, клітини в контрольному середовищі аналізують із застосуванням антитіл анти-S100-білка.

Клітини одержують у відповідності з наступним протоколом: шванівські клітини фарбують антитілом анти-S100-білка (Dako # S0311, 1/100) протягом 1 години за кімнатної температури. Дане антитіло позначене згідно із протоколом, описаним вище для імунозабарвлення PMP22, але без інкубації із третинним антитілом.

#### 1.5. Інкубація лікарського препарату й активність

Лікарські препарати інкубують протягом 24 годин або 48 годин у тому ж визначеному середовищі, яке описане вище (3 комірки/стан) під час відсутності форсколіну, щоб уникнути насичення стимуляції аденілатциклази, але в присутності 10 нм прогестерону. Після інкубації лікарського препарату супернатанти відокремлюють і шванівські клітини заморожують для К-ЗТ-ПЦР аналізу.

Дані експерименту приводяться в таблиці 1.

Таблиця 1

Комбінація	Експресія PMP22
Суміш 1	пригнічення
Суміш 2	пригнічення
Суміш 3	пригнічення
Суміш 4	пригнічення
Суміш 5	пригнічення
Суміш 6	пригнічення

#### 2. Оцінка синергетичного ефекту сполук у суміші 7 у моделі спільної культури для ШМТ

Модель спільної культури застосовували як модель ШМТ 1А у лабораторних умовах. Дана модель мієлінізації складається зі спільно культивованих сенсорних нейронів і шванівських клітин із чоловічого PMP22 трансгенного (TG) дисоційованого спинного кореневого ганглія (DRG).

Метою даного дослідження є оцінка впливу трьох досліджуваних сполук (+/- баклофен, налтрексон і сорбіт) і суміші 7 (суміші даних трьох препаратів) на процес мієлінізації. Вплив трьох досліджуваних сполук, а також їх суміші на мієлінізацію оцінюють оцінкою експресії основного мієлінового білка ((MBP) у присутності аскорбінової кислоти.

#### 2.1 Матеріали й методи

Вагітних самок пацюків (15 днів вагітності) убивають шийною дислокацією. Ембріони видаляють із матки, і вони перебувають на аналогічній стадії розвитку плода.

### 2.1.1 Генотипування

Частину кожної голови ембріона (3 мм<sup>3</sup>) поміщують у пробірку об'ємом 2 мл, вільну від ДНКаз. ДНК екстрагують набором SYBR Green Extract-N-Amp tissue PCR kit (Sigma, ref XNATG 1KT). 120 мкл екстракційного розчину (Kit Sigma, ref XNATG-1KT) додавали до кожної частини голови ембріона. Голови інкубують протягом 10 хв. за кімнатної температури. Наприкінці інкубації голови інкубують протягом 5 хв. при 95 °C у екстракційному розчині. Відразу ж після останньої інкубації додають 100 мкл нейтралізаційного розчину, кожний екстракт ДНК розбавляють в 1/40 стерильної особливо чистої води (посилання Biosolve, 91 589) і зберігають за температури +4 °C до використання. Генотипування жіночого (F) і чоловічого (M) ембріонів проводять під час розтину DRG, з набором kit Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, 4385612). Стать кожного ембріона визначають за допомогою чоловічого гена SRY. Праймери SRY поставляються Pharnext (SRY-F (SEQ ID NO: 9): 5'-GAGAGAGGCACAAGTTGGC-3'; SRY-R (SEQ ID NO: 10): 5'-GCCTCCTGGAAGGAGGCC-3'). Праймери SRY розбавляють до 3 мкм в особливо чистій воді (Biosolve, посилання: 91 589). Суміш для ПЦР готують із особливо чистою водою (4 мкл на зразок), 3 мкм праймера (2 мкл на зразок) і Master Mix (10 мкл на зразок). 16 мкл ПЦР суміші наносять у кожну комірку 96-коміркового ПЦР-планшета. 4 мкл кожної розведеної ДНК додають відповідно до розміщення за планом. ПЦР виконують за допомогою 7500 fast RT-PCR system (Applied Biosystems) за наступною програмою:

Початок: 95 °C - 20 сек

45 циклів: 95 °C - 10 сек, 65 °C - 10 сек, 72 °C - 30 сек (збір даних).

Крива плавлення: 95 °C - 15 сек, 64 °C - 1 хв., 90 °C - 30 сек (безперервний збір даних), 60 °C протягом 15 сек. Плоті ампліфікації й криві плавлення аналізують із програмним забезпеченням 7500 (Applied Biosystems).

Результати для кожного зразка порівнюють із негативним контролем (вода високого ступеня очищення) і з позитивним контролем (TG/чоловічий і WT/жіночий), щоб зняти інформацію щодо генотипу кожного ембріона.

### 2.1.2 Спільні культури сенсорних нейронів і шванівських клітин

Щурячі дорсальні кореневі ганглії культивували, як описано вище по Cosgaya і співавтор., 2002 і Rangaraju і співавтор., 2008.

Кожний ембріон кладуть на пронумеровану чашку Петрі (35 мм у діаметрі). Голову ембріона відрізають, поміщують у пробірку 1,5 мл, вільну від ДНКаз і екстрагують набором Extract-N-Amp Tissue Kit (Sigma Aldrich). Генотипування (чоловічий (M) і жіночий (F), дикий тип і трансгенний PMP22) проводять із набором Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Дане генотипування виконують паралельно з розсіченням дорсального кореневого ганглія (DRG), так що наприкінці дисекції одержують тільки один тип культури (DRG чоловічий трансгенний). DRG кожного ембріона збирають, поміщують у крижане середовище Лейбовіца (L15, Invitrogen). Наприкінці дисекції DRG TGM поєднують і дисоціюють трипсинізацією (трипсин-ЕДТА, 0,05 %, Invitrogen) протягом 20 хв. при 37 °C. Реакцію зупиняють додаванням DMEM, що містять 10 % ембріональної телячої сироватки (FBS) у присутності ДНКаз I (Roche). Суспензію розтирають із піпеткою 10 мл. Потім клітини центрифугують при 350 × g протягом 10 хв. за кімнатної температури. Осад дисоційованих клітин ресуспендують у нейробазальному середовищі (Invitrogen), яке містить 2 % B27 (Invitrogen), 1 % пеніциліну-стрептоміцину (Invitrogen), 1 % L-глутаміну й 50 нг/мл NGF (Sigma). Дане середовище є нейрональним середовищем. Життєздатні клітини підраховують у цитометрі Neubauer за допомогою трипанового синього ізоляційного тесту (Sigma) і висаджують на основі 10 000 клітин на комірку в 96-коміркових планшетах (Greiner), оброблених полі-L-лізином. Пластини підтримують при 37 °C у зволоженому інкубаторі в атмосфері повітря (95 %) - CO<sub>2</sub> (5 %). Половину стандартного нейронального культурального середовища змінюють щодня. Культури підтримують у стандартному нейробазальному середовищі протягом 7 днів, щоб дозволити шванівським клітинам заселити сенсорні аксони нейронів. На 7-й день культивування живлять стандартним нейрональним середовищем, доповненим або не доповненим 50 мкг/мл аскорбінової кислоти для того, щоб почати формування базальної пластинки й мієлінізації.

### 2.1.3.Інкубація лікарського препарату

На 7-й день додають наступні досліджувані сполуки (окремо або в комбінації) у середовище з 50 мкг/мл аскорбінової кислоти:

- (RS)-баклофен
- налтрексон
- D-сорбіт
- Суміш 7 = комбінація трьох окремих сполук.

Дані сполуки або комбінацію сполук випробовують у наступних концентраціях (табл. 2):

Таблиця 2

Концентрація окремих лікарських препаратів або в комбінації, які застосовуються для досліджень у лабораторних умовах експресії MBP у спільних культурах TG DRG/SC

		Доза 1	Доза 2	Доза 3	Доза 4	Доза 5	Доза 6	Доза 7
Окремі лікарські препарати	Налтрексон	5мкМ	1мкМ	200нМ	40нМ	8нМ	1,6нМ	320пМ
	D-Сорбіт	500мкМ	100мкМ	20мкМ	4мкМ	800нМ	160нМ	32нМ
	(RS)-баклофен	5мкМ	1мкМ	200нМ	40нМ	8нМ	1,6нМ	320пМ
Суміш 7	Налтрексон	5мкМ	1мкМ	200нМ	40нМ	8нМ	1.6нМ	320нМ
	D-Сорбіт	500мкМ	100мкМ	20мкМ	4мкМ	800нМ	160нМ	32нМ
	(RS)-баклофен	5мкМ	1мкМ	200нМ	40нМ	8нМ	1.6нМ	320нМ

Досліджувані сполуки інкубують протягом 5 різних проміжків часу: 5, 9, 10, 11 і 13 днів.

Отримують три окремі й незалежні культури DRG (Tg-ембріонів пацюків-самців). Дані умови оцінюють у присутності аскорбінової кислоти, 6 комірок на стан. Розчин готових до застосування всіх досліджуваних сполук одержують безпосередньо з вихідного розчину, який зберігають при -20 °С. Цей розчин готують один раз на тиждень. Половину стандартного нейронального середовища, доповненого досліджуваними сполуками й аскорбіновою кислотою (кожний компонент із концентрацією 1X), заміняють через день.

#### 2.1.4 Протокол фарбування

Через 5, 9, 10, 11 і 13 днів інкубації клітини фіксують холодним розчином етанолу (95 %) і оцтової кислоти (5 %) протягом 10 хв. Клітини стають проникними й блокуються ФСБ, які містять 0,1 % сапонін і 10 % козячої сироватки протягом 15 хв. Потім клітини інкубують зі специфічним маркером мієліну: поліклональним антитілом антитіла антимієлінового основного білка (MBP) (Sigma 118K0431).

Це антитіло виявляють козячим анти-кролячим IgG, міченим Alexa Fluor 568 і козячим антимишачим IgG, міченим Alexa Fluor 488 (Molecular Probes 687621, 623962). Ядра нейронів мітять флуоресцентним маркером (Hoechst розчин, SIGMA посилання B1155).

#### 2.1.5. Обробка даних

На комірку роблять 20 знімків з використанням Incell Analyzertm 1000 (GE Healthcare) з 20-кратним збільшенням. Усі зображення роблять за тих самих умов. Аналіз загальної довжини мієлінізованих аксонів було зроблений автоматично (довжина й площа навколо аксонів) за допомогою Developer software (GE Healthcare). Усі значення будуть виражені як середнє +/- s.e. середнє. Статистичні аналізи проводять за різних умов (ANOVA з наступним PLSD критерію Фішера, коли це дозволено).

#### 2.2. Результати

Синергетичний ефект лікарських препаратів у суміші 7

Важливий синергетичний ефект лікарських препаратів, що складають суміш 7 комбінації, спостерігається на експресію MBP. Дійсно, на 10 день (= 17 днів культивування), комбінація (RS)-баклофену, налтрексону й D-сорбіту значно збільшує експресію MBP при дозах 1 і 6, як показано на Фігурах 1A і 2A. З іншого боку, вищезгадані препарати, які застосовуються індивідуально, не виявляють істотного впливу, у порівнянні з контролем (Фігури 1B-D і 2B-D).

Значний вплив на експресію MBP також реєструють після 10 днів інкубації при дозах 2, 3, 4, 5 і 7 суміші 7 (Фігура 3A).

Цей ефект усе ще спостерігають на 11-й день із дозами 2-7 (Фігура 3B) у вигляді кривої із чіткою формою дзвона.

С. Експерименти на тваринній моделі ШМТ у природних умовах

Досліджували компоненти для терапевтичного ефекту на щурачій моделі.

Експериментальні групи формують із молодих пацюків кожної статі окремо. Пацюків розділяють на групи випадковим чином виходячи із ваги тіла. У деяких експериментах рандомізація заснована на успішності пацюків у тесті із палкою. Обидві статі представлені окремими контрольними групами, які чисельно рівні або більші, ніж оброблювані групи.

Пацюків хронічно лікують лікарськими препаратами - примусовою годівлею або введенням осмотичним підшкірним насосом Alzet (DURECT Corporation Cupertino, CA), залежно від біодоступності кожного лікарського препарату, протягом 3 або 6 тижнів. У всіх експериментах,

проведених у природних умовах, суміш 7 уводять шлуночковим зондом.

Тварин зважують два рази на тиждень для того, щоб підганяти дози до зростаючої ваги тіла. Якщо при лікуванні для введення обраний осмотичний насос, дози препарату розраховують на основі встановленої середньої ваги тіла тварин, очікуваної для їхнього віку за період тривалості роботи насоса (6 тижнів). Насоси повторно імплантують, якщо необхідно, з відповідним протоколом анестезії.

#### Поведінкові тести

Кожні три або чотири тижні тварин піддають поведінковому тесту. Кожний тест проводять тим самим дослідником в одній і тій же кімнаті й у той же час доби, ця однорідність підтримується протягом усього експерименту. Усі види лікування й визначення генотипу невідомі дослідникам. Для оцінки успішності протягом дослідження застосовували, в основному, "тест із палкою" і тест "сила хватки". Графік тесту з перекладиною може змінюватися в міру росту тварин (щоб уникнути зсуву через навчання, наприклад).

Кількісне визначення сили хватки дозволяє виявити тонкі відмінності в успішності хватки, яка, мабуть, складається з м'язової сили, статусу чутливості (наприклад, хворобливі тактильні відчуття можуть змінювати встановлені значення сили), поведінкового компонента ("мотивація"). Значення відрізняються для передніх і задніх кінцівок і в значній мірі залежать від віку тварин.

Тест сили захоплення вимірює силу, з якою тварина хапається за ручку передніми лапами або задніми лапами окремо. Динамометр поміщають із затиском для вимірювання сили (Force Gauge FG-5000A). Експериментатор тримає пацюка таким чином, що він захоплював ручку або передніми або задніми лапами, і м'яко тягне пацюка назад, допоки той не відпустить ручку. Силу, вимірювану, в момент коли тварина звільняє ручку, записують.

Обробляють результати двох послідовних вимірювань тестів передніх лап, і двох послідовних вимірювань тестів задніх лап, на одну тварину; відзначають тільки максимальну оцінку (одну для передніх лап і одну для задніх лап) (в N).

#### Тест із палкою

Тест оцінює здатність піддослідних пацюків триматися на фіксованому стрижні. РМР 22-пацюка, які проявляють м'язову слабкість, показують дефіцит продуктивності в цьому тесті (Середа та ін., 1996). Пацюка поміщають на чотирьох лапах на середині стрижня (діаметр: 2,5 см, довжина: 50 см, 30 см вище столу). Випробування проводять послідовно, число й тривалість випробувань в експериментах залежить від партії тварин. Цю мінливість у тестуванні ввели для того, щоб визначити графік, який відповідає кращій детекції рухового дефіциту в ШМТ-пацюків у ході експериментів.

Індекси продуктивності записують на кожній сесії:

- Число випробувань, необхідних, щоб утриматися протягом 60 секунд (або 30 сек для партії 1, сесія 1 і 2) на стрижні.

- Час, проведений на стрижні (тобто затримка падіння), у кожному випробуванні й середнє у сесії. В експериментальних процедурах, коли сесія закінчується після того, як пацюк залишився протягом часу відключення, тобто 30 або 60 сек, на стрижні, продуктивність часу відключення, (30 сек або 60 сек) привласнюється незавершеним випробуванням (наприклад, для партії 8, для тварини, яка залишається на стрижні менше ніж 10 сек у випробуваннях 1, 2 і 3, потім протягом 60 сек у випробуваннях 4 і 5, 60 сек привласнюється випробуванням від 6 до 10).

- Число падінь.

#### Загальна оцінка стану здоров'я

Вага тіла, явні ознаки (зовнішній вигляд хутра, положення тіла, хода, тремор та ін.) тварин контролюють протягом експерименту. Рейтингова шкала використовується для запису: 0 = нормальний, 1 = ненормальний.

#### Хода

Кожного пацюка спостерігають у новій щурячій клітці (розміри 55×33×18 см) без підстилки протягом п'яти хвилин.

Хода в пацюків оцінюється чотирма параметрами:

Оцінка 0: нормальна хода (вільна)

Оцінка 1: ненормальна хода (ускладнена або пацюк злегка накульгує)

Оцінка 2: помірна непрацездатність (пацюк тягне лапу й може поставити її правильно і йти)

Оцінка 3: серйозна непрацездатність (пацюк тягне одну або обидві задні лапи, але не в змозі поставити її/їх правильно).

#### Тест похилої площини

Обладнання для ковзання мало 30 × 50 см поверхню з оргскла, яку можна нахилити під кутом від 0° (горизонтальне положення) до 60°. Кожного пацюка спочатку поміщали на похилій

площині під кутом 25° у позиції вгору головою (орієнтація вгору головою); виконують два випробування з інтервалом в 1 хв. Через 30 хвилин той же самий експеримент здійснюють на похилій площині під кутом 35, потім на похилій площині під кутом 40°. На цей час пацюка повертали в його клітку. Поверхню чистили після кожного випробування.

5 Виступ пацюків оцінюють чотирма різними оцінками:

Оцінка 0: немає ковзання

Оцінка 1: незначне ковзання (одна або дві лапи)

Оцінка 2: помірне ковзання (чотири лапи), але не до кінця площини

Оцінка 3: пацюк зісковзує до самого кінця площини.

10 Подальші випробування

Коли це доцільно, пацюків піддають електрофізіологічній оцінці, гістологічному вимірюванню, і рівень експресії *mp22* РНК у сідничному нерві визначається кількісно.

Кількісна оцінка *mp22* РНК у сідничному нерві за допомогою кількісної ЗТ-ПЦР

15 Сумарну РНК виділяли з лівого сідничного нервів із застосуванням Qiazol (посилання N° 79306, Qiagen GmbH, Німеччина), з наступним однокроковим способом очищення з Rneasy Mini Kit (посилання N° 74106, Qiagen GmbH, Німеччина), описаним протоколом виробника (Qiagen Rneasy Fibrous tissue Handbook). Забруднення ДНК видаляли переварюванням РНКазою, вільною від ДНКаз I, застосовуючи набір DNA-free kit (Qiagen-rnase-free dnase set 1500 Kunits, вих. N° 1023460).

20 Концентрацію РНК оцінюють Nanodrop ND-1000, і тест контролю якості проводили Agilent РНК 6000 nano chips на Agilent 2100 Bioanalyzer.

Зворотна транскрипція й ПЦР у реальному часі: Кількісну ЗТ-ПЦР (RT-Q-PCR) проводили в такий спосіб: 80 нг сумарної РНК назад транскрибували із застосуванням Superscript™ II зворотної транскриптази (Invitrogen, Carlsbad, Каліфорнія) з оліго (dt) 12-18 (Invitrogen, Carlsbad, Каліфорнія) у реакційному обсязі 20 мкл.

25 ПЦР у реальному часі проводять із системою швидкого термічного циклера (Lightcycler® 480II, 384- Well, Roche, Швейцарія). Ампліфікацію здійснюють у загальному об'ємі 10 мкл із оптимізованою концентрацією праймерів від 130 нМ до 1 мкМ. Праймери й шаблон доповнюють Lightcycler® 480 SYBR Green I Майстер (2× Конц. Roche, Cat. Посилання N° 04887352001). Нуклеотиди, MgCl<sub>2</sub>, Таq-ДНК-полімераза й буфер включені в суміш. Протокол ампліфікації включає первісну інкубацію при 95 °С протягом 10 хв. для активації Таq ДНК-полімерази з наступними 45 циклами, з денатурацією при 95 °С протягом 10 сек, відпалом при 60 °С протягом 40 сек і розширенням при 72 °С протягом 10 сек (виявлення флуоресцентного продукту виконували наприкінці періоду розширення при 72 °С у режимі одиночної реєстрації) і закінчували циклом кривої плавлення з денатурацією при 95 °С протягом 5 сек, відпалом при 35 63 °С протягом 60 сек при 95 °С (від 63 °С до 95 °С швидкість зміни становить 0,11 °С/сек і виявлення флуоресцентних продуктів проходило безупинно). Для підтвердження специфічності ампліфікації ПЦР-продукт із кожної пари праймерів піддавали аналізу кривої плавлення. Відносну кількісну оцінку виконували на основі точки перетинання (значення C<sub>p</sub>) для кожного зі зразків ПЦР. Точка, у якій флуоресценція зразка піднімається вище фонові флуоресценції, називається "точкою перетинання (C<sub>p</sub>) зразка". Ген Myelin Protein Zero (MPZ) з пацюка *Rattus norvegicus* застосовували для нормалізації (Середа та ін., 2006). Послідовності праймерів (синтезованих Eurofins MWG Operon, Німеччина), які застосовувались для К-ЗТ-ПЦР аналізу, відповідають:

45 РMP22 - вперед: 5'-TGTAACACATCCGCCTTGG-3' (SEQ ID NO:11) і

РMP22 - назад: 5'-GAGCTGGCAGAAGAAGAGGAAC-3' (SEQ ID NO:12).

MPZ - вперед: 5'-TGTTGCTGCTGTTGCTCTTC-3' (SEQ ID NO:13) і

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

Результати

50 Композиція суміші 1 поліпшує успішність тесту з поперечиною протягом процедури лікування (Фігура 4).

Суміш 1 поліпшує оцінку ходи трансгенних пацюків через 3 і 6 тижнів лікування, як показано на Фігурі 5.

55 Суміш 1 збільшує успішність трансгенних пацюків через 3, 6, 9 і 12 тижнів лікування в тесті похилої площини при 25, описані на Фігурі 6.

Фігура 7 ілюструє позитивний вплив суміші 2 на оцінку ходи трансгенних пацюків при 25, 35 і 40° у тесті похилої площини.

Суміш 7 (доза 3) значно зменшує експресію генів *mp22* РНК у сідничному нерві трансгенних пацюків РMP22 (Фігура 9).

60 Успішність пацюків РMP22, які одержували суміш 7 (дозу 2 і дозу 3), поліпшується в тесті

похилої площини при 35° (Фігура 10). Більш конкретно, 29 і 33 % пацюків належать до групи гарної успішності, у порівнянні з 5 % для групи Tg-плацебо, і 29 і 11 % пацюків належать групи з поганими результатами, у порівнянні з 60 % у групі Tg-плацебо. Р-значення (у порівнянні з Tg-плацебо) становить 0,0152 для Tg-пацюків, які одержували суміш 7 - дозу 2, і р-значення становить 0,002 для Tg-пацюків, які одержували суміш 7 - дозу 3, (у порівнянні з Tg-плацебо).

Суміш 7 - доза 3 значно збільшує час затримки падіння пацюків РМР22 у тесті з поперечиною після 9 тижнів лікування (Фігура 11): чорна пунктирна лінія,  $p = 4,56 \cdot 10^{-2}$ ,  $n = 18$ . Значна різниця також спостерігається між пацюками Tg-плацебо (звичайна чорна лінія,  $n = 20$ ) і Wt-пацюків плацебо (звичайна сіра лінія,  $p = 3,82 \cdot 10^{-7}$ ,  $n = 18$ ).

Фігура 12 ілюструє поліпшення сили захоплення пацюків РМР22, що одержували суміш 7 - дозу 3.

Фігура 13 показує значну кореляцію між часом затримки тесту з поперечиною (після 9 тижнів лікування сумішшю 7 - дозою 3) і рівнем експресії rmp22 РНК.

Фігура 14 відображає значну кореляцію між часом затримки тесту з поперечиною після 9 тижнів лікування сумішшю 7 - дозою 3 і швидкістю проведення чутливого нерва (хвіст).

Аналогічні результати одержують і для інших комбінацій (див. таблицю 3).

Таблиця 3

Комбінація	Фенотип у РМР22 пацюків
Суміш 1	Поліпшення
Суміш 2	Поліпшення
Суміш 3	Поліпшення
Суміш 4	поліпшення
Суміш 5	поліпшення
Суміш 6	поліпшення

Ці дані показують, що в природних умовах комбінації й схеми даного винаходу дозволяють ефективно лікувати ШМТ.

D. Ефект у моделі токсичної нейропатії в природних умовах

Медикаментозні лікування або схеми вводять перорально, починаючи за день до першого внутрішньоочеревинного введення 3 мг/кг оксаліплатину (D-1), до передостаннього дня випробувань (D16). Тварини, які належать до групи, що одержувала оксаліплатин, одержують щодня дозу дистильованої води (10 мл/кг). Тваринам вводять дозу досліджуваних лікувальних препаратів і дистильованої води щодня ранком, у той час як оксаліплатин вводять у другій половині дня.

Під час днів тестування (наприклад, D1, D4, D10) лікувальні препарати й дистильовану воду вводять після тесту. Що стосується дня тестування (D4), який включає введення сполук і засобів доставки й ін'єкцію оксаліплатину, лікувальні препарати й дистильовану воду вводять до введення оксаліплатину після тесту. Тварини із групи порівняння одержують дозу тільки під час днів тестування (тобто, D1, D4, D10 і D17).

Холодова алодинія оцінюється вимірюванням відповідей на теплову неноцицептивну стимуляцію (ацетоновий тест) на день D1 (близько 24 год після першого введення оксаліплатину 3 мг/кг (гострий ефект оксаліплатину), на день D4 і D10 (хронічний ефект оксаліплатину) і на день D17 (залишковий ефект оксаліплатину через тиждень після завершення лікування).

Тестування роблять за допомогою ацетонового тесту через 2 години після введення речовини порівняння. Речовиною порівняння є габапентин, 100 мг/кг, перорально (один раз на день,  $\times 4$  тестових дні).

Ацетоновий тест

Холодова алодинія оцінюється за допомогою ацетонового тесту. У цьому тесті затримку приймання задньої лапи вимірюють після нанесення краплі ацетону на підошовну поверхню обох задніх лап (час реакції) і оцінюють інтенсивність відповіді (холодова оцінка).

Час реакції на охолодний ефект ацетону вимірюють протягом 20 сек (відключення) після застосування ацетону. Відповіді на ацетон також оцінюють за наступною 4-бальною шкалою: 0 (немає відповіді), 1 (швидке зняття, змах лапи), 2 (повільне зняття або відзначене струшування з лапи), 3 (повторюване струшування з лапи з лизанням або кусанням).

Виконують шість досліджень на пацюках. Для кожної експериментальної групи результати виражають у вигляді кумулятивної оцінки холоду, обумовленої, як сума шести балів для кожного пацюка разом  $\pm$  SEM. Мінімальна кількість балів становить 0 (немає відповіді на кожне з 6

випробувань), і максимально можливий бал становить 18 (повторне струшування й лизання або кусання лапи в кожному із шести досліджень).

Джерело габапентину: Zhejiang Chiral Medicine Chemicals, Китай

Джерело оксаліплатину: Sigma, Франція

5 Результати наведено на Фігурі 8. Вони ясно показують захисний ефект композиції даного винаходу на оксаліплатин-індуковану невропатію.

Е. Ефект на моделі ALS in vivo

Тваринна модель

10 Щурячу модель SOD1<sup>G93A</sup> (отримана Howland і ін.) вибрали для імітації патології латерального аміотрофічного склерозу. Дана модель гіперекспресувала мутований ген SOD1 гена в спинному мозку, багатьох ділянках мозку, а також периферійних тканинах. Початок захворювання рухових нейронів даної моделі відповідає строку близько 115 днів, воно проявляється в ненормальній ході задніх кінцівок. Через кілька днів виникає параліч задніх кінцівок.

15 Експериментальні процедури

Колонії одержували схрещуванням пацюків SOD1<sup>G93A</sup> із самками пацюків Sprague Dawley. Гетерозиготні пацюки SOD1<sup>G93A</sup> ідентифікували полімеразною ланцюговою реакцією (ПЦР) хвоста ДНК із праймерами, специфічними для hSOD1 [1]. Тварин утримували в кімнаті з регульованим освітленням (світло з 05:00 до 19:00 год.) і температурою (23 ± 1 °C) і з вільним доступом до їжі й воді. Усі тваринні процедури в даному дослідженні проводять у відповідності зі стандартами основних принципів щодо догляду за тваринами.

Вимірювання маси тіла проводили щотижня й поведінкове тестування починали у віці 60 днів і продовжували до кінцевої точки. Лікувальні препарати вводили щодня перорально або підшкірно, починаючи з віку 5 тижнів.

25 1. Тест спостереження: характеристика загального аспекту

Кожного пацюка спостерігали в новій щурячій клітці (розміри 55 × 33 × 18 см) без підстилки протягом п'яти хвилин. Записують 5 різних параметрів:

Хода

Оцінка 0: нормальна хода (вільна)

30 Оцінка 1: ненормальна хода (ускладнена або пацюк злегка накульгує)

Оцінка 2: помірна непрацездатність (пацюк тягне лапу й може поставити її правильно і йти)

Оцінка 3: серйозна непрацездатність (пацюк тягне одну або обидві задні лапи, але не в змозі поставити її/їх правильно).

Аспект хутро

35 - Оцінка 0: чисте й шовковисте хутро

- Оцінка 1: пілоерекція або брудне хутро

Тремор

- Оцінка 0: немає тремору

- Оцінка 1: тремор

40 Положення тіла

- Оцінка 0: нормальне

- Оцінка 1: аномальне (плоске або архе спини)

Положення задніх лап

- Оцінка 0: нормальне

45 - Оцінка 1: розпластані задні лапи.

2. Руховий оцінковий тест: характеристика дефіциту руху

Цей тест оцінює здатність пацюків повертатися протягом 30 секунд, будучи поверненими на будь-яку сторону (встановлювальний рефлекс) (Gale і ін.).

Застосовували непараметричну оцінкову систему у відповідності з наступними критеріями (Matsumoto і ін., та ін. Thonhoff):

50 - Оцінка 0: пацюк не в змозі повертатися з будь-якої сторони протягом 30 секунд

- Оцінка 1: пацюк не в змозі повертатися тільки з однієї сторони протягом 30 секунд

- Оцінка 2: пацюк в стані повертатися протягом 30 секунд на обидва боки, але не може стояти в клітці; він завжди перетаскує деякі частини тіла

55 - Оцінка 3: пацюк в стані повертатися на обидва боки протягом 30 секунд, не може стояти в клітці, але не перетаскує деякі частини тіла

- Оцінка 4: пацюк в стані повертатися протягом 30 секунд на обидва боки, може стояти в клітці, але має видимі функціональні дефіцити

60 - Оцінка 5: пацюк у стані повертатися протягом 30 секунд на обидва боки, може стояти в клітці й не має ніяких видимих функціональних дефіцитів.

Кінцева точка хвороби зафіксована при оцінці 0, пацюка потім присипляють.

3. Тест похилої площини : характеристика дефіциту руху

Обладнання для ковзання мало 30 × 50 см поверхню з оргскла, яку можна нахилити під кутом від 0° (горизонтальне положення) до 60°. Кожного пацюка спочатку поміщали на похилій площині під кутом 25° у позиції вгору головою (орієнтація вгору головою); виконують два випробування з інтервалом в 1 хв. 30 хвилин через той же самий експеримент здійснюють на похилій площині під кутом 35, потім на похилій площині під кутом 40°. На цей час пацюка повертали в його клітку. Поверхню чистили після кожного випробування.

Виступ пацюків оцінюють чотирма різними оцінками:

Оцінка 0: немає ковзання

Оцінка 1: незначне ковзання (одна або дві лапи)

Оцінка 2: помірне ковзання (чотири лапи), але не до кінця площини

Оцінка 3: пацюк зісковзує до самого кінця площини.

4. Тест сітки: характеристика рухової здатності в складній ситуації

Дротяна сітка була поміщена в контакт з коробкою у верхній частині (під кутом 70°) і краєм стола в нижній частині. Кожного пацюка поміщали на нижню частину сітки й мотивували, щоб піднятися, поміщаючи пацюків з його приплуду у коробці нагорі. Кожний пацюк пройшов навчання один раз на тиждень (3 дослідження).

Зареєстрований параметр відповідав затримці часу, щоб досягти верхньої частини сітки.

5. Тест відкритого поля: характеристика рухової активності

Рухову активність вимірювали в плексигласовій коробці (45 × 45 × 30 см, Acti-Track по BIOSEB, Ліон, Франція) з пучками з 16 фотоелементів, що виходять двома осями, 1 і 5 см над підлогою.

Спонтанну й дослідницьку активність кожного пацюка оцінювали протягом 3 годин.

Реєстрували 4 параметра (загальна пройдена відстань, число загальних досліджень, відсоток пройденої відстані і час, проведений в центрі відкритого поля).

Бібліографія

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

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

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

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

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

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  $\beta$ -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 alpha agonist, in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007; 24 (7): 1119-1131.

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

Constable AL, Armati PJ. DMSO induction of the leukotriene LTC<sub>4</sub> 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 1A. *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.

5 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.

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

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

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

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

20 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.

25 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 U S A*. 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.

35 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 1 A. *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.

45 Le-Niculescu H, Kurian SM, Yehyawi N, Dike C, Patel SD, Edenberg HJ, Tsuang MT, Salomon DR, Nürnberger 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 PL Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet*. 1992;1(1): 29-33.

55 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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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.

40 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).

45 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.

50 Robert F, Guennoun R, Desarnaud 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.

55 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.

60 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.

5 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.

10 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, Basse 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.

15 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 17p1 1.2 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

45 1. Застосування фармацевтичної композиції, яка містить як активні інгредієнти: (i) баклофен, (ii) D-сорбіт і (iii) сполуку, вибрану з пілокарпіну, метимазолу, міфепристону, налтрексону, рапаміцину, флурбіпрофену й кетопрофену, їх солей, енантіомерів або рацематів, і фармацевтично прийнятний наповнювач або носій, для виготовлення лікарського засобу для застосування при лікуванні Шарко-Марі-Тута або спорідненого розладу, вибраного з

50 аміотрофічного латерального склерозу, токсичної нейропатії, нейропатій, що провокуються ВІЛ, радіацією, важкими металами або станами дефіциту вітамінів, ідіопатичних нейропатій і діабетичної нейропатії.

2. Застосування за п. 1, яке **відрізняється** тим, що в ньому захворювання Шарко-Марі-Тута є СМТ1А.

55 3. Застосування за п. 1, де композиція містить баклофен, D-сорбіт і налтрексон, або їх солі, енантіомери або рацемати.

4. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що сполуки складені для згрупованого або роздільного введення, одночасно або послідовно.

60 5. Застосування за будь-яким із попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що є парентеральним застосуванням, переважно пероральним застосуванням.

6. Композиція, яка містить баклофен, D-сорбіт і налтрексон, їх енантіомери, рацемати або солі для одночасного, роздільного або послідовного введення ссавцю.
7. Застосування композиції за п. 6 для виробництва лікарського засобу для пониження експресії ртр22 в шванівських клітинах пацієнта, що страждає від хвороби Шарко-Марі-Тута або пов'язаного розладу.

5

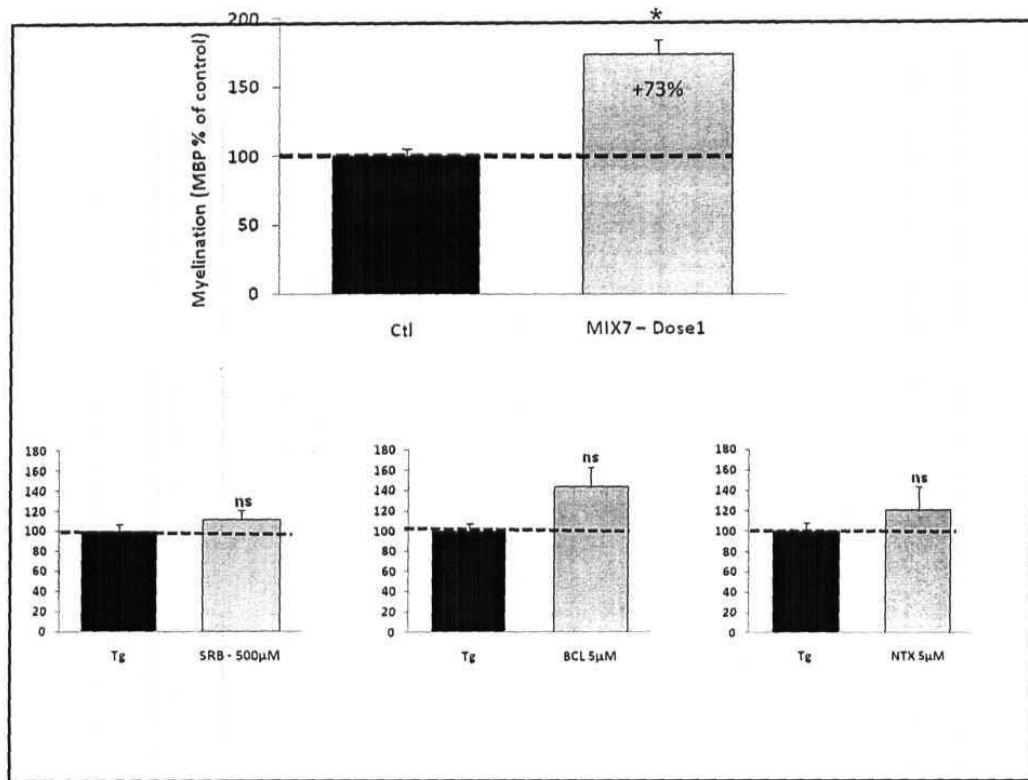


Fig. 1

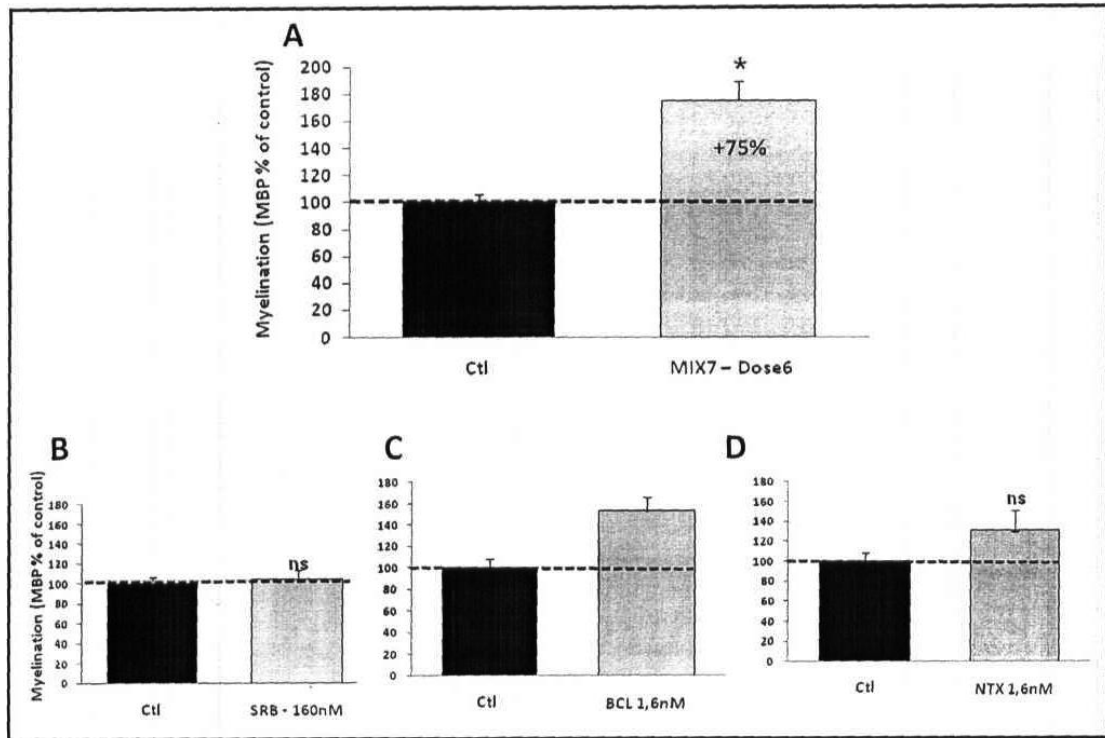


Fig. 2

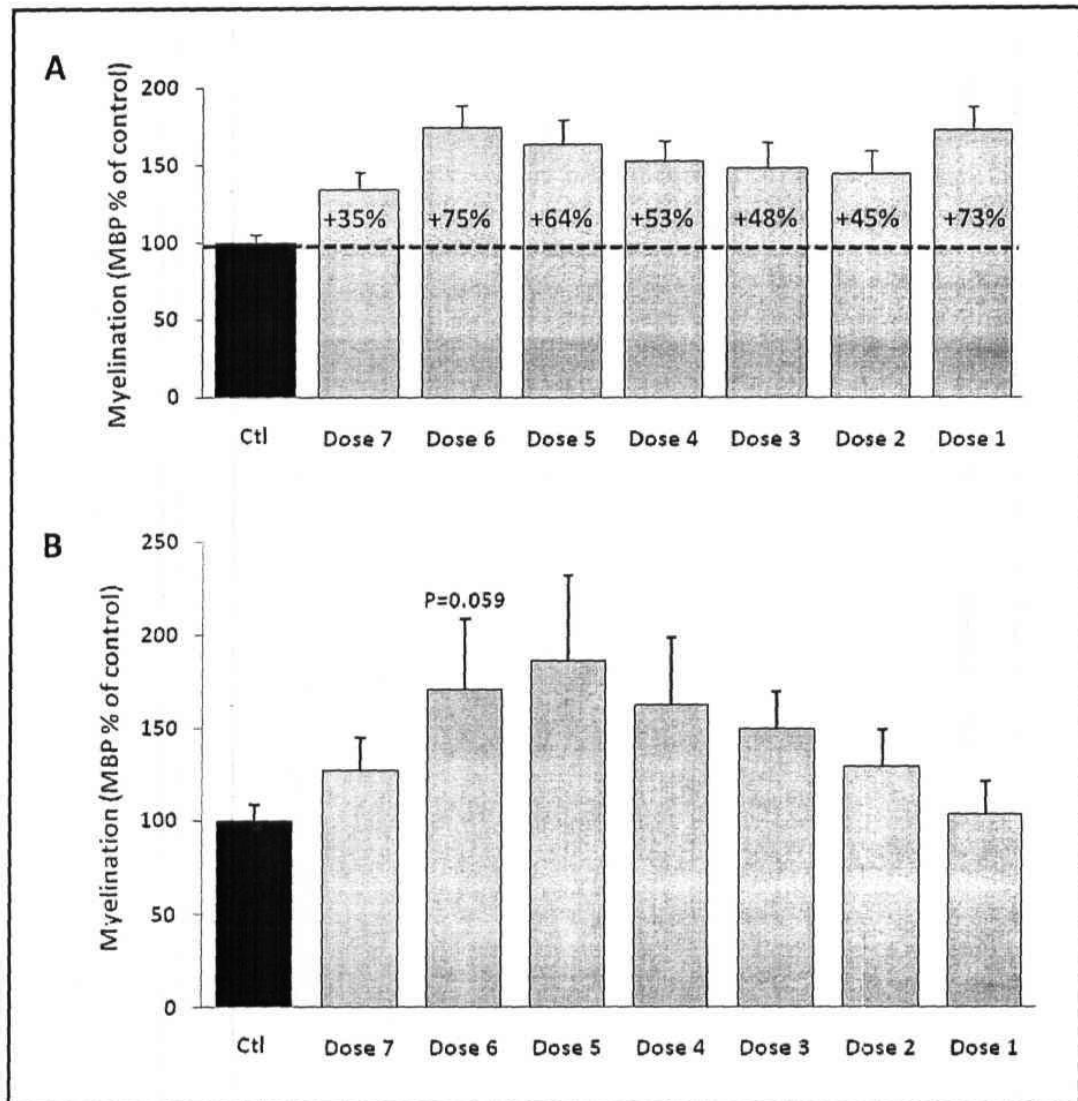


Fig. 3

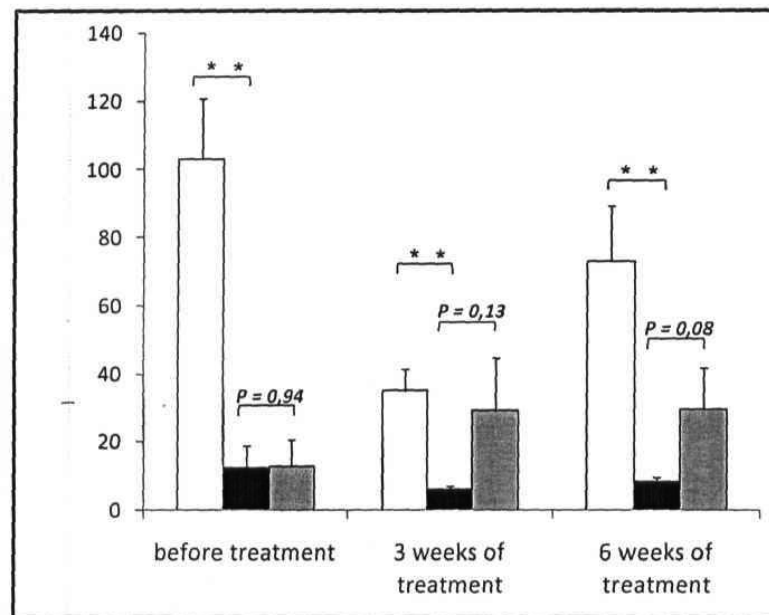


Fig. 4

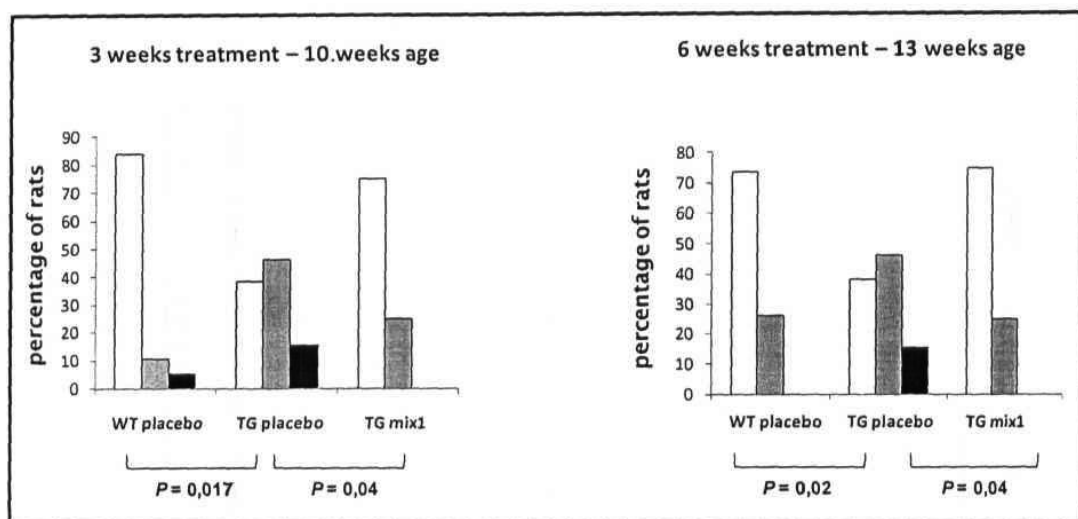


Fig. 5

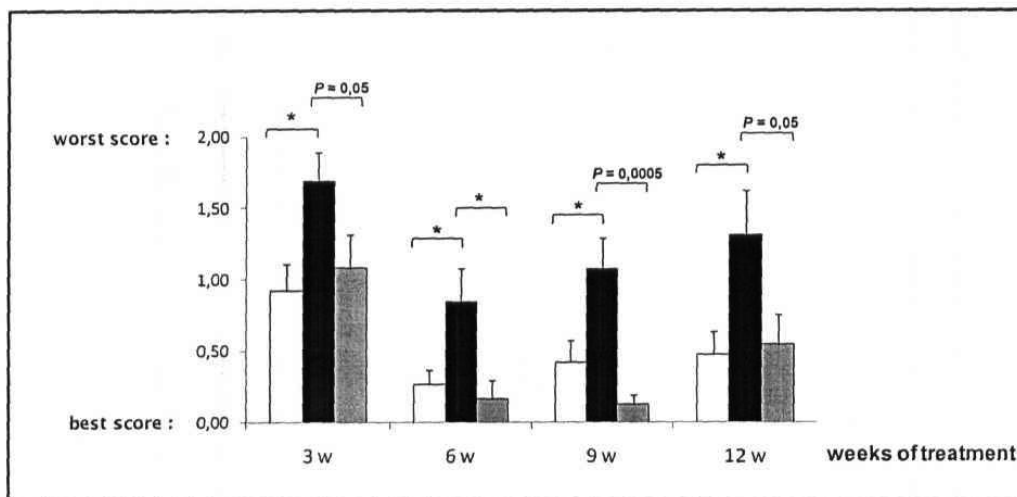


Fig. 6

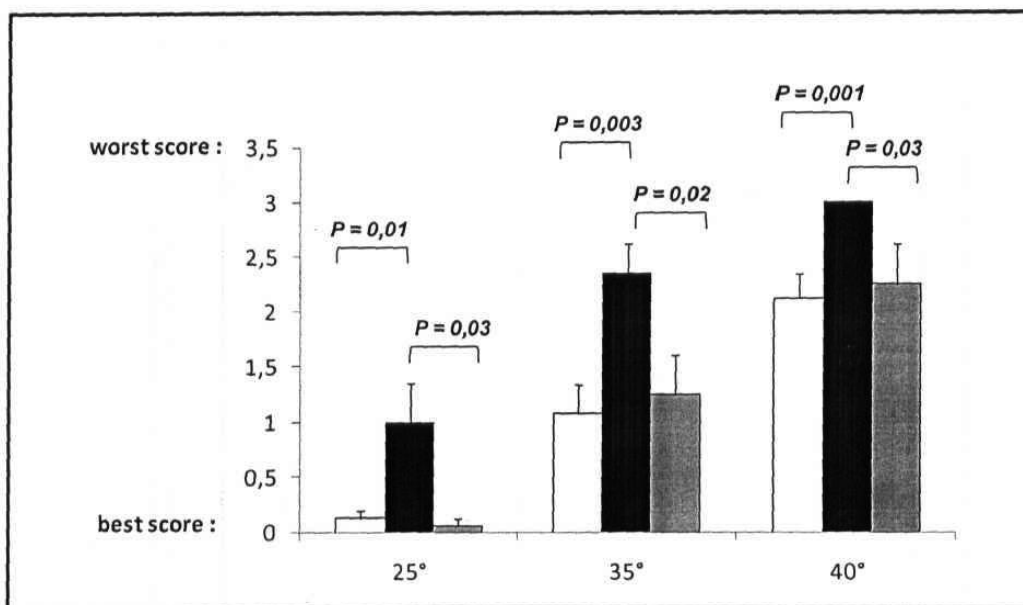


Fig. 7



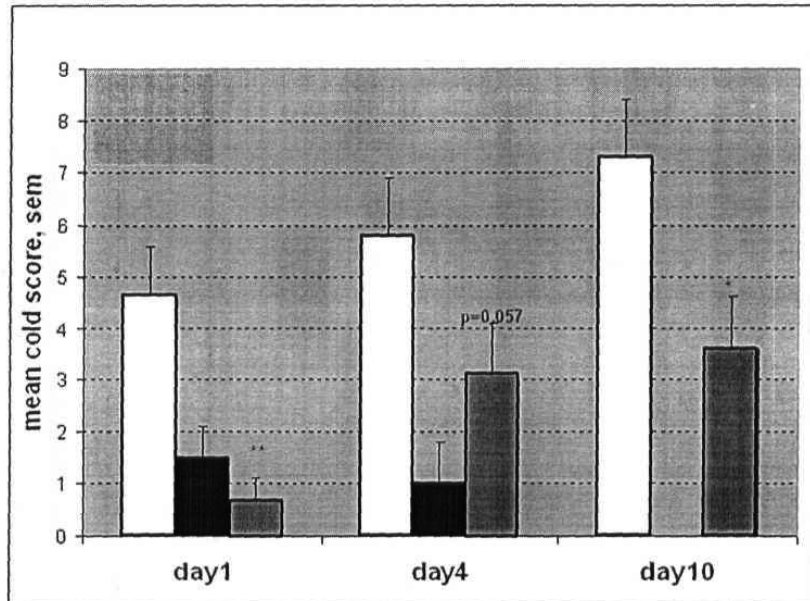


Fig. 8

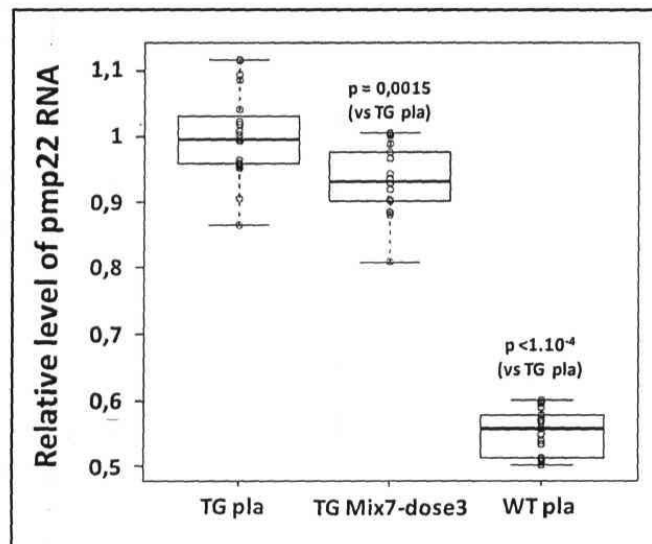


Fig. 9

Groups of performances in inclined plane test				
	Poor score	Intermediate score	Good score	p-value (vs TG placebo)
WT placebo	11%	21%	68%	0,0003
TG placebo	60%	35%	5%	-
Mix7-dose2	29%	41%	29%	0,0152
Mix7-dose3	11%	56%	33%	0,0020

Fig. 10

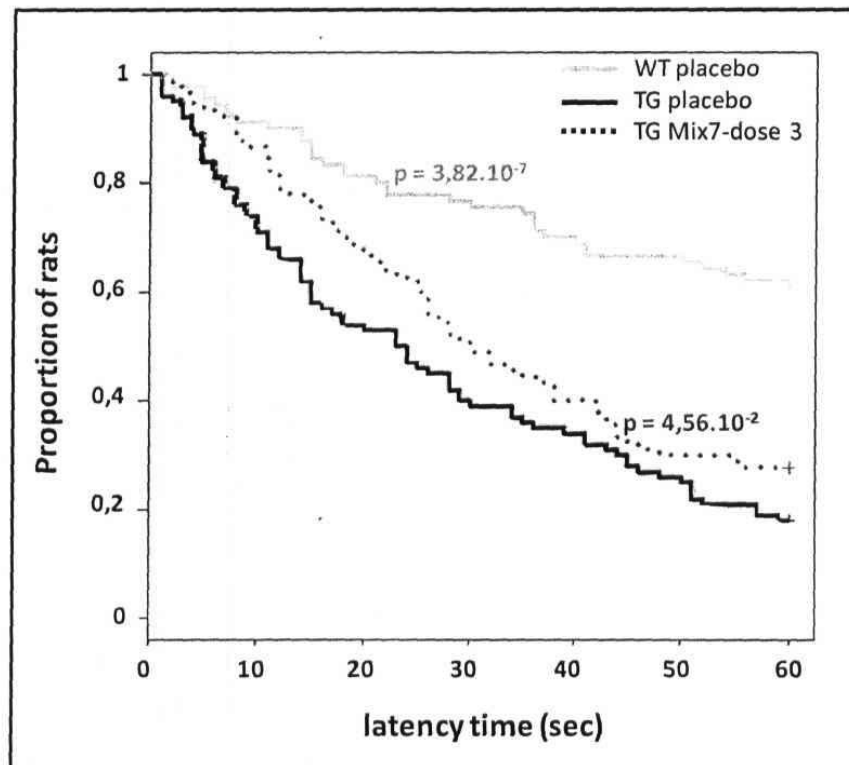


Fig. 11

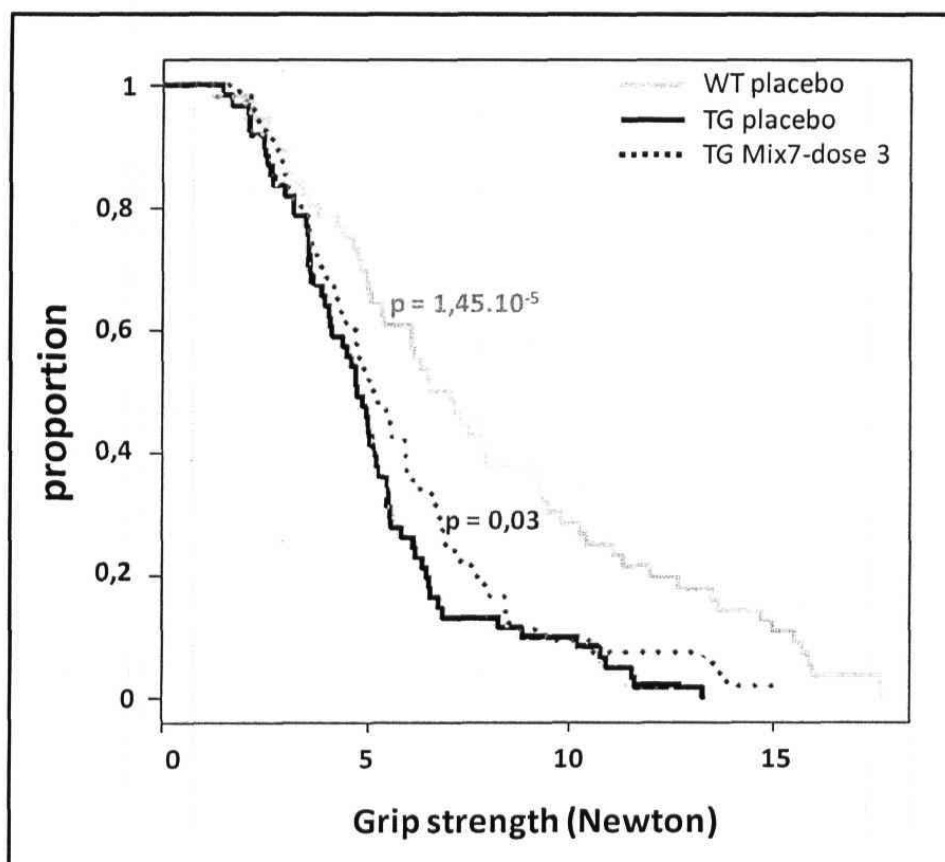


Fig. 12

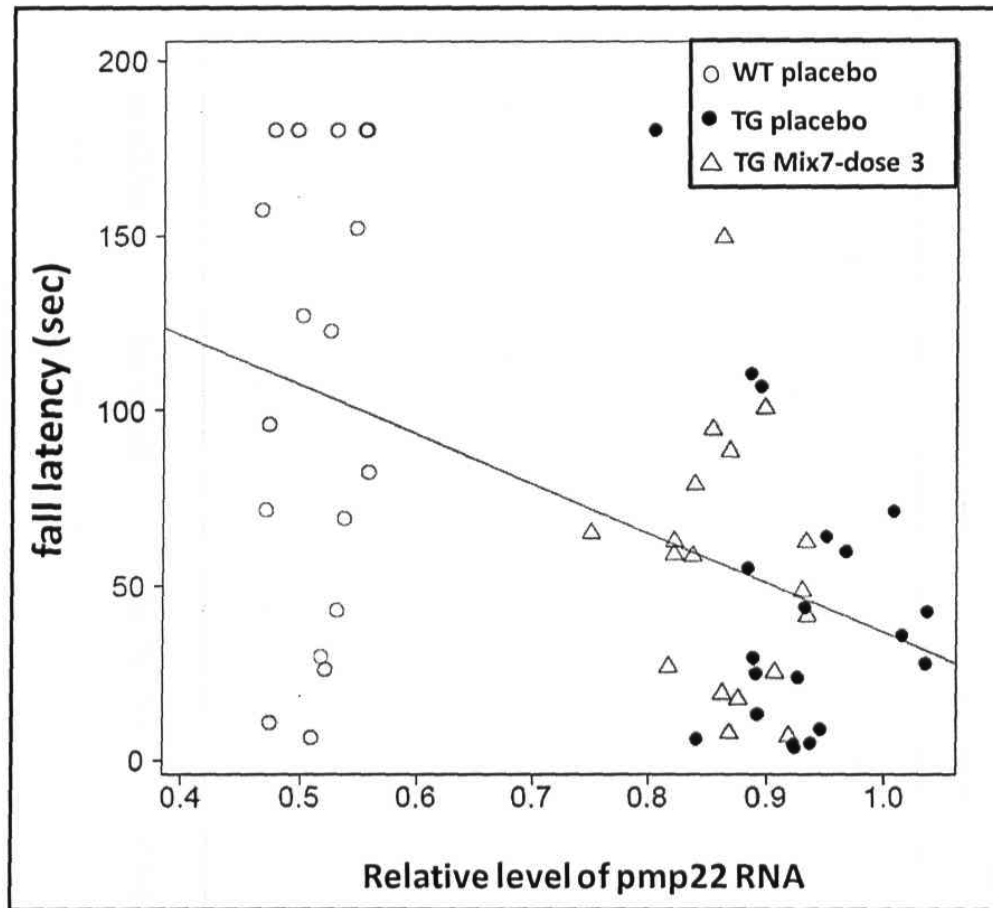


Fig. 13

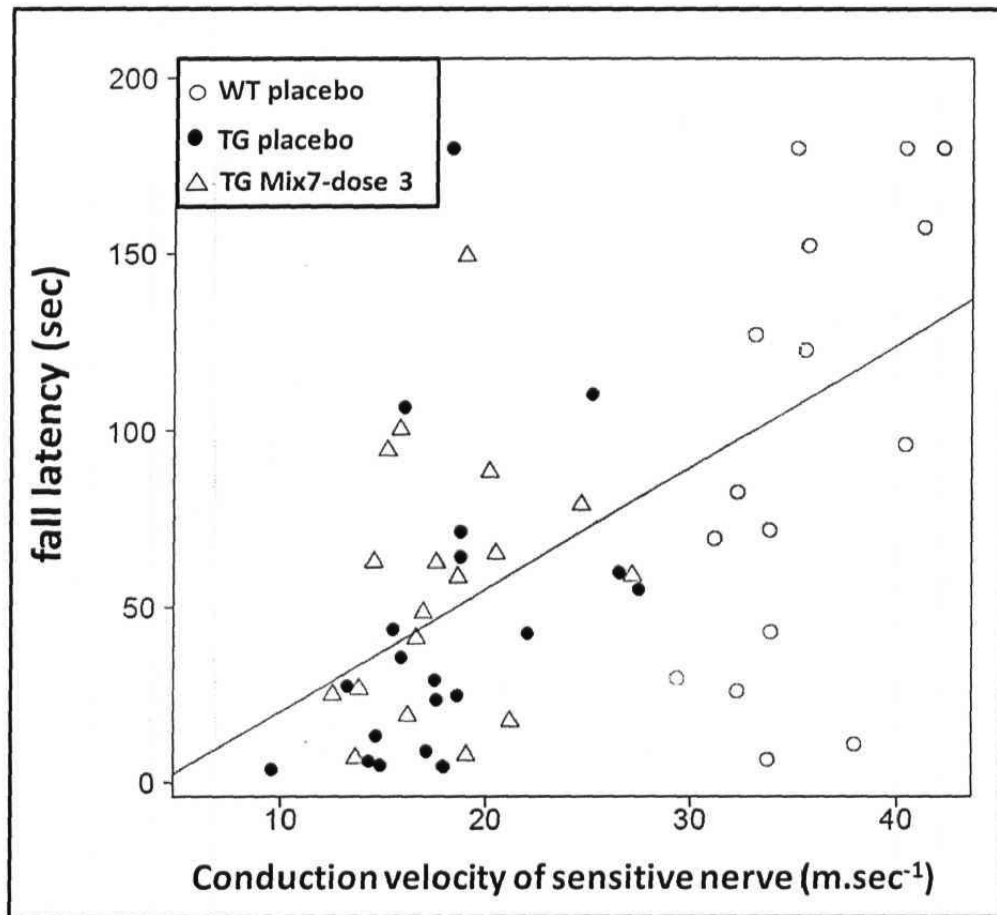


Fig. 14

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601