

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035711**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.07.29

(21) Номер заявки
201791669

(22) Дата подачи заявки
2008.11.28

(51) Int. Cl. **A61K 31/047** (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ D-СОРБИТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СМТ И СВЯЗАННЫХ С НИМ РАССТРОЙСТВ

(31) 07301614.9; 60/991,800

(32) 2007.11.30; 2007.12.03

(33) EP; US

(43) 2017.12.29

(62) 201301078; 2008.11.28

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФАРНЕКСТ (FR)

(72) Изобретатель:
**Коэн Даниель, Чумаков Илья,
Герасименко Оксана, Набирошкин
Сергей (FR)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2006117573
WO-A2-2000017358

WELCH William J. et al. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. Cell Stress & Chaperones, 1996, 1 (2), pp.109-115, особенно с. 113, кол. 2, абзацы 3-4, с. 114, кол. 1, абзац 2, кол. 2, абзац 1

(57) Изобретение относится к применению D-сорбита или его соли для лечения заболевания СМТ или связанного с ней расстройства, выбранного из наследственной нейропатии с предрасположенностью к параличу от сдавления нерва (HNPP), синдрома Дежерина-Сотта (DSS) и врожденной гипомиелинизирующей нейропатии (CHN).

B1

035711

035711

B1

Изобретение относится к композициям и способам лечения болезни Шарко-Мари-Тусса (Charcot-Marie-Tooth disease) и связанных с ней расстройств.

Болезнь Шарко-Мари-Тусса ("СМТ") представляет собой редкую генетическую периферическую полинейропатию. Поражая приблизительно 1 из 2500 индивидуумов, данное заболевание представляет собой наиболее частое наследственное поражение периферической нервной системы. Его начало обычно наступает во время первой или второй декады жизни, хотя оно может быть выявлено в раннем детстве. Течение заболевания хроническое, с постепенной нервно-мышечной дегенерацией. Заболевание является инвалидирующим со случаями сопровождающей неврологической боли и крайнего мышечного бессилия. СМТ является одной из наиболее изученных генетических патологий с приблизительно 30000 случаев во Франции. В то время как большинство пациентов, страдающих СМТ, скрывают в себе дубликацию фрагмента хромосомы 17, содержащего ген миелина: PMP22 (форма СМТ1А), в различных формах СМТ задействованы две дюжины генов. Соответственно, несмотря на моногенную первопричину, данная патология проявляет клиническую гетерогенность благодаря возможным генам модуляторам. Мутированные гены у пациентов, страдающих СМТ, образуют кластеры вокруг тесно взаимосвязанных молекулярных путей, нарушая дифференцировку шванновских клеток или нейронов или изменяя взаимодействие данных клеток в периферических нервах.

PMP22 представляет собой основной компонент миелина, экспрессируемый в компактном участке, по существу, всех миелиновых волокон в периферической нервной системе и продуцируемый преимущественно шванновскими клетками. Небольшая, 1,5-разовая сверхэкспрессия нормального белка PMP22 также наблюдается в шванновских клетках у пациентов, страдающих СМТ, гетерозиготных по дубликации (в некоторых редких случаях, СМТ1А-подобный фенотип может быть также связан со структурными мутациями в протеине PMP22) (Lupski et al., 1992; Suter et al., 1992; Roa et al., 1993; Thomas et al., 1997; Suter & Scherer, 2003; Nave & Sereda, 2007). Прямое свидетельство того, что доза аномального гена PMP22 вызывает СМТ1А-подобный фенотип, было предоставлено с помощью трансгенных экспериментов на моделях грызунов со сверхэкспрессией белка PMP22 (Niemann et al., 1999; Perea et al., 2001; Robjaglia-Schlupp et al., 2002; Meyer et al., 2006; Sereda & Nave, 2006). Более того, терапевтические воздействия онапристоном: специфическим ингибитором рецептора прогестерона (Sereda et al., 2003; Meyer zu Horste et al., 2007) и аскорбиновой кислотой (Passage et al., 2004) уменьшали данную экспрессию у трансгенных животных, улучшая или замедляя прогрессирование фенотипа заболевания.

Существующие экспериментальные данные показывают, что протеин PMP22 является не только структурным компонентом миелиновых оболочек, но также важным регуляторным протеином, влияющим на множественные фенотипические особенности шванновских клеток. Точный механизм, связывающий аномальный уровень белка с изменением его функций в СМТ1А-мутированной глиальной клетке, является не полностью понятным, но начинают появляться некоторые клеточные механизмы, потенциально объясняющие его вредные воздействия на биологию шванновской клетки.

Проработка общедоступных данных, описывающих молекулярные механизмы и патологические проявления заболевания СМТ1А, позволили авторам изобретения отдать предпочтение некоторым функциональным клеточным модулям - транскрипционной регуляции гена PMP22, укладке/деградации белка PMP22, пролиферации и апоптозу шванновских клеток, отложению и ремоделированию экстрацеллюлярного матрикса, иммунному ответу - как потенциальным приемлемым мишеням для терапевтических воздействий, касающихся СМТ. Сочетанное влияние данных дерегулированных функциональных модулей на начало и прогрессирование патологических проявлений болезни Шарко-Мари-Тусса объясняет потенциальную эффективность комбинаторного лечения СМТ.

Вслед за начальным построением динамической модели патологии СМТ последовал отбор имеющихся на рынке характерных лекарственных средств, нацеленных на функциональную регуляцию клеточных путей, релевантных для заболевания СМТ1А.

Сущность изобретения

Целью изобретения является предоставление новых терапевтических подходов в лечении СМТ и связанных с ней расстройств.

Авторы изобретения идентифицировали различные пути, которые можно регулировать у больного для улучшения СМТ и связанных с ней расстройств. Авторы изобретения также получили несколько лекарственных средств, которые, в комбинации (комбинациях) или отдельно, могут эффективно влиять на такие пути, приводящие к развитию СМТ и связанных с ней расстройств, и представили новую терапию для лечения данных нарушений.

Более конкретно, цель данного изобретения относится к применению D-сорбита или его соли в качестве активного агента для получения композиции для лечения болезни Шарко-Мари-Тусса или связанного с ней расстройства, выбранного из наследственной нейропатии с предрасположенностью к параличу от сдавления нерва (HNPP), синдрома Дежерина-Сотта (DSS) и врожденной гипомиелинизирующей нейропатии (CHN).

Изобретение может быть применено для лечения СМТ или связанных с ней расстройств у любых млекопитающих, в частности людей, страдающих, более предпочтительно, СМТ1а.

Подписи к фигурам

- Фиг. 1 - воздействие выбранных лекарственных средств на уровень экспрессии PMP22 мРНК;
 фиг. 2 - воздействие выбранных лекарственных средств на уровень экспрессии PMP22 мРНК;
 фиг. 3 - воздействие выбранных лекарственных средств в различных дозах на уровень экспрессии PMP22 мРНК;
 фиг. 4 - воздействие выбранных лекарственных средств на уровень экспрессии белка PMP22;
 фиг. 5 - воздействие комбинации Пилокарпина и Налтрексона на уровень экспрессии белка PMP22;
 фиг. 6 - результаты оценки движения самок крыс в Ваг-тесте на всем протяжении изучения вида лечения, представленные в форме трендов (направлений). А: Метимазол; В: Пилокарпин;
 фиг. 7 - среднее значение показателей работоспособности ваг-теста, зарегистрированное в данном тесте после 16 недель лечения. А: Метимазол; В: Пилокарпин;
 фиг. 8 - электрофизиологическое определение амплитуды потенциалов чувствительного нерва у крыс, страдающих СМТ, пролеченных лекарственными средствами в течение 20 недель. А: Метимазол; В: Пилокарпин.

Подробное описание изобретения

Изобретение предоставляет новые терапевтические подходы для лечения СМТ или связанных с ней расстройств. Изобретение раскрывает новое применение лекарственных средств или комбинаций лекарственных средств, которые позволяют эффективно корректировать такие заболевания и может быть применено для любого млекопитающего.

В контексте настоящего изобретения термин "расстройства, связанные с СМТ" обозначает другие заболевания, связанные с аномальной экспрессией протеинов миелина, которые включают PMP22. Многообразие данных заболеваний обусловлено многообразием ролей PMP22.

PMP22 является, прежде всего, основным компонентом миелина, экспрессируемым в компактном участке, по существу, всех миелиновых волокон периферической нервной системы. Протеин PMP22 взаимодействует с другим структурным протеином P0 миелина, и вследствие этого, измененное соотношение протеинов PMP22/P0 может влиять на компактность миелиновых оболочек (Vallat et al., 1996; D'Urso et al., 1999). Как продемонстрировано исследованиями *in vitro*, протеин PMP22 также задействован в регуляции распределения клеток Rho-зависимым образом и, таким образом, может воздействовать на образование оболочки аксона (Brancolini et al., 1999). Более того, PMP22 формирует комплексы с интегринином $\alpha 6 \beta 4$ и мог бы быть связующим звеном во взаимодействии шванновских клеток с экстрацеллюлярной матрицей (Amici et al., 2006; Amici et al., 2007). Более того, повышенный уровень белка PMP22 может изменять *Argf6*-регулируемый плазмемно-мембранный эндосомальный путь рециркуляции и приводить к накоплению PMP22 в поздних эндосомах (Chies et al., 2003). Было также продемонстрировано, что сверхэкспрессируемый протеин PMP22 нарушает сортировку внутриклеточного белка и перегружает механизм деградации белка в шванновских клетках (Notterpek et al., 1997; Tobler et al., 2002; Fortun et al., 2003; Fortun et al., 2006; Fortun et al., 2007; Khajavi et al., 2007). В результате, PMP22 непосредственно задействован в регулировании клеточной пролиферации и запрограммированной смерти клеток (Sancho et al., 2001; Atanasoski et al., 2002), и было показано, что мутантный протеин PMP22 вызывает значительную реорганизацию и aberrantную экспрессию аксональных ионных каналов (Ulzheimer et al., 2004; Devaux & Scheraga, 2005). PMP22 также экспрессируется в некоторых частях головного мозга человека (Ohsawa Y. et al., 2006). Очевидна его роль в нарушениях настроения (Le-Niculescu H. et al., 2008) и в шизофрении (Dracheva S. et al., 2006). PMP22 играет роль в создании гематоэнцефалитического барьера (Roux K.J. et al., 2004), который часто поврежден при рассеянном склерозе и нейродегенеративных заболеваниях.

Следовательно, термин "расстройство, связанное с СМТ" обозначает Болезнь Альцгеймера (AD), сенильную деменцию типа AD (SDAT), Болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, сосудистую деменцию, аутизм, умеренные когнитивные нарушения (MCI), возрастное нарушение памяти (AAMI) и проблему, связанную со старением, постэнцефалитический Паркинсонизм, шизофрению, депрессию, биполярное заболевание и другие нарушения настроения, заболевание Гентингтона, заболевания двигательных нейронов, включая боковой амиотрофический склероз (ALS), рассеянный склероз, идиопатические нейропатии, диабетическую нейропатию, токсическую нейропатию, включая нейропатию, индуцированную лечением лекарственными средствами, нейропатии, вызванные ВИЧ, радиацией, тяжелыми металлами и состояниями дефицита витаминов, прионовые нейродегенерации, включая болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD), губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота (BSE), GSS, FFI, синдром Куру и синдром Альперса.

В предпочтительном варианте осуществления расстройства, связанное с СМТ, обозначает нейропатию, такую как демиелинизирующие нейропатии, включая HNPP (наследственная нейропатия с предрасположенностью к параличу от сдавления нерва), CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1X, CMT2A, CMT2B, CMT2D, CMT2E, CMT2-P0, тяжелые демиелинизирующие нейропатии DSS (синдром Дежерина-Сотта), СНТ (врожденная гипомиелинизирующая нейропатия), CMT4A, CMT4B1, CMT4B2, CMT4D, CMT4F, CMT4, AR-CMT2A, HSN1.

Как используется в данной заявке, "лечение" расстройства включает терапию, предотвращение, про-

филактику, торможение развития или уменьшение боли, обусловленной расстройством. Термин лечение включает, в частности, регулирование прогрессирования заболевания и сопровождающих симптомов.

Также термин "соединение" обозначает химические соединения, как конкретно названо в заявке, а также любую фармацевтическую композицию с приемлемой солью, гидратом, сложным эфиром, эфиром, изомерами, рацематами, конъюгатами, пролекарствами лекарственных средств.

Термин "антитело" обозначает моноклональное или поликлональное антитело. Термин фрагмент обозначает, без ограничения, цепь иммуноглобулина, Fab- или Fab'-фрагмент, или участок CDR. Производное антитела включает одноцепочечное антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело и т.д. Фрагменты антитела или производные будут сохранять эпитопную специфичность антитела.

Также термин "комбинация" обозначает лечение, в котором по меньшей мере два лекарственных средства вводятся пациенту совместно, чтобы вызвать биологический эффект. В комбинированной терапии по меньшей мере два лекарственных средства могут быть введены вместе или раздельно, в одно и то же время или последовательно. Также по меньшей мере два лекарственных средства могут быть введены через различные пути введения и протоколы.

Изобретение показывает, что функциональность белка (протеинов) периферического миелина может быть модулирована с помощью лекарственных средств, воздействующих на мускариновые рецепторы, ГАМК-В-рецепторы, рецепторы стероидных гормонов, опиоидные рецепторы, сорбитовые сигнальные пути или активацию ERK (киназу, регулирующую внутриклеточные сигналы), ингибиторов ЦОГ, ингибиторов передачи сигналов тиреоидными гормонами и/или ингибирующих pAkt-киназу, позволяя тем самым разработать новые терапевтические подходы лечения СМТ и связанных с ней расстройств.

Более того, изобретение раскрывает идентификацию и активность конкретных лекарственных средств, которые либо в комбинации (комбинациях), либо отдельно, модулируют вышеуказанные пути и могут быть применены в лечении указанных заболеваний.

Более конкретно, изобретение показывает, что соединение А (D-сорбит) может быть применено в лечении СМТ или связанных с ней расстройств.

D-Сорбит (соединение А).

Данное лекарственное средство, $C_6H_{14}O_6$, является компонентом промывания мочевого пузыря, слабительных и гиперосмотических классов.

Оно было одобрено для применения: i) при промывании мочевого пузыря (у взрослых) для предупреждения инфекции при оперативном вмешательстве на предстательной железе или оперативных вмешательствах на других отделах мочевыводящих путей; ii) отравлениях (у взрослых), когда его смешивают с активированным углем; и iii) при запорах (у взрослых), действуя как гиперосмотическое слабительное: оно действует посредством задержки жидкости в толстой кишке, что помогает усилить деятельность мускулатуры кишечника.

Намеченный метаболический путь при заболевании СМТ1А.

Киназа, регулирующая внутриклеточные сигналы (ERK) и Akt-пути, регулирует экспрессию гена PMP22 противоположным образом: транскрипция гена PMP22 повышается посредством активированного PI3K/pAkt/GSK-3 β -сигнального пути и подавляется посредством Ras/MEK/ERK-киназного каскада. Соединение А способно активировать киназы ERK/JNK/p38 и, вероятно, уменьшает экспрессию гена PMP22 посредством модулирования активности ERK-киназы (Bogoyevitch et al., 1995; Galvez et al., 2003).

Неправильно упакованные в результате сверхэкспрессии гена PMP22 агрегаты белка PMP22 являются неотъемлемым фенотипическим признаком СМТ1А шванновских клеток и могут воздействовать на динамику внутриклеточной мембраны, сортировку и деградацию белка. Таким образом, D-Сорбит, как клеточный осмолитик, который обладает шапероновой активностью, может дополнительно подавлять пагубное воздействие сверхэкспрессируемого гена PMP22 благодаря нарастающей производительности внутриклеточного механизма, связанного с укладкой и клиренсом белка (Fortun et al., 2005; Fortun et al., 2006; Welch & Brown, 1996).

Соединение А может также оказывать усиленное воздействие посредством стимуляции мускариновых рецепторов 2 типа, с которыми соединение А специфически связывается. Это приводит к уменьшению экспрессии PMP22.

В результате, соединение А подавляет апоптоз и окислительный стресс посредством ингибирования обратной связи альдоредуктазного пути. D-Сорбит продуцируется в альдозоредуктажном метаболическом пути. Ослабление гена альдоредуктазы подавляет апоптоз и окислительный стресс в клетках крыс (Nambu H et al., 2008).

Как обсуждалось выше, изобретение дополнительно демонстрирует, что конкретные клеточные пути могут быть модулированы для эффективного лечения СМТ или связанных с ней расстройств. Более конкретно, изобретение демонстрирует, что функциональность PMP22, которая включает его экспрессию, укладку или транспортировку или белка (протеинов) периферического миелина может быть модулирована с помощью лекарственных средств, воздействующих на мускариновые рецепторы, ГАМК-В-рецепторы, рецепторы стероидных гормонов, опиоидные рецепторы, сорбитовые сигнальные пути, сигнальный путь тиреоидных гормонов или активирующих ERK (киназа, регулирующая внутриклеточные сигналы) или ингибирующих pAkt-киназу и/или ингибиторы ЦОГ, позволяя, тем самым, разрабатывать

новые терапевтические подходы лечения СМТ и связанных с ней расстройств. Такие пути могут быть модулированы либо самостоятельно, либо в комбинации, чтобы предоставить наилучший возможный терапевтический эффект.

В соответствии с изобретением терапия может быть представлена в виде комбинации лекарственных средств или отдельно и/или в сочетании с любой другой терапией. И она может быть предоставлена дома, в кабинете врача, в клинике, в амбулаторном отделении больницы или в больнице, так что врач может внимательно наблюдать за терапевтическими эффектами и может внести любые необходимые коррективы.

Длительность терапии зависит от стадии заболевания, подлежащего лечению, возраста и состояния пациента и того, как пациент реагирует на лечение.

Дополнительно, человек, имеющий больший риск развития дополнительного нейропатического расстройства (например, человек, генетически предрасположенный или страдающий, например, диабетом, или находящийся на лечении онкологического состояния, и т.д.) может получать профилактическое лечение, чтобы облегчить или отсрочить возможную нейропатическую реакцию.

Дозировка, частота и способ введения каждого компонента комбинации могут регулироваться независимо друг от друга. Например, одно лекарственное средство может быть введено перорально, в то время как второе лекарственное средство может быть введено внутримышечно. Комбинированная терапия может быть проведена периодически циклами, которые включают периоды покоя, так что организм пациента имеет возможность восстановиться после любых пока еще непредвиденных побочных эффектов. Лекарственные средства также могут быть приготовлены в одной готовой форме, так что одно введение доставляет оба лекарственных средства.

Получение готовой формы фармацевтических композиций.

Введение каждого лекарственного средства комбинации может проводиться с помощью любого подходящего средства, которое обуславливает достижение концентрации лекарственного средства, который в сочетании с другим компонентом способен корректировать действие повышенной экспрессии РМР22 при проникновении в периферические нервы.

Несмотря на то что возможно введение активных ингредиентов в комбинации в виде чистого химического вещества, предпочтительно иметь их в виде фармацевтической композиции, упоминаемой, также, в данном контексте как фармацевтическая готовая форма. Возможные композиции включают композиции, пригодные для перорального, ректального, местного (включая чрескожное, трансбуккальное и сублингвальное) или парентерального (включая подкожное, внутримышечное, внутривенное и внутрикожное) введения.

Более часто данные фармацевтические готовые формы предписываются пациенту в "пакетах для пациента", заключающих в себе ряд дозаторов или других средств для введения отмеренных стандартных доз для применения во время определенного периода лечения в одной упаковке, обычно в блистерной упаковке. Пакеты для пациента имеют преимущество над традиционными рекомендациями, когда фармацевт отделяет снабжение пациента лекарственным средством от оптового снабжения, в том, что пациент всегда имеет доступ к листовке-вкладышу в упаковке с информацией о лекарственном средстве, содержащейся в пакете для пациента, обычно отсутствующей в традиционных рекомендациях. Было показано, что вкладывание листовки-вкладыша в упаковку с информацией о лекарственном средстве повышает согласие пациента с врачебными указаниями. Таким образом, изобретение дополнительно включает фармацевтическую готовую форму, как ранее описано в данной заявке, в комбинации с упаковочным материалом, пригодным для указанных готовых форм. В таком пакете для пациента о предполагаемом использовании готовой формы для комбинированного лечения можно судить по инструкциям, оборудованию, запасам, переводам и/или другим средствам для содействия наиболее приемлемому применению готовой формы для лечения. Такие меры делают пакет для пациента особенно пригодным и приспособленным для применения для лечения комбинацией настоящего изобретения.

Лекарственное средство может содержаться в любом подходящем количестве в любом пригодном веществе-носителе, и оно может присутствовать в количестве 1-99 мас.% от общей массы композиции. Композиция может быть предоставлена в лекарственной форме, пригодной для перорального, парентерального (например, внутривенно, внутримышечно), ректального, кожного, назального, вагинального, ингаляционного, кожного (пластырь), или глазного пути введения. Таким образом, композиция может быть в форме, например, таблеток, капсул, пилюль, порошков, гранул, суспензий, эмульсий, растворов, гелей, включая гидрогели, пасты, мази, кремы, пластыри, примочки, осмотические устройства доставки, суппозитории, клизмы, инъекционные формы, имплантаты, спреи или аэрозоли.

Фармацевтические композиции могут быть составлены в соответствии с традиционной фармацевтической практикой (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 и Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick и J.C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Новую York).

В соответствии с изобретением фармацевтические композиции могут быть составлены так, чтобы высвобождать действующее лекарственное средство главным образом непосредственно после введения или в любое заранее предопределенное время или период времени после введения.

Готовые формы с регулируемым высвобождением включают (i) готовые формы, которые создают, по существу, постоянную концентрацию лекарственного средства в организме в течение протяженного периода времени; (ii) готовые формы, которые после заранее предопределенного периода отсрочки создают, по существу, постоянную концентрацию лекарственного средства в организме в течение протяженного периода времени; (iii) готовые формы, которые обеспечивают действие лекарственного средства во время заранее предопределенного периода времени путем поддержания относительно постоянного, эффективного уровня лекарственного средства в организме с сопутствующей минимизацией нежелательных побочных эффектов, связанных с колебаниями в плазме уровня действующего лекарственного вещества; (iv) готовые формы, которые локализуют действие лекарственного средства посредством, например, пространственного размещения композиции с регулируемым высвобождением вблизи или в больной ткани или органе; и (v) готовые формы, которые нацеливают действие лекарственного средства посредством применения носителей или химических производных для доставки лекарственного средства к конкретному типу клеток-мишеней.

Введение лекарственных средств в виде готовой формы с регулируемым высвобождением является особенно предпочтительным в случаях, когда лекарственное средство, отдельно либо в комбинации, обладает: (i) узким терапевтическим индексом (т.е. разницей между концентрацией в плазме, приводящей к опасным побочным эффектам или токсическим реакциям, и концентрацией в плазме, приводящей к слабому терапевтическому воздействию; вообще, терапевтический индекс, TI, определяется как отношение медианной смертельной дозы (LD50) к медианной эффективной дозе (ED50)); (ii) узким окном всасывания в желудочно-кишечном тракте; или (iii) очень коротким биологическим периодом полувыведения, так что требуется частое введение доз в течение дня для поддержания уровня в плазме на терапевтическом уровне.

Можно рассматривать любую из ряда концепций для получения регулируемого высвобождения, при котором скорость высвобождения превосходит скорость метаболизма обсуждаемого лекарственного средства.

Регулируемое высвобождение может быть получено посредством подходящего отбора различных параметров и ингредиентов готовой формы, включая, например, различных типов композиций с регулируемым высвобождением и покрытий. Таким образом, лекарственное средство составляют с подходящими вспомогательными веществами в фармацевтическую композицию, которая, при введении, высвобождает лекарственное средство регулируемым образом (композиции монолитной или составной таблетки или капсулы, масляные растворы, суспензии, эмульсии, микрокапсулы, микросферы, наночастицы, пластыри и липосомы).

Твердые лекарственные формы для перорального применения.

Готовые формы для перорального применения включают таблетки, содержащие действующий ингредиент (ингредиенты) в смеси с нетоксическими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Данные вспомогательные вещества могут представлять собой, например, инертные разбавители или наполнители (например, сахарозу, микрокристаллическую целлюлозу, крахмалы, включая картофельный крахмал, карбонат кальция, хлорид натрия, фосфат кальция, сульфат кальция или фосфат натрия); гранулирующие агенты и вещества для улучшения распадаемости таблеток (например, производные целлюлозы, включая микрокристаллическую целлюлозу, крахмалы, включая картофельный крахмал, кросскармелозу натрия, альгинаты, или альгиновую кислоту); связывающие агенты (например, акацию, альгиновую кислоту, альгинат натрия, желатин, крахмал, прежелатинизированный крахмал, микрокристаллическую целлюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, этилцеллюлозу, поливинилпирролидон или полиэтиленгликоль); и смазывающие агенты, вещества, способствующие скольжению, и антиадгезивы (например, стеариновую кислоту, кремнеземы, или тальк). Другие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут представлять собой окрасивающие вещества, вкусовые вещества, пластификаторы, увлажнители, буферные агенты и т.п.

Таблетки могут быть без оболочки или они могут быть покрыты посредством известных методик, необязательно для отсрочки распадаемости и всасывания в желудочно-кишечном тракте и предоставляя, тем самым, непрерывное действие на протяжении более длительного периода. Покрытие может быть приспособлено для высвобождения активного лекарственного вещества по заранее предопределенной модели (например, для добиться готовой формы с регулируемым высвобождением), или оно может быть приспособлено не высвобождать активное лекарственное вещество до прохождения в желудок (кишечно-растворимая оболочка). Покрытие может представлять собой сахарную глазурь, пленочную оболочку (например, основанную на гидроксипропилметилцеллюлозе, метилцеллюлозе, метилгидроксиэтилцеллюлозе, гидроксипропилцеллюлозе, карбоксиметилцеллюлозе, сополимерах акрилата, полиэтиленгликолях и/или поливинилпирролидоне), или кишечнорастворимую оболочку (например, основанную на сополимере метакриловой кислоты, ацетатфталате целлюлозы, фталате гидроксипропилметилцеллюлозы, ацетатсукцинате гидроксипропилметилцеллюлозы, фталате поливинилацетата, шеллаке и/или этилцеллюлозе). Может быть задействовано вещество, обеспечивающее отсрочку времени, такое как, например, глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат.

Композиции твердой таблетки могут включать покрытие, приспособленное для защиты композиции

от нежелательных химических изменений, (например, химическая деградация перед высвобождением активного лекарственного вещества). Покрытие может быть нанесено на твердую лекарственную форму таким же образом, как описано в Энциклопедии фармацевтической технологии.

Два лекарственных средства могут быть смешаны вместе в таблетку, или могут быть разделены. Например, первое лекарственное средство заключено во внутренней части таблетки, а второе лекарственное средство находится снаружи, так что значительная часть второго лекарственного средства высвобождается перед высвобождением первого лекарственного средства.

Готовые формы для перорального применения могут также быть представлены в виде жевательных таблеток, или в виде твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем (например, картофельным крахмалом, микрокристаллической целлюлозой, карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином), или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с водой или масляной средой, например жидким парафином или оливковым маслом. Порошки и гранулы могут быть изготовлены с применением ингредиентов, указанных выше под таблетками и капсулами традиционным образом.

Композиция с регулируемым высвобождением для перорального применения может, например, быть разработана для высвобождения действующего лекарственного средства посредством регулирования растворения и/или распространения действующего лекарственного вещества.

Растворение или распространение с регулируемым высвобождением могут быть достигнуты посредством подходящего покрытия таблетки, капсулы, пилюли или гранулы готовой формы лекарственных средств, или посредством включения лекарственного средства в подходящую матрицу. Покрытие с регулируемым высвобождением может включать одно или более вышеуказанных покрывающих веществ и/или, например, шеллак, пчелиный воск, сахарный воск, гидрированное касторовое масло, карнаубский воск, стеариловый спирт, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, глицерилпальмитостеарат, этилцеллюлозу, акриловые смолы, dl-полимолочную кислоту, ацетат-бутират целлюлозы, поливинилхлорид, поливинилацетат, винопиперидон, полиэтилен, полиметакрилат, метилметакрилат, 2-гидроксиметакрилат, метакрилатные гидрогели, 1,3-бутиленгликоль, этиленгликольметакрилат и/или полиэтиленгликоли. В матрице готовой формы с регулируемым высвобождением, вещество матрицы может также включать, например, гидратированную метилцеллюлозу, карнаубский воск и стеариловый спирт, карбонил 934, силикон, глицерилтристеарат, метилакрилат-метилметакрилат, поливинилхлорид, полиэтилен и/или галоидированный фторуглерод.

Композиция с регулируемым высвобождением, содержащая один или более лекарственных средств заявленных комбинаций, также может быть в виде плавучей таблетки или капсулы (т.е. таблетки или капсулы, которые, при пероральном введении, плавают в верхней части желудочного содержимого в течение определенного периода времени). Плавучая таблетка готовой формы лекарственного средства (лекарственных средств) может быть изготовлена посредством гранулирования смеси лекарственного средства (лекарственных средств) с вспомогательными веществами и 20-75% мас./мас, гидроколлоидов, таких как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза или гидроксипропилметилцеллюлоза.

Полученные гранулы затем могут быть сжаты в таблетки. При контакте с желудочным соком таблетка образует главным образом водонепроницаемый гелевый барьер вокруг своей поверхности. Данный гелевый барьер играет роль в поддержании плотности менее чем один, тем самым позволяя таблетке оставаться плавучей в желудочном соке.

Жидкости для перорального введения.

Порошки, дисперсные порошки или гранулы, пригодные для приготовления водной суспензии посредством добавления воды, являются удобными лекарственными формами для перорального введения. Готовые формы, такие как суспензии, предоставляют действующий ингредиент в смеси с диспергирующим или увлажняющим агентом, суспендирующим агентом и одним или более консервантами. Пригодные суспендирующие агенты представляют собой, например, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, альгинат натрия и т.п.

Композиции для парентерального введения.

Фармацевтическая композиция может также вводиться парентерально посредством инъекции, инфузии или имплантации (внутривенной, внутримышечной, подкожной или т.п.) в лекарственных формах, готовых формах или посредством пригодных устройств доставки или имплантатов, содержащих традиционные, нетоксические фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества. Готовая форма и приготовление таких композиций являются хорошо известными квалифицированным специалистам в области фармацевтической готовой формы.

Композиции для парентерального применения могут быть предоставлены в дозированных лекарственных формах (например, в ампулах с разовой дозой), или во флаконах, содержащих несколько доз, и в которые может быть добавлен пригодный консервант (смотрите ниже). Композиция может быть в виде раствора, суспензии, эмульсии, устройства для инфузии или устройства доставки для имплантации или она может быть представлена в виде сухого порошка, являющимся ресуспендированным с водой или другим пригодным носителем перед применением. Помимо действующего лекарственного средства (лекарственных средств), композиция может включать пригодные парентерально приемлемые носители

и/или вспомогательные вещества. Действующее лекарственное средство (лекарственные средства) может быть включен в микросферы, микрокапсулы, наночастицы, липосомы или др. для регулируемого высвобождения. Композиция может включать суспендирующие, солюбилизующие, стабилизирующие, pH-корректирующие агенты и/или диспергирующие агенты.

В соответствии с изобретением фармацевтические композиции могут быть в форме, пригодной для стерильной инъекции. Для приготовления такой композиции пригодное действующее лекарственное средство (лекарственные средства) растворяют или суспендируют в парентерально приемлемом жидком носителе. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые могут быть использованы, имеет место вода, причем вода, доведенная до пригодного pH посредством добавления подходящего количества соляной кислоты, гидроксида натрия или пригодного буфера, 1,3-бутандиола, раствора Рингера и изотонического раствора хлорида натрия. Водная готовая форма может также содержать один или более консервантов (например, метил, этил или n-пропил-p-гидроксибензоат). В случаях, когда один из лекарственных средств только умеренно или слабо растворим в воде, может быть добавлен улучшающий растворение или солюбилизующий агент, или растворитель может включать 10-60% мас./мас, пропиленгликоля или др.

Композиции для парентерального применения с регулируемым высвобождением могут быть в виде водных суспензий, микросфер, микрокапсул, магнитных микросфер, масляных растворов, масляных суспензий или эмульсий. В качестве альтернативы, действующее лекарственное средство (лекарственные средства) могут быть включены в биосовместимые носители, липосомы, наночастицы, имплантаты или устройства для инфузий. Веществами для применения в приготовлении микросфер и/или микрокапсул являются, например, биodeградирующие/биodeградируемые полимеры, такие как полигалактин, поли(изобутилцианоакрилат), поли(2-гидроксиэтил-L-глутамин).

Биосовместимыми носителями, которые могут быть применены при составлении парентеральной готовой формы с регулируемым высвобождением, являются углеводы (например, декстраны), протеины (например, альбумин), липопротеины или антитела. Вещества для применения в имплантатах могут быть биodeградирующими (например, полидиметилсилоксан) или биodeградирующими (например, поли(капролактон), поли(гликолевая кислота) или поли(орто сложные эфиры)).

Композиции для ректального применения.

Для ректального применения пригодные лекарственные формы для композиции включают суппозитории (типа эмульсии или суспензии) и ректальные желатиновые капсулы (растворы или суспензии). В обычной суппозиторальной готовой форме действующее лекарственное средство (лекарственные средства) комбинируют с подходящей фармацевтически приемлемой суппозиторальной основой, такой как масло какао, этерифицированные жирные кислоты, глицеринизированный желатин, и различные водорастворимые или дисперсные основы подобно полиэтиленгликолям. Могут быть включены различные добавочные вещества, усиливающие агенты или сурфактанты.

Композиции для чрескожного и местного применения.

Фармацевтические композиции могут также наноситься местно на кожу для чрескожного всасывания в лекарственных формах или готовых формах, содержащих традиционные нетоксические фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества, включая микросферы и липосомы. Готовые формы включают кремы, мази, лосьоны, линименты, гели, гидрогели, растворы, суспензии, наклейки, спреи, пасты, пластыри и другие разновидности систем доставки чрескожных лекарственных средств. Фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества могут включать эмульгирующие агенты, антиоксиданты, буферные агенты, консерванты, увлажнители, вещества, способствующие проникновению, хелатобразующие агенты, гелеобразующие агенты, мазевые основы, ароматизирующие вещества, и защищающие кожу агенты.

Эмульгирующие агенты могут представлять собой природные смолы (например, смола акации или трагакантовая камедь).

Консерванты, увлажнители, вещества, способствующие проникновению, могут представлять собой парабены, такие как метил- или пропил-p-гидроксибензоат и бензалконий-хлорид, глицерин, пропиленгликоль, мочевины и т.д.

Описанные выше фармацевтические композиции для местного кожного применения могут также применяться в связи с местным применением в части тела или в непосредственной близости к части тела, подлежащей лечению. Композиции могут быть приспособлены для непосредственного нанесения или для нанесения посредством специальных устройств доставки лекарственного средства, таких как повязки или в качестве альтернативы пластыри, прокладка, губки, полоски или другие формы пригодных гибких материалов.

Готовые формы с медленным высвобождением.

Соединения могут быть применены в готовых формах с медленным высвобождением, и/или составлены с агентами, модифицирующими распределение в тканях или биодоступность. Более конкретно, в предпочтительном варианте осуществления комбинация по меньшей мере 2 соединений составлена в готовой форме с выделяющим лекарственное средство полимером, или биомолекулами, или мицеллами, или липосомообразующими липидами, или эмульсиями типа масло в воде, или пегилированными или

твердыми наночастицами, или микрочастицами для перорального или парентерального или интратекального введения, чтобы модифицировать распределение в тканях или биодоступность.

Особые примеры таких составных агентов включают PGA, PLGA, циклодекстрины, альбуминовый или протеиновый носители, нано- и микрочастицы, липосомы, эмульсии и PEG.

Конъюгаты.

В комбинированных терапиях данного изобретения соединения могут быть объединены в фармацевтические композиции различными путями. Они могут быть смешаны вместе как отдельные единицы. Они могут быть составлены раздельно. Они также могут быть связаны ковалентно или нековалентно, с линкером или без него. В конкретном варианте осуществления по меньшей мере два соединения являются связанными, предпочтительно посредством расщепляемого или нерасщепляемого линкера.

Дозировки и длительность лечения

Необходимо принимать во внимание, что лекарственные средства комбинации могут быть введены одновременно, либо в одной и той же, либо в различных фармацевтических готовых формах или последовательно. Если это последовательное введение, отсрочка во введении второго (или дополнительного) действующего ингредиента не должна быть такой, чтобы потерять пользу эффективного воздействия комбинации активных ингредиентов. Минимальное требование для комбинации в соответствии с данным описанием состоит в том, что комбинация должна предназначаться для комбинированного применения с пользой эффективного воздействия комбинации активных ингредиентов. О предполагаемом использовании готовой формы для комбинированного лечения можно судить по оборудованию, запасам, переводам и/или другим средствам для содействия применению комбинации согласно изобретению.

Терапевтически эффективные количества двух или более лекарственных средств, которые являются предметом данного изобретения, могут быть применены вместе для приготовления лекарства, применяемого для уменьшения воздействия повышенной экспрессии гена PMP22, предотвращая или уменьшения риск развития заболевания СМТ1А, прекращая или замедляя прогрессирование заболевания СМТ1А, когда оно становится клинически очевидным, и предотвращая или уменьшения риск первого или последующего проявления нейропатического эпизода.

Несмотря на то что действующие лекарственные средства настоящего изобретения могут быть введены отдельными дозами, например два или три раза в день, однократная суточная доза каждого лекарственного средства в комбинации является предпочтительной, при этом однократная суточная доза всех лекарственных средств в единой фармацевтической композиции (дозированной лекарственной форме) является наиболее предпочтительной.

Введение может проводиться от одного до нескольких раз в день на протяжении от нескольких дней до нескольких лет и может проводиться даже в течение всей жизни пациента. Длительное или, по меньшей мере, периодически повторяемое продолжительное введение будет показано в большинстве случаев.

Термин "дозированная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам (таким как капсулы, таблетки или загруженные цилиндры шприца), пригодным в качестве единой дозировки для больших людей, причем каждая единица содержит заранее предопределенное количество действующего вещества или веществ, рассчитанное, чтобы оказывать требуемый терапевтический эффект, совместно с требуемым фармацевтическим носителем.

Количество каждого лекарственного средства в комбинации, предпочтительное для разовой дозировки, будет зависеть от нескольких факторов, включая способ введения, массу тела и возраст пациента, тяжесть нейропатического повреждения, вызванного заболеванием СМТ1А или риск потенциальных побочных эффектов, учитывая общее состояние здоровья человека, подвергаемого лечению.

Дополнительно, на применяемую дозировку может воздействовать фармакогеномная (влияние генотипа на фармакокинетический, фармакодинамический профиль или профиль эффективности лекарства) информация о конкретном пациенте.

За исключением случаев, отвечающих особо тяжелым случаям болезни СМТ, когда могут потребоваться более высокие дозировки, или при лечении детей, когда будут выбираться более низкие дозировки, предпочтительная дозировка каждого лекарственного средства в комбинации будет обычно простираться в пределах диапазона доз, не выше обычно предписываемых для долговременного поддерживающего лечения или с доказанной безопасностью в большой 3 фазе клинических исследований.

Например,

для соединения F от приблизительно 2 до приблизительно 100 мг в день при пероральном применении. При местном применении должны быть выбраны специальные дозы;

для соединения D от приблизительно 1 до приблизительно 20 мг в день при пероральном применении;

для соединения B от приблизительно 2 до приблизительно 20 мг в день при пероральном применении. При введении в форме наночастиц или подобных готовых форм могут быть пригодны различные дозы;

для соединения E от приблизительно 125 до приблизительно 500 мг в день при пероральном применении;

для соединения C от приблизительно 1 до приблизительно 20 мг в день при пероральном применении;

для соединения А от приблизительно 1 до приблизительно 50 г в день при пероральном применении. В случае инъекций должны быть выбраны специальные дозы.

Наиболее предпочтительная дозировка будет соответствовать количествам до 1 до 10% от обычно предписываемых для долговременного поддерживающего лечения.

Необходимо понимать, что количество фактически введенного лекарственного средства будет определяться врачом с учетом важных обстоятельств, включая состояние или состояния, подвергаемые лечению, точная композиция, подлежащая введению, возраст, масса и реакция отдельного пациента, тяжесть симптомов у пациента и выбранный путь введения. Вследствие этого вышеуказанные диапазоны дозировок предназначены обеспечивать основное направление и поддержку идей, изложенных в данной заявке, но не предназначены для ограничения рамками изобретения.

Следующие примеры приводятся для иллюстрирования, а не для ограничения.

Примеры

1) Культура клеток.

1.1) Имеющиеся в продаже первичные шванновские клетки крыс.

Флаконы с первичной культурой шванновских клеток (SC) крыс (Sciencell # R1700) размораживают и высевают с плотностью 10000 клеток/см² в "Sciencell Schwann cell medium" (основная среда от Sciencell # R1701) в колбы 75 см², предварительно покрытые поли-L-лизиним. Среда для культивирования составлена из основной среды, 5% фетальной бычьей сыворотки (3H-Biomedical AB # 1701-0025), 1% добавки для роста шванновских клеток (3H Biomedical AB # 1701-1752), 1% Гентамицина (Sigma # G1397) и 10 мкМ Форсколина (Sigma # F6886) для стимуляции их пролиферации.

После достижения заселенности (от 4 до 10 дней в зависимости от серии клеток) шванновские клетки очищают посредством легкого встряхивания или посредством thyl.1 иммунопэннинга, который позволяет отделить SC от прилипших фибробластов, чтобы создать культуры по меньшей мере 95%-ной чистоты. Затем SC подсчитывают (Триптан голубой-способом) и высевают в колбы 75 см², предварительно покрытые поли-L-лизиним в такую же SC среду. При заселенности клетки промывают, обрабатывают трипсином (трипсин-ЭДТА разведенный 1×, от Invitrogen # 1540054), разводят в ФСБ без кальция и магния) подсчитывают и высевают в 12-луночный планшет (140000 клеток/лунку) в Sciencell Schwann cell medium с 5% FBS, 1% добавки для роста клеток (CGS), 40 мкг/мл гентамицина и 4 мкМ Форсколина.

1.2) Приготовленные на заказ первичные шванновские клетки крыс.

Культуры первичных шванновских клеток (SC) выделяют из седалищных нервов новорожденных крыс Sprague-Dawley (между P0 и P2). Всех новорожденных крыс умерщвляют и изолируют в чашке Петри. Вскрытие выполняют в условиях стерильности.

Кожу спины отделяют от задней лапы и нижнего торса. Выделяют седалищный нерв и перемещают в чашку для культивирования, содержащую ледяной Leibovitz (L15, Invitrogen # 11415) дополненный 1% раствором пенициллина/стрептомицина (50 МЕ/мл и 50 мкг/мл соответственно; Invitrogen # 15070) и 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma A6003). Оба нерва каждой крысы перемещают в 15 мл трубку, содержащую ледяной L15. Затем среду L15 удаляют и заменяют 2,4 мл DMEM (Invitrogen # 21969035) с 10 мг/мл коллагеназы (Sigma # A6003). Нервы выдерживают в данной среде в течение 30 мин при 37°C. Затем среду удаляют и оба нерва разрушают трипсином (10% трипсин-ЭДТА 10×, Invitrogen # 15400054), разведенном в ФСБ без кальция и магния (Invitrogen # 2007-03) в течение 20 мин при 37°C. Реакцию останавливают посредством добавления DMEM, содержащего ДНКазу I II степени (0,1 мг/мл Roche diagnostic # 104159) и фетальную телячью сыворотку (FCS 10%, Invitrogen # 10270). Клеточную суспензию растирают в порошок с 10 мл пипеткой и пропускают через фильтр в 50 мл трубке (фильтрующие элементы Swinnex 13 мм, Millipore, с 20 мкм нейлоновыми сетчатыми фильтрами, Fisher). Клеточную суспензию центрифугируют при 350×g в течение 10 мин при комнатной температуре (RT) и осадок суспендируют в DMEM с 10% FCS и 1% пенициллина/стрептомицина. Клетки подсчитывают (Триптан голубой-способом) и высевают в Falcon 100 мм планшеты для тканевых культур Primaria с плотностью, равной от 5·10⁵ до 10⁶ клеток/чашку.

После одного дня культивирования среду заменяют DMEM, 10% FCS, 1% пенициллином/стрептомицином и 10 мкМ цитозин-b-D-арабинофуранозидом (Sigma # C1768). Спустя 48 ч, среду удаляют и клетки трижды отмывают DMEM. Затем добавляют среду для роста SC, состоящую из DMEM, 10% FCS, 1% пенициллина/стрептомицина, 2 мкМ Форсколина (Sigma # F6886), 10 мкг/мл бычьего экстракта гипофиза (PEX, Invitrogen # 13028). Среду заменяют каждые 2-3 дня.

После 8 дней культивирования (от 4 до 10 дней в зависимости от серии клеток) шванновские клетки достигают заселенности и культуру, содержащую большое количество загрязняющих фибробластов, очищают посредством способа thyl.1 иммунопэннинга. После такого очищения клетки суспендируют в ростовой среде при 10000 клеток/см² в колбах 75 см², предварительно покрытых поли-L-лизиним. При достижении заселенности клетки промывают, обрабатывают трипсином (трипсин-ЭДТА), подсчитывают и высевают в 12-луночные планшеты (100000 клеток/лунку).

1.3) Культивирование лекарственного средства.

После высевания клеток в 12-луночные планшеты среду заменяют средой определенного состава,

состоящей из смеси DMEM-F12 (Invitrogen # 21331020), дополненной 1% добавкой N2 (Invitrogen # 17502), 1% L-Глютамином (Invitrogen # 25030024) 2,5% FBS (Sciencell # 0025), 0,02 мкг/мл кортикостерона (Sigma # C2505), 4 мкМ Форсколина и 50 мкг/мл гентамицина. Факторы роста для стимулирования дифференцировки SC в данную среду не добавляют.

Спустя 24 ч среду заменяют средой определенного состава (DMEM-F12), дополненной 1% Инсулин-Трансферрин-Селен-Х (ITS, Invitrogen # 51300), 16 мкг/мл Путресцина (Sigma # P5780), 0,02 мкг/мл кортикостерона и 50 мкг/мл гентамицина. На данной стадии ни прогестерон, ни форсколин в среде не присутствуют.

Спустя один день шванновские клетки стимулируют комбинациями лекарственных средств или отдельных лекарственных средств на протяжении 24 ч (3 лунки/условие). Приготовление каждого соединения выполняют только перед его добавлением в культуральную среду.

Лекарственные средства добавляют к среде определенного состава, состоящей из DMEM-F12 с 1% Инсулин-Трансферрин-Селен-Х (ITS, Invitrogen # 51300), 16 мкг/мл Путресцина, 0,02 мкг/мл кортикостерона, 10 нМ Прогестерона и 50 мкг/мл гентамицина. Отсутствие Форсколина во время стимуляции лекарственного средства не допускает аденилатциклазного насыщения.

2) Очищение шванновских клеток посредством Thy1.1 иммуноэниннга.

Для предотвращения загрязнения культуры фибробластами шванновские клетки очищают с применением протокола иммуноэниннга клонa Thy1.1 (ATCC TIB-103™).

Предварительно покрытые антителами 100 мм бактериальные чашки Петри изготавливают следующим образом: данные чашки трижды отмывают ФБР и обрабатывают 20 мл 50 мМ раствора Трис-НСl, рН 9,5, с 10 мкг/мл козьих Противомышиных IgM МУ антител (Jackson ImmunoResearch # 115-005-020) в течение ночи при 4°C; затем трижды промывают ФБР и обрабатывают раствором ФБР с 0,02% BSA и супернатантом, полученным из гибридной культуры T11D7e2 (ATCC # TIB-103), содержащей антитело IgM к Thy1.1, в течение 2 ч при комнатной температуре. В завершение, перед добавлением клеточных суспензий чашки трижды отмывают ФБР.

SC отделяют трипсином-ЭДТА. Как только большинство клеток оказались в суспензии, трипсин нейтрализуют DMEM - 10% FBS, а клетки центрифугируют. Осадок диссоциированных клеток ресуспендируют в 15 мл среды с 0,02% BSA плотностью $0,66 \times 10^6$ клеток в мл (максимум) и перемещают в чашку Петри (приблизительно 6,6 миллионов клеток/10 мл/чашку 100 мм).

Клеточную суспензию культивируют в чашке Петри, покрытой Thy1.1, в течение 45 мин при 37°C с легким встряхиванием каждые 15 мин для предотвращения неспецифического связывания. Большинство фибробластных клеток, экспрессирующих Thy1.1, адгезируются на чашке. В конце культивирования клеточную суспензию извлекают и центрифугируют. Теоретически, такая клеточная суспензия содержит только шванновские клетки. Клетки центрифугируют, а клеточный осадок суспендируют в ростовой среде с 10 мкМ Форсколина при 16000 клеток/см² в колбе 75 см², обработанной поли-L-лизинном.

3) Количественная обратнотранскриптная полимеразная цепная реакция (Q-RT-PCR).

Количественная RT-PCR применяется для сравнения уровней PMP22 мРНК после лекарственного стимулирования относительно Рибосомального L13A мРНК домашнего хозяйства в первичной культуре шванновских клеток крыс.

После промывания холодным стерилизованным ФБР общую РНК экстрагируют из каждого образца клеток и очищают от SC, применяя микро набор Qiagen RNeasy (Qiagen # 74004). Определяют количество нуклеиновых кислот с помощью спектрофотометра Nanodrop, применяя 1 мкл образца РНК. Чистоту РНК определяют посредством аппарата BioAnalyzer (Agilent).

РНК обратно транскрибируют в кДНК в соответствии со стандартным протоколом. Матрицы кДНК для PCR-амплификации синтезируют из 200 нг общей РНК, применяя обратную транскриптазу Superscript II (Invitrogen # 18064-014) в течение 60 мин при 42°C в присутствии олиго(dT), в конечном объеме 20 мкл.

кДНК подвергают ПЦР-амплификации, применяя систему "LightCycler® 480" (Roche Molecular Systems Inc.). Перед использованием для PCR-амплификации каждую кДНК пятикратно разводят. 2,5 мкл этих кДНК вводят в реакционный раствор PCR (конечный объем 10 мкл). Предварительные испытания доказали, что количественный анализ состоялся в экспоненциальной фазе процесса амплификации для обеих последовательностей и что экспрессия упоминаемого гена в условиях различных культур была одинаковой.

Реакцию PCR проводят посредством амплификации 500 нМ прямого праймера PMP22 (HM_017037) крыс, 5-GGAAACGCGAATGAGGC-3, и 500 нМ обратного праймера 5-GTTCTGTTTGGTTT GGCTT-3 (амплификация 148-о.п.). Фрагмент 152-о.п. RPL13A рибосомальной (HM_173340) РНК амплифицируют параллельно в отдельных реакциях для нормализации результатов, применяя 500 нМ прямого праймера 5-CTGCCCTCAAGGTTGTG-3, и 500 нМ обратного праймера 5-CTTCTTCTCCGG TAATGGAT-3.

Для выполнения анализа RT-Q-PCR авторы изобретения применяли FRET-химию. FRET-зонды составлены из 0,3 мкМ Pmp22-FL-5-GCTCTGAGCGTGCATAGGGTAC или Rpl13A-FL-5-TCGGGTGGAA

GTACCAGCC, меченных на своем 3'-конце донорной флуорофорной краской (Флуоресцеин). 0,15 мкМ зондов Red640 определяли следующим образом: Pmp22-red-5'-AGGGAGGGAGGAAGGAAACCAGAAA-или Rpl13A-red-5'-TGACAGCTACTCTGGAGGAGAAACGGAA, меченных на своем 5'-конце акцепторной флуорофорной краской (Родамин Red 640).

Каждая реакция ПЦР включала в себя 2,5 мкл матриц кДНК в конечном объеме 10 мкл набора мастер-микс (Roche # 04-887301001).

Для PCR использовали следующие условия: 10 с при 95°C, 10 с при 63°C и 12 с при 72°C и 30 с при 40°C (сорок циклов амплификации). Относительные уровни экспрессии гена PMP22 оценивали посредством определения соотношения между продуктами, вырабатываемыми меченым геном PMP22 и эндогенным внутренним стандартным RPL13A.

4) Анализ экспрессии белка PMP22 посредством проточной цитометрии (FACS).

Спустя 8, 24 и 48 ч после культивирования лекарственных средств супернатант извлекают, центрифугируют и замораживают. SC отделяют трипсином-ЭДТА. Как только большинство клеток оказываются в суспензии, трипсин нейтрализуют, применяя DMEM с 10% FCS.

Супернатант с клетками извлекают и центрифугируют. Клеточный осадок перемещают в микротрубки, однократно отмывают в ФБР и фиксируют со специальным раствором (AbCys # Reagent A BUF09B). 10 мин спустя клетки однократно промывают в ФБР и сохраняют при 4°C.

Через пять дней после фиксации клеток все клеточные средства с различным временем культивирования маркируют, применяя следующий протокол.

Клетки центрифугируют при 7000 об/мин в течение 5 мин, а клеточный осадок суспендируют в пермеабилзирующем растворе (AbCys # Reagent B BUF09B) и метят первичными антителами PMP22 (Abeam # ab61220, 1/50) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки центрифугируют при 7000 об/мин в течение 5 мин, а осадки клеток однократно промывают в ФБР. Добавляют вторичные антитела, соединенные с Alexa Fluor 488 (козий антикроличий IgG, Molecular Probes # A11008, 1/100), в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки центрифугируют при 7000 об/мин в течение 5 мин, а осадки клеток однократно промывают в ФБР. Мечение усиливают, добавляя третичные антитела, соединенные с Alexa Fluor 488 (куриный антикозий IgG, Molecular Probes # A21467, 1/100), в течение 1 ч культивирования при комнатной температуре. Затем клетки однократно промывают в ФБР. Контрольную группу без каких-либо антител (немеченых клеток) создают для определения уровня аутофлуоресценции и настраивают чувствительность фотомультипликаторов. Контрольную группу как с вторичными, так и с третичными антителами, но без первичных антител, создают, чтобы оценить неспецифическое связывание антител.

Сбор и анализ данных выполняют с помощью цитометра FACS Array и программного обеспечения FACS Array (Becton Dickinson) на 5000 клеток. Прямое Рассеяние (FSC) коррелирует с клеточным объемом (размером) и анализируют Боковое рассеяние (SSC), зависящее от внутренней сложности клеток (зернистость). Для экспрессии PMP22 анализ выполняют во всех клетках и рассчитывают процент позитивных клеток. Позитивными клетками являются клетки с интенсивностью флуоресценции выше, чем у контрольной группы с вторичными антителами.

Для определения количества числа SC исследуют клетки в контрольной среде, применяя антитела анти-S100 Протеин.

Клетки получают в соответствии со следующим протоколом: шванновские клетки метят антителами анти-S100 Протеин (Dako # S0311, 1/100) в течение 1 ч при комнатной температуре. Данные антитела маркируют в соответствии с протоколом, описанным выше для иммунного окрашивания PMP22, но без культивирования с третичными антителами.

5. Культивирование и активность лекарственного средства.

Лекарственные средства культивируют в течение 24 или 48 ч в такой же среде определенного состава, как и описанная выше (3 лунки/условие) без Форсколина, чтобы не допустить стимуляции аденилатциклазного насыщения, но в присутствии 10 нМ прогестерона. После культивирования лекарственного средства супернатант извлекают, а шванновские клетки замораживают для анализа RT-Q-PCR.

Авторы изобретения определяют активность лекарственного средства в отношении экспрессии PMP22, если она значительно снижает уровни PMP22 по сравнению с контрольной группой. Табл. 1 ниже резюмирует результаты для 20 действующих лекарственных средств, которые вызывают уменьшение экспрессии PMP22.

Таблица 1

Соединение	мРНК	Протеин
Баклофен	+	
Метимазол	+	+
Мифепристон	+	
Налтрексон	+	
Пилокарпин	+	+
Сорбит	+	
Дисульфирам	+	
Фенофибрат	+	
Галоперидол	+	
Индометацин	+	
Монтелукаст	+	
Симвастатин	+	
Трилостан	+	
Эстрадиол- <i>b</i>	+	
Изопротеренол	+	
Диклофенак	+	+
Флурбипрофен	+	+
Индометацин	+	+
Кетопрофен	+	+
Мелоксикам	+	+

Данные для 18 лекарственных средств, приводящих к значительному уменьшению экспрессии мРНК РМР22 после 24 ч культивирования, иллюстрированы на фиг. 1-3. Эти данные демонстрируют существенное снижение уровней мРНК РМР22, даже при очень низких дозах.

б) Уровень белка РМР22 после 24 ч культивирования.

Авторы изобретения исследовали способность некоторых лекарственных средств ингибировать экспрессию белка РМР22 (FACS-анализ). Фиг. 4 описывает результаты для 6 лекарственных средств и демонстрирует, что они способны значительно уменьшать экспрессию белка РМР22 в течение 24 ч после их добавления в среду для культивирования. Результаты действия некоторых отдельных лекарственных средств на уровень белка РМР22 также показаны выше в табл. 1.

На фиг. 5 показано воздействие комбинации пилокарпина и Налтрексона на экспрессию белка РМР22 после 24 ч культивирования. Уровни экспрессии белка сравнили с нелечеными контрольными группами. Было показано, что данные разницы являются статистически значимыми.

Ниже табл. 2 резюмирует результаты, полученные для различных комбинаций лекарственных средств в различных концентрациях на экспрессию белка РМР22. Данные результаты были статистически значимыми и демонстрируют преимущество и благотворное воздействие предложенных комбинаций лекарственных средств.

Таблица 2

Комбинация	% PMP22 FASC	% среднее квадратичное отклонение	Вариация	Значение p
Сорбит 1 мМ + Метимазол 1 мкМ	75	8	-25%	p<0,001
Сорбит 100 мкМ + Метимазол 10 мкМ	74	7	-26%	p<0,001
Сорбит 100 мкМ + Метимазол 1 мкМ	74	7	-26%	p<0,001
Пилокарпин 10 нМ + Налтрексон 1 мкМ	63	6	-37%	p<0,0001
Пилокарпин 10 нМ + Налтрексон 100 нМ	68	5	-32%	p<0,0001
Сорбит 1 мМ + Налтрексон 1 мкМ	67	10	-33%	p<0,0001
Сорбит 1 мМ + Налтрексон 100 нМ	70	10	-30%	p<0,0001
Сорбит 100 мкМ + Налтрексон 1 мкМ	70	12	-30%	p<0,001
Сорбит 100 мкМ + Налтрексон 100 нМ	62	14	-38%	p<0,0001

7) Терапевтическая схема, дозировки и пути введения.

Ниже описаны дозировки для двух комбинаций (которые отличаются путями введения) для человека.

(1) Соединение А (D-сорбит) и соединение F (мифепристон).

1) Вводимая хронически, перорально, дважды или трижды в день, в виде одной фармацевтической композиции в форме капсул или капель, которые необходимо растворять в питье (предпочтительно, в молоке): предпочтительно общая суточная дозировка соединения F составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мг и соединение А от приблизительно 1 до приблизительно 50 г.

2) Вводимые одновременно в течение нескольких месяцев: соединение F один раз в неделю от приблизительно 5 до приблизительно 200 мг один раз в неделю (наиболее предпочтительная дозировка составляет до 50 мг в неделю), и соединение А дважды в день в питье, общая суточная дозировка соединения А составляет от приблизительно 1 до приблизительно 50 г.

3) Вводимые последовательно и одновременно для длительного лечения: во-первых, в виде одного болюса соединение F (приблизительно от 200 до 600 мг) перорально, затем в комбинации одновременно: соединение F в виде кожного пластыря, высвобождающего лекарственное средство** (наиболее предпочтительна скорость составляет приблизительно от 0,2 до приблизительно 2 мг в день) и соединение А дважды в день в течение 7 дней в питьевой воде, затем соединение А в течение 14 дней не принимать, затем соединение А в течение 7 дней дважды в день в питьевой воде (предпочтительная общая суточная дозировка соединения А составляет от приблизительно 1 до приблизительно 50 г) и т.д. с перерывами.

* Дозировки данного лекарственного средства в любой комбинации среди раскрытых в изобретении могут значительно отличаться в готовых формах, предложенных для лечения мужчин или женщин.

** Такая же терапевтическая схема, как и соединение F и соединение А (3), но вместо кожного пластыря может быть применено ректальное/вагинальное введение низких доз соединения F.

Библиография

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, Leskiewicz M, Kubera M, Lason W. Chlorpromazine inhibits the glucocorticoid receptor-mediated gene transcription in a calcium-dependent manner. *Neuropharmacology*. 2002;43(6):1035-1043

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

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

Brancolini C, Marzinotto S, Edomi P, Agostoni E, Fiorentini C, Muller 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 P-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 LTC4 by Lewis rat Schwann cells. *J Neurol Sci* 1999; 162(2): 120-126.

Devaux JJ, Scherer SS. Altered ion channels in an animal model of Charcot-Marie-Tooth disease type IA. *J Neurosci.* 2005; 25(6): 1470-1480.

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

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

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

Fortun J, Dunn WA Jr, Joy S, Li J, Notterpek L. Emerging role for autophagy in the removal of 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. *JNeurochem*2005; 92:1531-1541.

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

Fortun J, Verrier JD, Go JC, Madorsky I, Dunn WA, Notterpek L. The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of

cytoplasmic chaperones. *Neurobiol Dis.* 2007; 25(2): 252-265.

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

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

Kantamneni S, Correa SA, Hodgkinson GK, Meyer G, Vinh NN, Henley JM, Nishimune A. GISP: a novel brain-specific protein that promotes surface expression and function of GABA(B) receptors. *J Neurochem.* 2007;100(4):1003-17.

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

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

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

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

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

Lupski JR, Wise CA, Kuwano A, Pentao L, Parke JT, Glaze DG,

Ledbetter DH, Greenberg F, Patel PI. Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet.* 1992 ;1(1): 29-33.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Robaglia-Schlupp A, Pizant J, Norreel JC, Passage E, Saberan-Djoneidi D, Ansaldi JL, Vinay L, Figarella-Branger D, Levy N, Clarac F, Cau P, Pellissier JF, Fontes M. PMP22 overexpression causes dysmyelination in mice. *Brain* 2002; 125(Pt 10): 2213-2221.

Robert F, Guennoun R, 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tu H, Rondard P, Xu C, Bertaso F, Cao F, Zhang X, Pin JP, Liu J. Dominant role of GABAB2 and Gbetagamma for GABAB receptor-

mediated-ERK1/2/CREB pathway in cerebellar neurons. *Cell Signal*. 2007; 19(9):1996-2002.

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

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

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

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

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

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение D-сорбита или его соли в качестве активного агента для получения композиции для лечения болезни Шарко-Мари-Тусса (СМТ) или связанного с ней расстройства, выбранного из наследственной нейропатии с предрасположенностью к параличу от сдавления нерва (HNPP), синдрома Дежери-на-Сотта (DSS) и врожденной гипомиелинизирующей нейропатии (CHN).

2. Применение по п.1, в котором D-сорбит или его соль является единственным активным агентом.

3. Применение по п.1 или 2, где композиция предназначена для перорального введения.

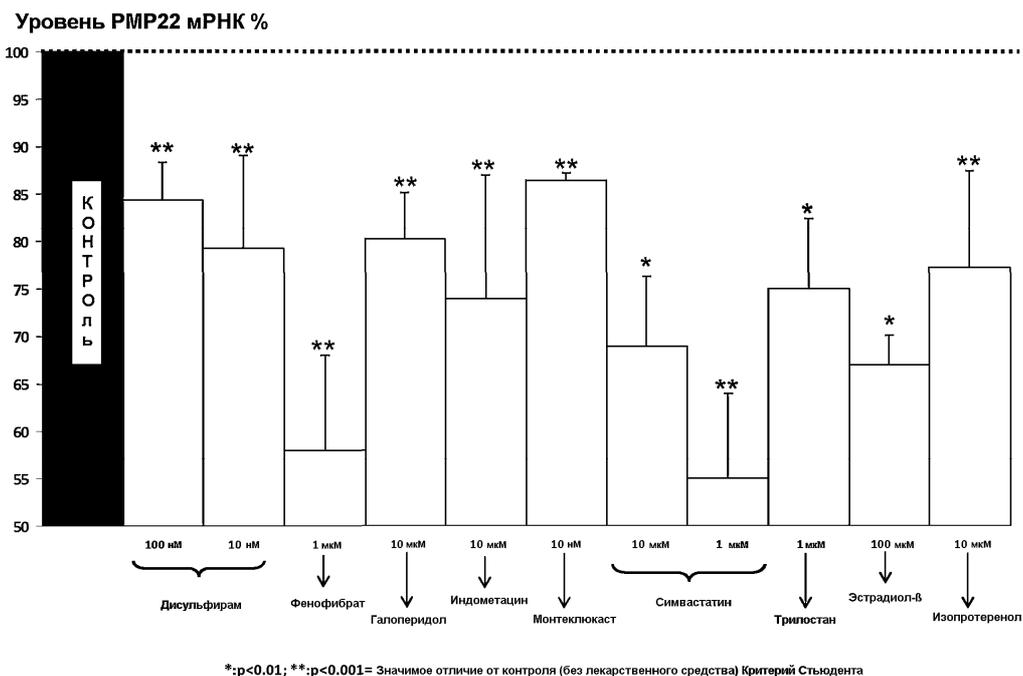
4. Применение по любому из пп.1-3, где композиция представлена в виде монолитной или составной дозированной лекарственной формы D-сорбита или его соли.

5. Применение по п.3 или 4, где композиция выполнена в виде дозированной лекарственной формы для ежедневного введения от 1 до 50 г D-сорбита или его соли и указанная дозированная лекарственная форма дополнительно содержит фармацевтически приемлемый наполнитель.

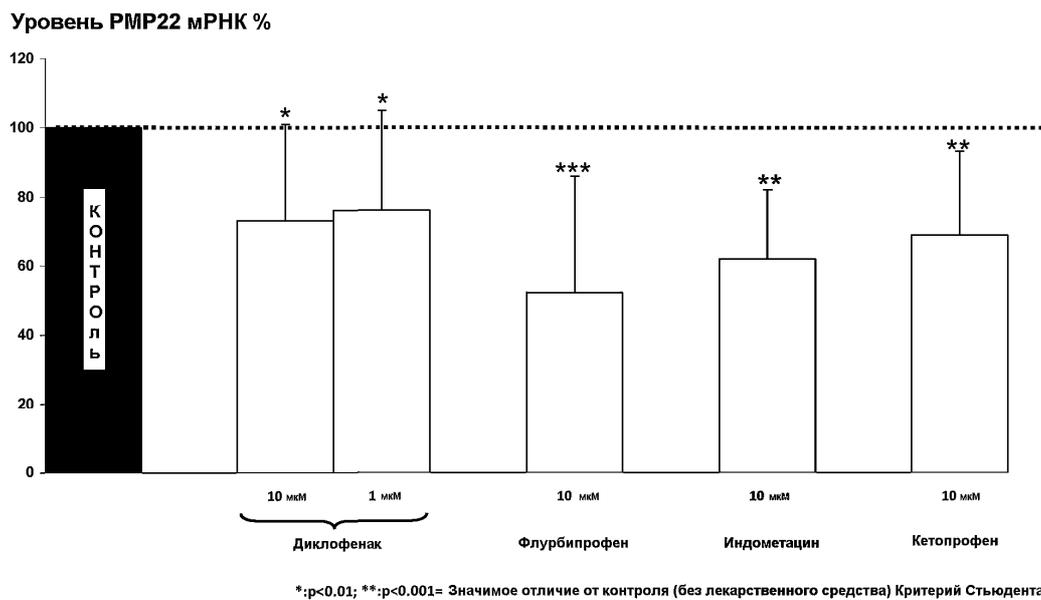
6. Применение по любому из пп.1-5, где композиция выполнена в форме таблетки, капсулы или пилюли.

7. Применение по любому из пп.1-6, для лечения СМТ1А.

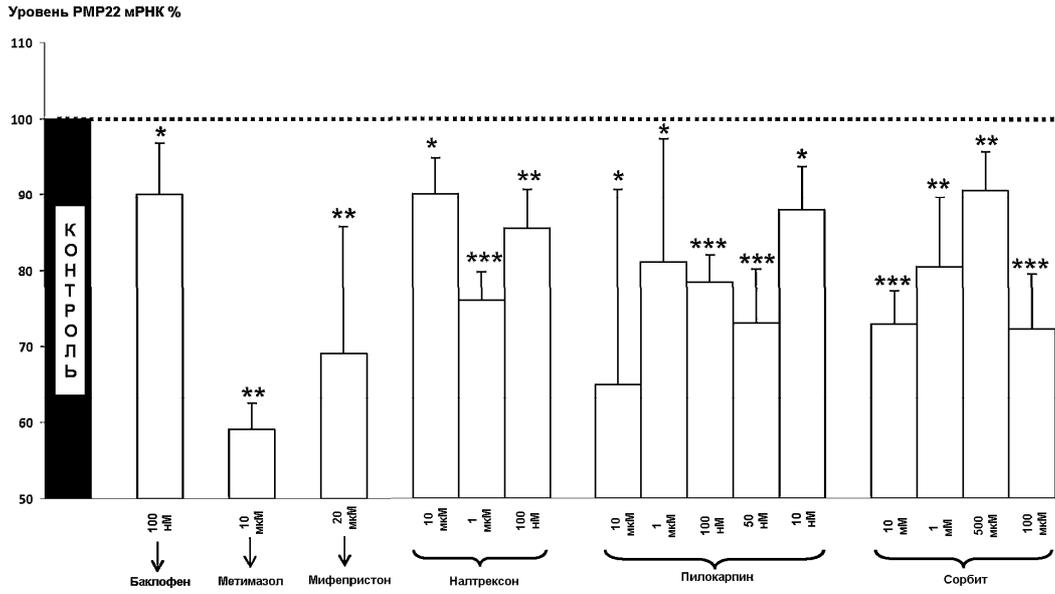
8. Применение фармацевтической дозированной лекарственной формы, представляющей собой таблетку, капсулу или пилюлю, содержащую в качестве единственного активного агента от 1 до 50 г D-сорбита или его соли и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель для лечения СМТ.



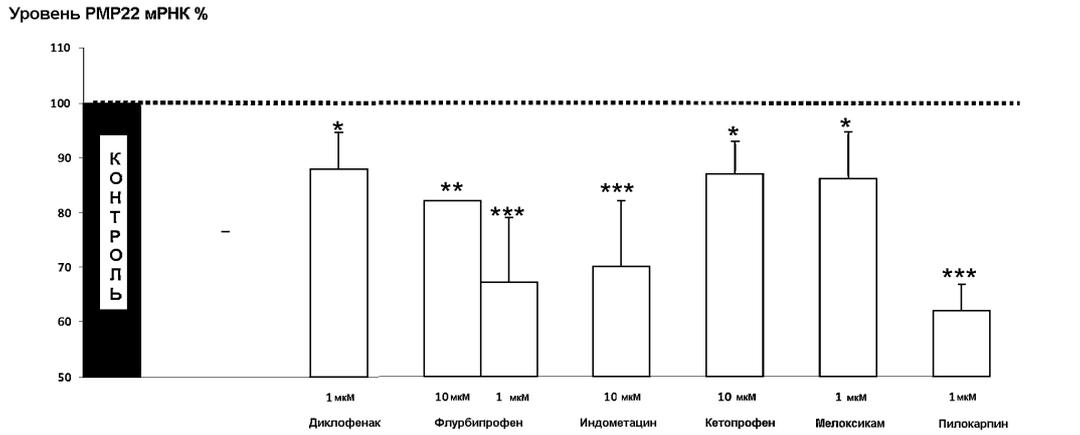
Фиг. 1



Фиг. 2

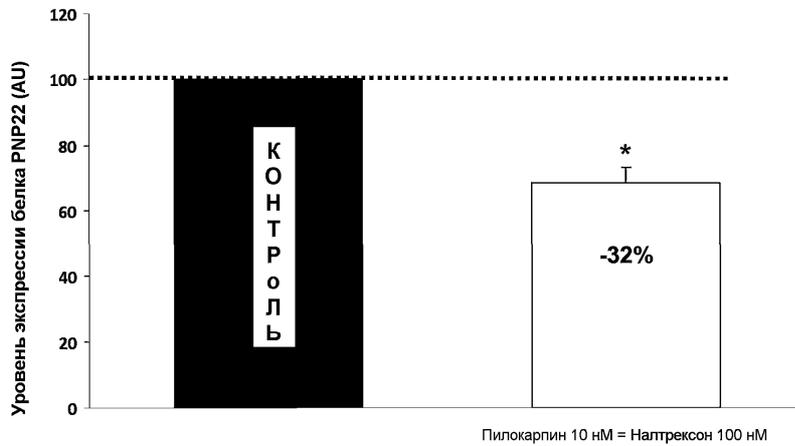


Фиг. 3



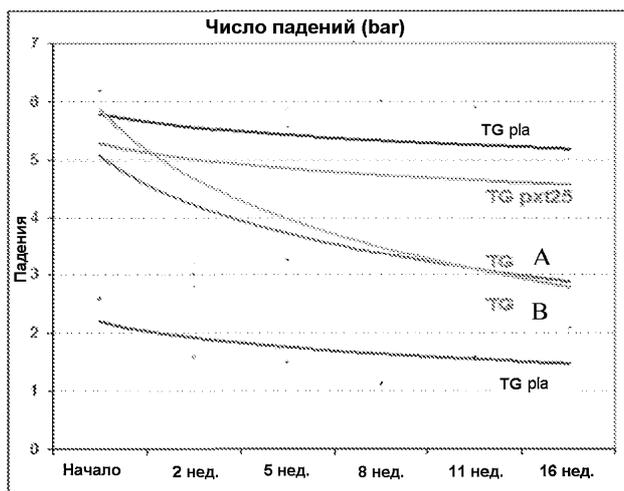
*:p<0.01; **:p<0.001; ***:p<0.0001: Значимое отличие от контроля (без лекарственного средства) Критерий Стьюдента

Фиг. 4

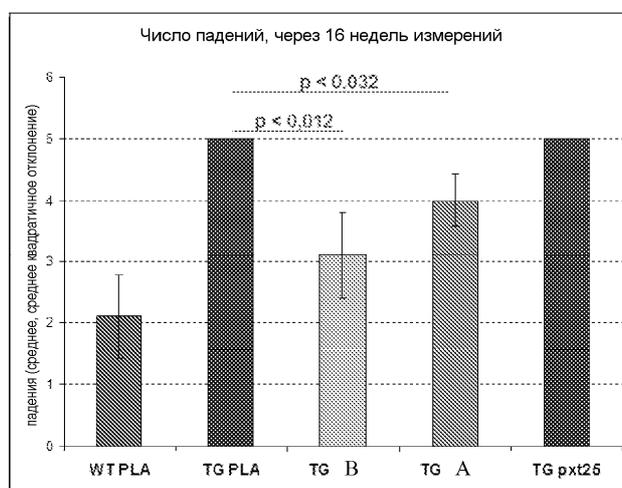


*:p<0.01: значимое отличие от контроля (без лекарственного средства) Критерий Стьюдента

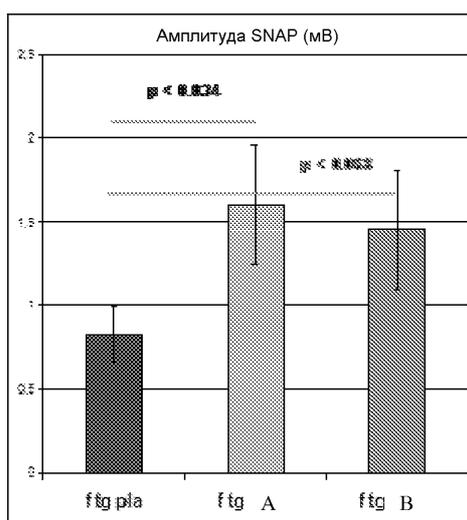
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8