



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0062222
(43) 공개일자 2016년06월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4178 (2006.01) **A61K 31/047** (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01) **A61K 31/197** (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01) **A61K 31/436** (2006.01)
A61K 31/439 (2006.01) **A61K 31/485** (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01) **A61K 45/06** (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/4178 (2013.01)
A61K 31/047 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7013760(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년06월17일
심사청구일자 2016년05월24일
- (62) 원출원 특허 10-2011-7000283
원출원일자(국제) 2009년06월17일
심사청구일자 2014년05월27일
- (85) 번역문제출일자 2016년05월24일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/057544
(87) 국제공개번호 WO 2009/153291
국제공개일자 2009년12월23일
- (30) 우선권주장
08305280.3 2008년06월18일
유럽특허청(EPO)(EP)
PCT/EP2009/057544 2009년06월17일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (71) 출원인
파넥스트
프랑스공화국, 에프-92130 이씨 레 물리노, 튀 데
벵렐리에 11
- (72) 발명자
코헨, 다니엘
프랑스 르 베시네 에프-78110, 데스 코울리스 1
애비뉴
추마코프, 일리아
프랑스 보르페이닐 에프-77000, 루드 라 노이에
691
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
신동인

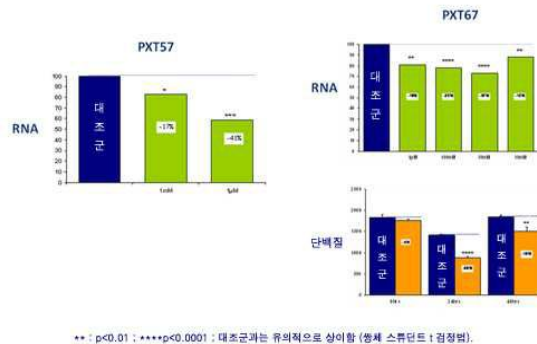
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 샤르코-마리-투스 질환 관련 장애를 치료하기 위한 필로카핀 및 메티마졸 조합

(57) 요약

본 발명은 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 관련 말초 신경병증을 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명은 객체에서 무스카린 수용체 신호 전달 및 갑상선 호르몬 과정에 동시에 작용함으로써 상기 질환을 치료하기 위한 조합치료법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



** : p<0.01 ; ****p<0.0001 ; 대조군과는 유의적으로 상이함 (평균 ± 표준편차 1점정법).

(52) CPC특허분류

A61K 31/192 (2013.01)
A61K 31/197 (2013.01)
A61K 31/4164 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)
A61K 31/439 (2013.01)
A61K 31/485 (2013.01)
A61K 31/575 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

나비로츠킨, 세르구이

프랑스 샤프나 이 말라브리 에프-92290, 드 셸리
프러드홈 49 애비뉴

구에라시멘코, 옥사나

프랑스 밀리라포레 에프-91490, 루드 라 포레 22

솔레, 나탈리

프랑스 뫼동 에프-92190, 카를루스 인프로이트 루 1
6씨

명세서

청구범위

청구항 1

필로카핀, 세비멜린, 카바콜, 메타콜린 및 베타콜 또는 이의 염으로 구성된 군으로부터 선택된 무스카린성 수용체 작용제; 및 메티마졸, 카비마졸, 프로필티오우라실 및 아미오다론 또는 이의 염으로 구성된 군으로부터 선택된 갑상선 호르몬 합성저해제; 및 임의적으로 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 함유하는 특발성 신경병증 (idiopathic neuropathy) 또는 당뇨병성 신경병증 (diabetic neuropathy)으로부터 선택된 샤르코-마리-투스 질환 (Charcot-Marie-Tooth disease; "CMT") 관련 장애를 치료하기 위한 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

필로카핀 및 메티마졸, 또는 이의 염 및 임의적으로 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 함유하는 특발성 신경병증 (idiopathic neuropathy) 또는 당뇨병성 신경병증 (diabetic neuropathy)으로부터 선택된 샤르코-마리-투스 질환 (Charcot-Marie-Tooth disease; "CMT") 관련 장애를 치료하기 위한 조성물.

청구항 3

객체에 동시 또는 일련적으로 그룹화 또는 개별적으로 투여하기 위한, 필로카핀, 세비멜린, 카바콜, 메타콜린 및 베타콜 또는 이의 염으로 구성된 군으로부터 선택된 무스카린성 수용체 작용제; 및 메티마졸, 카비마졸, 프로필티오우라실, 및 아미오다론 또는 이의 염으로 구성된 군으로부터 선택된 갑상선 호르몬 합성저해제 또는 이의 염을 함유하는 특발성 신경병증 (idiopathic neuropathy) 또는 당뇨병성 신경병증 (diabetic neuropathy)으로부터 선택된 샤르코-마리-투스 질환 (Charcot-Marie-Tooth disease; "CMT") 관련 장애를 치료하기 위한 조합 산물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 샤르코-마리-투스 질환(CMT)1A를 치료하기 위한 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 무스카린성 수용체 작용제는 필로카핀 또는 이의 염인 산물.

청구항 6

제 3항에 있어서,

상기 갑상선 호르몬 합성 저해제는 프로스타글란딘 신호 전달 상의 활성을 추가로 발휘하는 산물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 갑상선 호르몬 합성 저해제는 메티마졸 또는 카비마졸인 산물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

추가적으로 바클로펜, 미페프리스톤, 소르비톨, 날트렉손, 라파마이신, 케토프로펜 및 플루르비프로펜 또는 이의 염으로부터 선택되는 1개 이상의 활성 화합물을 포함하는 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 1개 이상의 추가적인 활성 화합물은 바클로펜 또는 미페프리스톤 또는 이의 염인 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서,

메티마졸, 필로카핀, 바클로펜, 미페프리스톤 및 소르비톨 또는 이의 염을 포함하는 조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서,

메티마졸, 필로카핀, 바클로펜, 미페프리스톤, 소르비톨 및 날트렉손 또는 이의 염을 포함하는 조성물.

청구항 12

제 1항에 있어서,

- (1) 필로카핀, 메티마졸, 미페프리스톤 및 소르비톨;
- (2) 필로카핀, 메티마졸, 미페프리스톤, 소르비톨 및 라파마이신;
- (3) 필로카핀, 메티마졸, 미페프리스톤, 소르비톨 및 케토프로펜;
- (4) 필로카핀, 메티마졸, 미페프리스톤, 소르비톨 및 폴루르비프로펜;
- (5) 메티마졸 및 세비멜린;
- (6) 필로카핀 및 프로필티오우라실;
- (7) 필로카핀, 메티마졸 및 바클로펜;
- (8) 필로카핀, 메티마졸 및 미페프리스톤;
- (9) 필로카핀, 메티마졸, 및 소르비톨;
- (10) 필로카핀, 메티마졸, 및 날트렉손;
- (11) 필로카핀, 메티마졸, 및 라파마이신;
- (12) 필로카핀, 메티마졸, 및 케토프로펜;
- (13) 필로카핀, 메티마졸, 및 폴루르비프로펜;
- (14) 필로카핀, 메티마졸, 미페프리스톤, 소르비톨, 바클로펜 및 라파마이신; 또는
- (15) 필로카핀, 메티마졸, 미페프리스톤, 소르비톨, 날트렉손 및 라파마이신으로부터 선택된 임의의 약물 조합을 포함하는 조성물.

청구항 13

제 1항에 있어서,

상기 화합물들은 동시 또는 일련적으로 그룹화 또는 개별적으로 투여하기 위해 조합되는 약물 조성물.

청구항 14

제 3항에 있어서,

상기 산물은 샤르코-마리-투스 질환(CMT)1A를 치료하기 위한 산물.

청구항 15

제 3항에 있어서,

추가적으로 바클로펜, 미페프리스톤, 소르비톨, 날트렉손, 라파마이신, 케토프로펜 및 플루르비프로펜 또는 이의 염으로부터 선택되는 1개 이상의 활성 화합물을 포함하는 산물.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 1개 이상의 추가적인 활성 화합물은 바클로펜 또는 미페프리스톤 또는 이의 염인 산물.

청구항 17

제 3항에 있어서,

메티마졸, 필로카핀, 바클로펜, 미페프리스톤 및 소르비톨 또는 이의 염을 포함하는 산물.

청구항 18

제 3항에 있어서,

메티마졸, 필로카핀, 바클로펜, 미페프리스톤, 소르비톨 및 날트렉손 또는 이의 염을 포함하는 산물.

청구항 19

제 3항에 있어서,

- (1) 필로카핀, 메티마졸, 미페프리스톤 및 소르비톨;
- (2) 필로카핀, 메티마졸, 미페프리스톤, 소르비톨 및 라파마이신;
- (3) 필로카핀, 메티마졸, 미페프리스톤, 소르비톨 및 케토프로펜;
- (4) 필로카핀, 메티마졸, 미페프리스톤, 소르비톨 및 플루르비프로펜;
- (5) 메티마졸 및 세비멜린;
- (6) 필로카핀 및 프로필티오우라실;
- (7) 필로카핀, 메티마졸 및 바클로펜;
- (8) 필로카핀, 메티마졸 및 미페프리스톤;
- (9) 필로카핀, 메티마졸, 및 소르비톨;
- (10) 필로카핀, 메티마졸, 및 날트렉손;
- (11) 필로카핀, 메티마졸, 및 라파마이신;
- (12) 필로카핀, 메티마졸, 및 케토프로펜;
- (13) 필로카핀, 메티마졸, 및 플루르비프로펜;
- (14) 필로카핀, 메티마졸, 미페프리스톤, 소르비톨, 바클로펜 및 라파마이신; 또는
- (15) 필로카핀, 메티마졸, 미페프리스톤, 소르비톨, 날트렉손 및 라파마이신으로부터 선택된 임의의 약물 조합을 포함하는 산물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 관련 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0002] 샤르코-마리-투스 질환 (Charcot-Marie-Tooth disease; "CMT")은 소아 유전 말초 다발성 신경장애(peripheral poly neuropathy)이다. 2,500명 중 약 1명에게 발병하는, 본 질환은 말초 신경 장애의 가장 흔한 유전 장애이다. 이 장애는 전형적으로 비록 유년기에 탐지될 수 있음에도 불구하고 10대 또는 20대에 발병한다. 본 질환의 원인은 점진적 신경근 변성증(gradual neuromuscular degeneration)이 만성화되는 것이다. 본 질환은 동반하는 신경성 통증 및 극심한 근육 장애 증상으로 입증된다. CMT는 프랑스에서 약 30,000명에 대한 유전적 병리원에 대해 가장 많이 연구된 분야이다. 대다수의 CMT 환자가 미엘린(myelin) 유전자(PMP22; CMT1A 형)를 포함하는 크로모솨(chromosome) 17 단편의 중첩(duplication)을 품고 있는 반면에, 24개 유전자가 상이한 형태의 CMT와 관련된다. 따라서 기원상 단일 유전자임에도 불구하고, 이 형태는 가능한 조절 유전자로 기인한 임상적 이질성을 나타낸다. CMT 환자에서의 변이된 유전자는 슈완세포(Schwann cells) 또는 신경세포의 분화에 영향을 미치거나 말초 신경에서의 이러한 세포들의 상호작용을 변화시키는 주변으로 밀집하고 단단하게 연계된 분자 경로들이다.
- [0003] PMP22 은 말초신경계에서 필수적으로 모든 유수 신경이 밀집된 부위상에서 발현되는 미엘린의 주요 구성요소이고 슈완세포(Schwann cells)에서 주로 생산된다. 게다가, PMP22 유전자는 피부 섬유종으로 카페 오레형 반점(cafe-au-lait spots)으로 특징화되는 상염색체 우성 질환 환자에서의 종양형성증의 진행과 관련된 것으로 추정된다. 약간의 정상 PMP22 단백질의 1.5배 높은 과발현도 CMT 환자에서의 중첩으로 이질적인 슈완세포도 관찰되었다(희귀한 사례로서 CMT1A-유사 표현형도 PMP22 단백질에서의 구조적 변이와 연계될 수 있다) (Lupski et al., 1992; Suter et al., 1992; Roa et al., 1993; Thomas et al., 1997; Suter & Scherer, 2003; Nave & Sereda, 2007). 비정상적인 PMP 22 유전자 투여가 CMT1A-유사 표현형을 유발함을 PMP22 단백질로 과발현시킨 실험 모델에 이용한 유전자 이식 실험에서 밝혀졌다 (Niemann et al., 1999; Perea et al., 2001; Robaglia-Schlupp et al., 2002; Meyer et al., 2006; Sereda & Nave, 2006). 게다가, 프로그스테론(progesterone) 수용체 특이적 저해제 및 아스코르빈 산(ascorbic acid)에 의한 치료학적 간섭이 상기 질환 형의 증상 진행을 경감시키거나 감소시키는 발현상의 감소를 나타냈다(Sereda et al., 2003; Passage et al., 2004; Meyer zu Horste et al., 2007).
- [0004] 바시 등(Bassi and al., 1978)은 신경병증 및 뇌척수염을 수반하는 갑상선 중독증 치료에 사용되는 메티마졸(methimazole)의 사용을 개시하였다.
- [0005] 셀트릭사(Celtrix)의 국제특허(WO 00/20024)는 갑상선 질환인 IGF-의존성 장애 증상을 경감시키기 위한 메티마졸의 사용을 개시하였다.
- [0006] 국제특허(WO2004/019938)는 신경병성 통증 증상 치료를 위한 필로카핀(pilocarpine)의 사용을 개시하였다.
- [0007] 강직성 갑상선 질환(myotonic papillary abnormalities) 치료를 위한 필로카핀(pilocarpine)의 단독사용을 개시한 바 있다(Keltner et al., 1975). 그러나, CMT 치료를 위한 필로카핀의 사용은 개시된 바가 없다. 게다가, 임의의 기타 화합물들과의 필로카핀의 조합적 사용도 또한 개시된 바가 없다.
- [0008] 결론적으로, CMT 질환 치료를 위한 효과적이고 승인된 치료법에 대한 필요성이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 관련 장애를 치료하기 위한 새로운 치료학적 접근법을 제공하는 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명자들은 CMT 및 관련 장애를 초래하는 경로에 효과적으로 작용하고 이러한 장애들을 치료하기 신규 접근법을 대표하는 신규 조합 치료법을 동정하였다.

과제의 해결 수단

- [0012] 따라서, 본 발명은 신규 조합 산물 및 조성물뿐만 아니라 CMT 질환 및 관련 장애를 치료하기 위한 용도를 제공한다.
- [0013] 보다 구체적으로는, 본 발명의 목적은 CMT 질환 및 관련 장애를 치료하기 위한(약제 제조를 위한) 화합물들의 조합 사용을 제공한다(여기에서 상기 화합물들의 조합은 무스카린성 수용체 작용제(muscarinic receptor

agonist) 또는 이의 전구약물 및 갑상선 호르몬 합성(thyroid hormone synthesis) 저해제 또는 이의 전구약물로부터 선택됨).

- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 객체에 동시 또는 일련적으로 그룹화(grouped) 또는 개별적으로 투여하기 위한, 무스카린성 수용체 작용제(muscarinic receptor agonist) 및 갑상선 호르몬 합성(thyroid hormone synthesis) 저해제 또는 이의 전구약물을 함유하는 조합 산물(combination product)을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 무스카린성 수용체 작용제(muscarinic receptor agonist) 및 갑상선 호르몬 합성(thyroid hormone synthesis) 저해제 또는 이의 전구약물, 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 함유하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 가장 바람직한 구현예로서, 상기 무스카린성 수용체 작용제 (muscarinic receptor agonist) 는 필로카핀 약제 (pilocarpine pharmaceutical) 활성제인(3S,4R)-3-에틸(ethyl)-4-[(3-메틸이미다졸(methylimidazol)-4-일(y1)) 메틸(methyl)]옥솔란(oxolan)-2-온(one) (CAS 92-13-7) 또는 이의 전구약물인 것이다.
- [0017] 게다가, 본 발명의 가장 바람직한 구현예로서, 상기 갑상선 호르몬 합성 (thyroid hormone synthesis) 저해제는 프로스타글란딘 신호 경로(prostaglandin signalling) 상의 활성을 추가로 나타내는 것이다. 이러한 화합물들의 바람직한 예로는 1-메틸(methyl)-3H-이미다졸(imidazole)-2-티온(thione) (CAS 60-56-0, 메티마졸 약제(methimazole pharmaceutical)활성제), 또는 카르비마졸(carbimazole) 등과 같은 이의 전구약물을 포함하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 본 발명은 객체에서의 CMT 치료를 위한 무스카린성 수용체 작용제(muscarinic receptor agonist) 및 갑상선 호르몬 합성 (thyroid hormone synthesis) 저해제를 함유하는 조성물을 제공하는 것이다(여기에서 상기 치료는 환자가 CMT1A를 보유하는지 여부를 측정하는 단계를 추가로 포함함).
- [0019] 이와 관련하여, 본 발명의 특정한 목적은 필로카핀(pilocarpine), 또는 이의 전구약물, 및 메티마졸(methimazole), 또는 이의 전구약물 및 임의적으로, 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 함유하는 조성물을 제공하는 것이다. 하기 실시예에 나타난 바와 같이, 상기한 조합은 승인된 동물 실험에서 CMT를 효과적으로 치료할 수 있게 한다.
- [0020] 본 발명의 산물 또는 조성물은 바람직하게는 라파마이신(rapamycin), 바클로펜(baclofen), 소르비톨(sorbitol), 미페프리스톤(mifepristone), 날트렉손(naltrexone), 플루르비프로펜(flurbiprofen) 및 케토프로펜(ketoprofen)으로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 활성 화합물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 구현예로서, 본 발명에 따른 상기 조성물은 적어도, (a) 필로카핀(pilocarpine), 메티마졸(methimazole) 및 미페프리스톤(mifepristone);
- [0022] (b) 필로카핀(pilocarpine), 메티마졸(methimazole) 및 바클로펜(baclofen); 또는
- [0023] (c) 필로카핀(pilocarpine), 메티마졸(methimazole) 및 소르비톨(sorbitol)을 포함하는 것이다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예로서, 본 발명에 따른 상기 조성물은 적어도,
- [0025] (1)필로카핀(pilocarpine),메티마졸(methimazole),미페프리스톤(mifepristone), 바클로펜(baclofen) 및 소르비톨(sorbitol); 또는
- [0026] (2)필로카핀(pilocarpine),메티마졸(methimazole),미페프리스톤(mifepristone), 바클로펜(baclofen),소르비톨(sorbitol) 및 날트렉손(naltrexone)을 포함하는 것이다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 본 발명은 메티마졸(methimazole), 필로카핀(pilocarpine) 및 2개의 추가적인 활성 화합물들, 바람직하게는, 미페프리스톤(mifepristone) 및 소르비톨(sorbitol)을 함유하는 산물 또는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 본 발명은 메티마졸(methimazole), 필로카핀(pilocarpine) 및 3개의 추가적인 활성 화합물들, 바람직하게는:
- [0029] (1) 미페프리스톤(mifepristone), 바클로펜(baclofen) 및 소르비톨(sorbitol) 또는
- [0030] (2) 미페프리스톤(mifepristone),소르비톨(sorbitol) 및 파마이신(rapamycin); 또는

- [0031] (3) 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol) 및 케토프로펜(ketoprofen); 또는
- [0032] (4) 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol) 및 플루르비프로펜(flurbiprofen)을 함유하는 산물 또는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 본 발명은 메티마졸(methimazole), 필로카핀(pilocarpine) 및 4개의 추가적인 활성 화합물들, 바람직하게는:
 - [0034] (1) 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol), 바클로펜(baclofen) 및 날트렉손(naltrexone);
 - [0035] (2) 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol), 바클로펜(baclofen) 및 라파마이신(rapamycin);
 - [0036] (3) 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol), 날트렉손(naltrexone) 및 라파마이신(rapamycin)을 함유하는 산물 또는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 본 발명은 표 1에 개시된 바와 같은 임의의 약물 조합들을 함유하는 산물 또는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 구체적인 구현예로서, 본 발명은
 - [0039] (1) 메티마졸(methimazole) 및 바클로펜(baclofen); 또는
 - [0040] (2) 메티마졸(methimazole) 및 세비멜린(cevimeline)을 함유하는 산물 또는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 본 발명은 또한 필로카핀(pilocarpine) 및 프로필티오우라실(propylthiouraci l)을 함유하는 산물 또는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 목적은 CMT 또는 관련 장애 치료(약제 제조)를 위한, 필로카핀(pilocarpine)의 메티마졸(methimazole)과의 조합 또는 이러한 2개 약물들 조합 단독, 또는 이들의 효과를 증진시키는 기타 화합물(들)과의 조합의 용도를 제공한다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 목적은 독성 신경병증 치료(약제 제조)를 위한, 필로카핀(pilocarpine)의 메티마졸(methimazole)과의 조합 또는 이러한 2개 약물들 조합 단독, 또는 이들의 효과를 증진시키는 기타 화합물(들)과의 조합의 용도를 제공한다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 목적은 ALS (근위축성 측색 경화증) 치료(약제 제조)를 위한, 필로카핀(pilocarpine)의 메티마졸(methimazole)과의 조합 또는 이러한 2개 약물들 조합 단독, 또는 이들의 효과를 증진시키는 기타 화합물(들)과의 조합의 용도를 제공한다.
- [0045] 바람직하게는, CMT 치료를 위한, 필로카핀(pilocarpine) 및 메티마졸(methimazole) 조합 효과를 증진시키는 상기 화합물들은 미페프리스톤(mifepristone), 바클로펜(baclofen), 소르비톨(sorbitol), 날트렉손(naltrexone), 라파마이신(rapamycin), 플루르비프로펜(flurbiprofen) 및 케토프로펜(ketoprofen)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이다.
- [0046] 본 발명의 변형예로서, 상기 필로카핀(pilocarpine) 및 메티마졸(methimazole) 혼합물이 CMT 또는 관련 장애 치료를 위하여 1개의 추가적인 화합물, 바람직하게는, 미페프리스톤(mifepristone) 또는 바클로펜(baclofen)과 조합하여 사용되는 것이다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 변형예로서, 상기 필로카핀(pilocarpine) 및 메티마졸(methimazole) 혼합물이 2개의 추가적인 화합물들, 바람직하게는, 미페프리스톤(mifepristone) 및 소르비톨(sorbitol)과 조합하여 사용되는 것이다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 변형예로서, 상기 필로카핀(pilocarpine) 및 메티마졸(methimazole) 혼합물이 3개의 추가적인 화합물들, 바람직하게는, 미페프리스톤(mifepristone) 및 소르비톨(sorbitol)이 바클로펜(baclofen), 라파마이신(rapamycin), 케토프로펜(ketoprofen) 또는 플루르비프로펜(furbiprofen)으로부터 선택된 제 3 화합물과 조합한 조합물로 구성된 것이다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 변형예로서, 상기 필로카핀(pilocarpine) 및 메티마졸(methimazole) 혼합물이 4개의 추가적인 화합물들, 바람직하게는, 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol), 바클로펜(baclofen) 및 날트렉손(naltrexone) 또는 라파마이신(rapamycin); 또는 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol), 날트렉손(naltrexone) 및 라파마이신(rapamycin)과 조합되는 것이다.
- [0050] 본 발명은 추가적으로 효과적인 양의 무스카린성 수용체 작용제 (muscarinic receptor agonist) 또는 이의 전구

약물 및 갑상선 호르몬 합성 (thyroid hormone synthesis) 저해제 또는 이의 전구약물 조합을 요구되는 객체에 투여함을 포함하는, CMT 또는 관련 장애를 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

- [0051] 본 발명은 추가적으로 효과적인 양의 필로카핀 (pilocarpine) 또는 이의 전구약물 및 메티마졸 (methimazole) 또는 이의 전구약물 조합을 요구되는 객체에 투여함을 포함하는, CMT 또는 관련 장애를 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0052] 본 발명은 추가적으로 효과적인 양의 필로카핀 (pilocarpine) 및 메티마졸 (methimazole)과 1개의 추가적인 활성 화합물, 바람직하게는, 라파마이신(rapamycin), 바클로펜(baclofen), 소르비톨(sorbitol), 미페프리스톤 (mifepristone), 날트렉손(naltrexone), 플루르비프로펜(flurbiprofen) 및 케토프로펜(ketoprofen)으로 구성된 군으로부터 선택된 화합물과의 조합을 요구되는 객체에 투여함을 포함하는, CMT를 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 변형예로서, 본 발명은 효과적인 양의
- [0054] (1) 필로카핀(pilocarpine), 메티마졸(methimazole) 및 바클로펜(baclofen), 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol) 및 날트렉손(naltrexone)으로부터 선택된 1개 이상의 추가적인 화합물과의 조합;
- [0055] (2) 필로카핀(pilocarpine), 메티마졸(methimazole) 및 바클로펜(baclofen);
- [0056] (3) 필로카핀(pilocarpine), 메티마졸(methimazole) 및 미페프리스톤(mifepristone);
- [0057] (4) 필로카핀(pilocarpine), 메티마졸(methimazole), 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol) 및 바클로펜(baclofen);
- [0058] (5) 필로카핀(pilocarpine), 메티마졸(methimazole), 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol) 및 라파마이신(rapamycin);
- [0059] (6) 필로카핀(pilocarpine), 메티마졸(methimazole), 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol) 및 케토프로펜(ketoprofen);
- [0060] (7) 필로카핀(pilocarpine), 메티마졸(methimazole), 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol) 및 플루르비프로펜(flurbiprofen);
- [0061] (8) 필로카핀(pilocarpine), 메티마졸(methimazole), 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol), 바클로펜(baclofen), 및 날트렉손(naltrexone);
- [0062] (9) 필로카핀(pilocarpine), 메티마졸(methimazole), 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol), 바클로펜(baclofen), 및 라파마이신(rapamycin);
- [0063] (10) 필로카핀(pilocarpine), 메티마졸(methimazole), 미페프리스톤(mifepristone), 소르비톨(sorbitol), 날트렉손(naltrexone) 및 라파마이신(rapamycin);
- [0064] (11) 메티마졸(methimazole) 및 바클로펜(baclofen);
- [0065] (12) 메티마졸(methimazole) 및 세비멜린(cevimeline) 또는
- [0066] (13) 필로카핀(pilocarpine) 및 프로필티오우라실(propylthiouracil) 조합을 요구되는 객체에 투여함을 포함하는, CMT를 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0067] 본 발명은 임의의 포유동물 객체, 특히 인간 객체에서의 CMT 또는 관련 장애를 치료하는 데 사용가능하다. 이는 특히 CMT1a을 치료하는데 적합하다.
- [0068] 이러한 측면에서, 본 발명의 구체적 목적으로서, 본 발명은 효과적인 양의 필로카핀(pilocarpine), 또는 이의 전구약물, 및 메티마졸(methimazole), 또는 이의 전구약물 조합을 객체에 투여함을 포함하는 객체에서의 CMT1a을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0069] 본 발명의 또 다른 목적으로서, 본 발명은 (1) 객체가 CMT1a을 보유하는지 여부를 측정하는 제 1단계 및 (2) 효과적인 양의 필로카핀(pilocarpine), 또는 이의 전구약물, 및 메티마졸(methimazole), 또는 이의 전구약물 조합으로 객체를 치료하는 제 2단계를 포함하는, CMT1a을 치료하는 방법을 제공한다. 객체가 CMT1a을 보유하는지 여부를 측정하는 단계는 DNA 어세이법과 같은 당업계에 잘 알려진 다양한 시험법에 의하여 수행가능하다.

- [0071] 본 발명은 CMT 또는 관련 장애를 치료하기 위한 새로운 치료학적 접근법을 제공한다. 본 발명은 상기 질환을 효과적으로 치료가 가능하고 어떠한 포유동물 객체에서도 사용가능한 공지 약물로 제조된 조성물 및 이들의 신규 용도를 개시한다.
- [0072] 본 발명의 범위 내에서, 용어 "CMT 관련 장애 (CMT related disorder)"는 유전적 및 후천적인 모든 기타 말초성 신경병증들을 의미한다.
- [0074] CMT의 주요 형태인 CMT1A는 PMP22 유전자의 복제에 기인한 것이다. PMP22는 말초 신경계에서 필수적으로 모든 미엘린화 섬유의 밀집된 부위에서 발현되는 미엘린의 주요 구성요소이다. PMP22 단백질은 다른 구조적 미엘린 단백질인 P0와 상호작용함으로써 변환된 PMP22/P0 단백질 비는 미엘린 수초의 밀집에 영향을 미칠 수 있다 (Vallat et al., 1996; D'Urso et al., 1999). 시험관내 시험법에서 입증되는 바와 같이, PMP22 단백질은 또한 Rho-의존적으로 확산하여 축색돌기 외피화에 영향을 미칠 수 있는 세포 증식 조절과 관련된다(Brancolini et al., 1999). 게다가, PMP22는 $\alpha 6\beta 4$ 인티그린(integrins)과의 복합체를 형성하고 슈완세포의 세포외 매트릭스와의 상호작용을 매개할 수 있다(Amici et al., 2006; Amici et al., 2007). 게다가, 증가된 양의 PMP22 단백질은 Arf6-조절된 혈장막 엔도솜 회수 경로(endosomal recycling pathway)를 변형시켜 후기 엔도솜에서의 PMP22의 축적을 초래한다 (Chies et al., 2003). 또한 과발현된 PMP22 단백질이 세포간 단백질 분류를 중요하게 하여 슈완세포에서 단백질 분해 과정에 과부하를 발생시키는 입증되었다 (Notterpek et al., 1997; Tobler et al., 2002; Fortun et al., 2003; Fortun et al., 2006; Fortun et al., 2007; Khajavi et al., 2007). 결론적으로, PMP22는 세포 증식 및 프로그램화된 세포사의 조절과 직접적으로 관련되며 (Sancho et al., 2001; Atanasoski et al., 2002) 변이성 PMP22 단백질은 축색돌기 이온 채널의 심오한 재조립 및 비정상적 발현을 야기시키는 것으로 알려졌다(Ulzheimer et al., 2004; Devaux & Scherer, 2005).
- [0075] 결론적으로 본원에서 정의되는 용어 "CMT 관련 장애"는 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)와 같은 말초성 장애, 중독성 신경병증 (toxic neuropathy), 특발성 신경병증 (idiopathic neuropathy), 당뇨병성 신경병증 {diabetic neuropathy}, 암 및 HIV 유도 신경병증(cancer and HIV induced neuropathies), 갈랑바레 중후군(Guillain-Barre syndrome)을 의미한다.
- [0076] 본 발명의 바람직한 구현예로서, CMT 관련 장애는 HNPP (압박마비유전신경병), CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1X, CMT2A, CMT2B, CMT2D, CMT2E, CMT2-P0, 중증 말이집탈락성 신경병증 DSS(Dejerine-Sottas syndrome), CHN(선천성 저수초화 신경병증; congenital hypomyelinating neuropathy), CMT4A, CMT4B1, CMT4B2, CMT4D, CMT4F, CMT4, AR-CMT2A, HSN1을 포함하는 말이집탈락성 신경병증(demyelinating neuropathies)과 같은 신경병증을 의미한다 .
- [0077] 본 발명은 특히 CMT1A 치료에 적합하다.
- [0078] 본원에서 사용되는 바와 같이, 장애의 "치료법(treatment)"는 상기 장애에 의하여 야기되는 통증의 치료 (therapy), 예방(prevention), 예방조치 (prophylaxis), 지연 (retardation) 또는 경감 (reduction)을 포함한다. 용어 "치료법 (treatment)"는 특히 질환 진행 및 수반된 증상의 조절을 포함한다.
- [0080] 또한 상기 용어 "화합물 (compound)" 본원에서 특별하게 명명된 화학적 화합물뿐만 아니라 이의 허용가능한 염 (salt), 수화물(hydrate), 에스테르체(ester), 에테르체(ether), 이성체(isomers), 라세믹체(racemate), 접합체(conjugates), 전구약물(pro-drugs)를 갖는 임의의 약학적 조성물을 의미한다.
- [0082] 또한 상기 용어 "조합(combination)"은 생물학적 효과가 유발하게 하기 위해 2개 이상 약물을 객체에 공동투여되는 치료를 의미한다. 조합치료법으로서, 상기 2개 이상 약물들은 동시에 또는 연속적으로 같이 또는 개별적으로 투여될 수 있다. 또한 상기 2개 이상 약물들은 서로 상이한 투여경로 및 프로토콜을 통하여 투여가능하다.
- [0084] 본 발명은 CMT 또는 CMT 관련 장애는 약물들의 특정 조합으로 치료가 가능하다. 보다 구체적으로, 본 발명은 메티마졸(methimazole) 및 필로카핀(pilocarpine) 화합물을 조합(들)시에 CMT 또는 CMT 관련 장애를 치료하는데

사용가능하다. 이와 관련되어, 본 발명의 실험 결과는 메티마졸(methimazole) 및 필로카핀(pilocarpine) 화합물 조합이 래트 슈완세포(rat Schwann cell)에서의 PMP22 유전자의 RNA 발현 수준을 유의적으로 감소시킴을 확인시켜 주었다. 게다가, 인간 CMT 질병을 모델링(modelling)하는 PMP22 유전자이식(transgenic) 래트를 메티마졸(methimazole) 및 필로카핀(pilocarpine) 화합물들을 포함하는 조합으로 매일 처치하였다. 행동학적 종료시점상의 유의적인 개선이 관찰되었다.

[0086] 필로카핀: (3S,4R)-3-에틸-4-[(3-메틸이미다졸-4-일)메틸]옥솔란-2-온

[0088] 본 약물, C₁₁H₁₆N₂O₂은 두경부암의 방사선 치료에 기인한 침샘 기능 저하에 의한 구강 건조증 증상 치료; 및 (ii) 쇼그렌 증후군 환자의 구강 건조증 치료에 대한 승인을 받은 약물이다.

[0089] 무스카린성 수용체 작용제는 평활근 섬유 수축 (소화기관, 안구, 기관)을 유발하고 발한작용, 침, 기관지 및 위에서의 분비를 자극시킨다. 게다가, 이는 복잡한 심혈관 작용을 나타내고, 부교감 신경양 작용 (혈관확장) 흥분성 신경절 과정을 자극시킨다.

[0090] 본 발명자는 무스카린성 작용제인 필로카핀이 시험관내 시험에서 슈완세포의 PMP22 단백질 발현을 감소시킴을 증명하였다. 본 발명자는 필로카핀에 의한 무스카린성 수용체의 자극이 -아마도 복잡한 분자 기전 집합체를 통하여- Erk/Akt 활성의 세포내 균형상의 이동을 유도하고, 이는 반대로 미엘린-수반 단백질 마커(marker) 발현을 보다 확연한 Erk 신호 전달을 나타내도록 조절한다 (Ogata et al., 2004).

[0091] 어떠한 이론에 얽매이지 않는 범위 내에서, 무스카린 수용체의 자극은 몇몇 수반되는 기전에 의하여 Akt 및 Erk 키나제(kinase) 활성을 변화시킬 수 있는 것으로 추정된다 (Ma et al., 2004; Anger et al., 2007). 예를 들어, 무스카린 수용체는 저해성 티로신 탈인산화 과정(tyrosine dephosphorylation) 저해를 촉진시키거나 또는 PKC에 의한 저해성 IRS-1의 세린 인산화 공정 (serine phosphorylation)을 촉진시킴으로서, PDGF 수용체가 아닌, IGF-1에 의한 신호전달과정을 선택적으로 차단할 수 있다. 따라서 무스카린 수용체는 Src-유사(like) Fyn 키나제(kinase)을 통하여 ERK 신호전달의 세포내 전이활성(intracellular transactivation)을 매개가능하고; 또한 아데닐사이클라제(adenylate cyclase) 활성을 감소시킴으로서, 무스카린 수용체는 PKA-매개성(mediated) 기전을 통한 Akt/Gsk-3 β 및 Erk 키나제의 기능적 조절과 관련될 수 있다. 최종적으로, 무스카린 수용체들의 자극은 - AMPK의 활성화를 통하여 - Akt의 탈인산화를 일시적으로 유발시켜 β -카테닌(catenin)의 세포간 풀 (intracellular pool)을 감소시킬 수 있음이 입증되었다 (Batty et al., 2004; King et al., 2006).

[0092] 결론적으로, 세비멜린(Cevimeline; CAS number 107233-08-9), 카바콜(Carbamol; CAS number 51-83-2), 메타콜린(Methacholine; CAS numbers 55-92-5) 및 베타콜(Bethanechol; CAS number 674-38-4)과 같은 기타 무스카린 수용체 작용제들도 당연히 사용가능하다.

[0094] 메티마졸(Methimazole) : 1-메틸-3H-이미다졸-2-티온

[0095] 메티마졸은 요오드화물(iodide)를 요오드(iodine)으로 전환시키고 얻어진 요오드 분자를 티로신의 페놀 환에 삽입시키는 작용을 촉매화하는 티로이드 퍼옥시다제(thyroid peroxidase)의 활성을 차단시킴으로서 새로운 갑상선 호르몬의 생성을 차단시킨다. 따라서, 메티마졸은 갑상선 호르몬 수용체의 전이 활성을 효과적으로 감소시킬 수 있다.

[0096] 추가적으로, 메티마졸은 프로스타글란딘(prostaglandin) H 신타제(synthase) 활성을 경감시킴으로서 프로스타글란딘 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Zelman et al., 1984). 프로스타글란딘- 이들의 동족 GPCR 수용체를 통하여- Akt 신호 전달 경로 활성을 증폭시킬 수 있으며, 이는 미엘린-관련(myelin-related) 단백질의 발현을 촉진시킨다(Ogata et al., 2004; Castellone et al., 2006). 결론적으로, 갑상선 호르몬 합성 저해 및 프로스타글란딘 합성 또는 신호전달 과정에 영향을 미치는 화합물들은 특히 본 발명에서의 사용이 유리하다.

[0098] 메티마졸의 작용 기전과 관련된 기타 화합물로는 카비마졸(carbimazole; 메티마졸의 전구약물-CAS number 22232-54-8) 및 프로필티오우라실 (propylthiouracil; CAS number 51-52-5), 및 아미오다론(amiodarone; CAS

number 1951-25-3)을 들 수 있다.

- [0099] 실시예에 개시된 바와 같이, 메티마졸 및 필로카핀 화합물들은 CMT에 대하여 상승된 치료효과를 유도하는 조합된 작용을 발휘하며, 이는 감소된 부작용을 갖도록 저용량의 효과적인 치료 용량을 가능하게 한다.
- [0100] 본 발명의 특정한 구현예로서, 본 발명은 CMT 또는 관련 장애, 특히 CMT1A 치료를 위한, 메티마졸 및 필로카핀 화합물 및 상기 조합의 활성을 증진시킬 수 있는 1개 이상의 제 3의 화합물을 포함하는 조합 치료법을 제공한다.
- [0101] 본 발명의 특정한 구현예로서, 본 발명은 ALS을 치료하기 위한, 메티마졸 및 필로카핀 화합물 및 상기 조합의 활성을 증진시킬 수 있는 1개 이상의 제 3의 화합물을 포함하는 조합 치료법을 제공한다.
- [0102] 본 발명의 또 다른 특정한 구현예로서, 본 발명은 독성 신경병증(toxic neuropathy)을 치료하기 위한, 메티마졸 및 필로카핀 화합물 및 상기 조합의 활성을 증진시킬 수 있는 1개 이상의 제 3의 화합물을 포함하는 조합 치료법을 제공한다.
- [0103] 본 발명의 특정한 구현예로서, 본 발명은 CMT 또는 관련 장애 치료를 위한, 메티마졸 및 필로카핀 화합물 만을 사용하는 치료법을 제공한다.
- [0104] 본 발명의 또 다른 특정한 구현예로서, 본 발명은 CMT 또는 관련 장애 치료를 위한, 메티마졸 및/또는 필로카핀을 적어도 1개 이상의 추가적인 화합물과 조합하여 사용하는 치료법을 제공한다. 본 발명의 바람직한 구현예로서, 상기 적어도 1개 이상의 화합물은 표 1에 나열된 화합물군으로부터 선택되는 것이다.
- [0105] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 본 발명은 표 1에 개시된 임의의 화합물 조합을 함유하는 산물 또는 조성물을 제공한다.
- [0106] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 본 발명은 표 1에 개시된 임의의 화합물 조합을 포함하는 CMT 또는 관련 장애를 치료하기 위한 조합 치료법을 제공한다.
- [0107] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 본 발명은 표 1에 개시된 임의의 화합물 조합을 포함하는 ALS를 치료하기 위한 조합 치료법을 제공한다.
- [0108] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 본 발명은 표 1에 개시된 임의의 화합물 조합을 포함하는 독성 신경병증(toxic neuropathy)을 치료하기 위한 조합 치료법을 제공한다.
- [0109] 본 발명에 따른 치료법은 임의의 기타 치료법과 선택적으로 연계되는, 약물 조합으로 수행되는 것이다.
- [0110] 이는 의사가 가깝게 치료 효과를 관찰하고 필요한 어떠한 추가 처치도 가능하도록 가정, 병원, 임상병원, 병원의 환자 병동 또는 병원에서 수행가능하다.
- [0112] 본 치료법의 기간은 치료할 병의 위중 정도, 환자의 나이 및 상태, 치료에 대한 환자의 반응정도에 의존한다.
- [0114] 추가적으로, 추가적인 신경병 장애로 진행할 위험성이 큰 개인 (예를 들어, 유전적으로 예를 들어, 당뇨병이 예정되거나 앓고 있거나, 발암 상태 치료요법 하에 있는 사람)은 궁극적으로 신경병성 반응의 유발을 경감시키거나 또는 지연시키기 위한 예방학적 치료법을 수용할 수도 있다.
- [0116] 상기 조합의 개개 구성요소의 투여용량, 빈도 및 투여경로는 각각 독립적으로 조절가능하다. 예를 들어, 제 2차 약물이 근육내로 투여되는 반면에 제 1차 약물은 경구 투여될 수도 있다. 상기 조합 치료법은 환자 신체가 예기치 못한 부작용으로부터 회복될 기회를 주기 위하여 휴식 기간을 포함시키는 것과 같은 단속적 주기가 부여될 수도 있다. 상기 약물은 또한 한 번의 약물 투여가 모두의 약물을 전달하도록 같이 포함시켜 제형화될 수 있다.

[0118] 약학 조성물의 제형화

- [0120] 상기 조합 치료법에서 개개 약물의 투여는 기타 구성요소와 조합하여 말초신경에 미치는 PMP22의 상승된 발현에 의한 효과를 교정할 수 있는 정도의 약물 농도가 될 수 있는, 어떠한 적합한 수단으로도 가능하다.
- [0121] 상기 조합의 활성 성분이 순수 화학물질 형태로 투여되도록 함도 가능하지만, 본원에서 약학 제형 (pharmaceutical formulation)으로도 지칭되는 약학조성물(pharmaceutical composition) 형태로 투여됨이 바람직하다.
- [0122] 가능한 조성물로는 경구투여(oral), 직장투여(rectal), 국소투여(topical) (경피투여, 구강투여 및 설하투여 포함), 또는 비경구투여(parenteral) (피하 투여, 근육내 투여, 정맥내 투여 및 피내투여)에 적합한 조성물을 포함하는 것이다.
- [0123] 보다 통상적으로, 이러한 제형들은 단일 패키지(single package), 대개, 블리스터 팩(blister pack)으로 떨어진 치료 기간동안 사용하기 위한 계량 투여단위 용량으로 투여하기 위한 몇몇 투여 단위 또는 기타 수단을 포함하는 "환자용 팩(patient packs)" 형태로 환자에게 처방된다. 환자용 팩은 통상적으로 종래 처방법으로는 분할할 수 있는 처방을 혼자용 팩에 포함된 패키지 삽입물(package insert)로의 접근이 쉽도록 한 점에서 약사가 환자에게 대용량을 소분하는 기존 종래 처방법보다 우수한 장점을 갖는다. 패키지 삽입물의 내용물은 의사 지시에 따른 환자의 순응도를 개선시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명은 본원에서 전술한 바대로, 상기 제형에 적합한 포장 재료와 조합한 약학제형을 추가로 포함한다. 이러한 환자용 팩에서, 조합 치료법을 위한 의도된 사용은 치료에 가장 적합한 제형을 이용하여 도움을 주기 위한 지시내용, 사용법, 규정, 적용법 및/또는 기타 수단에 의하여 추론될 수 있을 것이다. 이러한 척도들은 환자용 팩을 본 발명의 조합에 의한 치료 용도에 구체적으로 적합하고 적용되도록 할 수 있게 한다.
- [0125] 본 약물은 임의의 적당한 양의 임의의 적합한 담체 물질을 포함할 수 있으며 상기 조성물 총 중량의 1-99% 함량으로 존재할 수 있다. 상기 조성물은 경구투여(oral), 비경구투여(parenteral) (예를 들어 정맥내 투여 (intravenously), 근육내 투여(intramuscularly)), 직장투여(rectal), 경피투여(cutaneous), 비강투여 (nasal), 질내투여(vaginal), 흡입투여(inhalant), 피부투여(skin; 패취형(patch)), 또는 안구내 투여(ocular administration) 경로 투여용으로 적합한 투여 형태로 제공될 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 예를 들어, 정제 (tablets), 캡슐제 (capsules), 환제(pills), 산제(powders), 과립제(granulates), 현탁제(suspensions), 에멀전제(emulsions), 액제(solutions), 히드로겔(hydrogels) 포함 겔제(gels), 반죽형(pastes), 연고(ointments), 크림(creams), 반창고 (plasters), 드렌지형(drenches), 삼투성 전달 기구(osmotic delivery devices), 좌제 (suppositories), 관장제(enemas), 주사제(injectables), 임플란트제 (implants), 스프레이제(sprays), 또는 에어로졸제(aerosols)의 형태일 수 있다.
- [0127] 상기 약학 조성물은 고전적인 약학 기법에 따른 제형화가 가능하다 (예를 들어, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th Ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York 참고).
- [0129] 본 발명에 따른 약학 조성물은 실질적으로 투여 즉시 또는 투여후 임의의 예정된 시간 또는 투여후 방출 계획 시점에서 방출되도록 제형화가 가능하다.
- [0131] 본 발명의 서방형 제형으로는 (i) 신체 내에서 초과 기간 또는 연장된 기간 동안 실질적으로 고정된 약물 농도를 창제하는 제형; (ii) 예정된 지체된 시간 이후에, 신체 내에서 초과 기간 또는 연장된 기간 동안 실질적으로 고정된 약물 농도를 창제하는 제형; (iii) 약물 활성 물질의 혈장 농도상의 변동에 수반되는 바람직하지 않은 부작용의 수반되는 최소화 목적으로 신체 내에서 상대적으로 고정되고 유효한 약물 농도를 유지함으로써 예정된 기간 동안 약물 작용을 유지시키는 제형; (iv) 예를 들어, 병든 조직 또는 기관 내 또는 이들에 인접한 장소로의 서방성 조성물을 공간상 위치시키는 것과 같이 약물 작용을 국소화시키는 제형; 및 (v) 약물의 특정 목표 세포 유형으로 전달하기 위하여 담체 또는 화학적 유도체를 이용함으로써 약물 작용을 목표화하는 제형을 포함하는 것이다.

[0133] 서방형 형태의 약물 투여는 특히 바람직하게는 약물이 단독 또는 조합하여 (i) 좁은 치료 지수(therapeutic index) (즉, 위대한 부작용 또는 독 작용을 초래하는 혈장 농도 및 치료학적 효과를 초래하는 혈장 농도간의 차이가 작은 것으로; 대개, 치료 지수(therapeutic index, TI)는 중간 유효량(median effective dose, ED₅₀)에 대한 중간 치사량(median lethal dose, LD₅₀)의 비율로 정의된다); (ii) 위장관에서의 좁은 흡수 창(absorption window); 또는 (iii) 일일 동안 투여 빈도가 치료학적 수준으로 혈장 농도가 유지되게 하기 위하여 요구되도록 매우 단기간의 생물학적 반감기를 갖는 것이다.

[0135] 방출 속도가 문제의 약물의 농도 대사율을 초과한 서방성 방출을 위하여 수많은 방법이 모색가능하다. 서방형 방출은 예를 들어, 다양한 형태의 서방성 조성물 및 코팅법을 포함하는, 다양한 제형 매개변수 및 성분을 적절하게 선택함으로써 수득가능하다. 따라서, 본 약물은 투여시 약물을 조절가능하게 (단일 또는 복수 단위 정제 또는 캡슐제(capsule) 조성물, 오일 액제(oil solutions), 현탁제(suspensions), 에멀전(emulsions), 미세캡슐제(microcapsules), 미세구(microspheres), 나노입자(nanoparticles), 패취(patches), 및 리포솜(liposomes)) 방출할 수 있도록 적절한 부형제로 약학 조성물로 제형화가 가능하다.

[0137] 경구 투여용 고체상 투여 형태

[0138] 경구용 제형은 비독성의 약학적으로 허용가능한 부형제와 함께 혼합된 활성 성분(들)을 포함하는 정제를 포함한다. 이러한 부형제(excipients)로는 예를 들어, 무활성 희석제(diluents) 또는 충전제(fillers) (예를 들어, 수크로스(sucrose), 미세결정성 셀룰로오스(microcrystalline cellulose), 감자 전분을 포함하는 전분(starches), 탄산 칼슘(calcium carbonate), 염화 나트륨(sodium chloride), 인산 칼슘(calcium phosphate), 황산 칼슘(calcium sulfate), 또는 인산 나트륨(sodium phosphate)); 과립화제(granulating) 및 붕해제(disintegrating agents) (예를 들어, 미세결정성 셀룰로오스를 포함한 셀룰로오스 유도체(cellulose derivatives), 감자 전분을 포함한 전분(starches), 크로스카멜로오스 나트륨(croscarmellose sodium), 알지네이트(alginates), 또는 알긴 산(alginic acid)); 결합제(binding agents) (예를 들어, 아카시아(acacia), 알긴산(alginic acid), 알긴산 나트륨(sodium alginate), 젤라틴(gelatin), 전분(starch), 전호화분 녹말(pregelatinized starch), 미세결정성 셀룰로오스(microcrystalline cellulose), 카복시메틸셀룰로오스 나트륨(carboxymethylcellulose sodium), 메틸셀룰로오스(methylcellulose), 히드록시프로필 메틸셀룰로오스(hydroxypropyl methylcellulose), 에틸 셀룰로오스(ethylcellulose), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 또는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)); 및 윤활제(lubricating agents), 활택제(glidants), 및 항점착제(antiadhesives) (예를 들어, 스테아린 산(stearic acid), 실리카(silicas), 또는 탈크(talc))일 수 있다. 기타 약학적으로 허용가능한 부형제로는 착색제(colorants), 착향제(flavoring agents), 가소제(plasticizers), 가습제(humectants), 완충제(buffering agents), 및 유사체가 있다.

[0139] 상기 정제는 코팅되지 않을 수도 있으며 또한 임의적으로, 위장관에서의 붕해 작용 및 흡수작용을 지연시켜 보다 장기간 지연된 작용을 발휘할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 기술로 코팅될 수 있다. 상기 코팅은 예정된 양상(예를 들어, 서방성 제형을 달성하기 위하여)으로 약물 활성 성분을 방출하도록 적용가능하고 또는 위장관 통과 후까지(장용성 코팅) 약물 활성 성분이 방출되지 않도록 적용가능하다. 상기 코팅은 당 코팅(sugar coating), 필름 코팅(film coating) (예를 들어, 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스(hydroxypropyl methylcellulose), 메틸셀룰로오스(methylcellulose), 티히드록시에틸셀룰로오스(methylhydroxyethylcellulose), 히드록시프로필셀룰로오스(hydroxypropylcellulose), 카복시메틸셀룰로오스(carboxymethylcellulose), 아크릴레이트 공중합체(acrylate copolymers), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycols) 및/또는 폴리비닐피롤리돈 (polyvinylpyrrolidone) 소재의 장용성 코팅(enteric coating) (예를 들어, 메타크릴 산 공중합체(methacrylic acid copolymer), 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트 (cellulose acetate phthalate), 히드록시프로필 메틸셀룰로오스프탈레이트 (hydroxypropyl methylcellulosephthalate), 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 아세테이트 숙시네이트(hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate), 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트(polyvinyl acetate phthalate), 셀락(shellac) 및/또는 에틸셀룰로오스(ethylcellulose) 소재의)일 수가 있다. 예를 들어 글리세릴 모노스테아레이트(glyceryl monostearate) 또는 글리세릴 디스테아레이트(glyceryl distearate)와 같은 시간 지연용 소재가 적용가능하다.

- [0141] 고체상 정제 조성물은 조성물이 원치 않는 화학적 변화 (예를 들어, 약물 활성 성분의 방출 전에 화학적 분해)가 발생하지 않도록 보호하도록 적용된 코팅을 포함할 수 있다. 상기 코팅은 저서(Encyclopedia of Pharmaceutical Technology)에 개시된 바와 유사하게 고체상 투여 형태로 적용될 수 있다.
- [0143] 2개 약물은 정제 내에서 상호 혼합되거나 분배될 수도 있다. 예를 들어, 제 1차 약물은 정제 내면에 포함되고, 제 2차 약물은 제 1차 약물이 방출되기 전에 제 2차 약물의 실질적 부분이 방출되도록 정제 외부에 포함시킬 수도 있다.
- [0145] 또한 경구용 제형은 활성 성분이 비활성 고체상 희석제 (예를 들어, 감자전분, 미세결정성 셀룰로오스, 탄산 칼슘, 인산 칼슘 또는 카올린(kaolin)과 혼합된 저작성 정제(chewable tablets), 또는 경질 젤라틴 캡슐(hard gelatin capsules); 또는 활성 성분이 물 또는 오일상 매체, 예를 들어, 액상 파라핀(liquid paraffin), 또는 올리브 오일(olive oil)과 혼합된 연질 젤라틴 캡슐(soft gelatin capsules)의 형태로 제공될 수 있다. 산제 및 과립제는 고전적 방법으로 상술한 성분을 정제 및 캡슐제 하부에 이용하여 제조가능하다.
- [0147] 경구용 서방성 조성물은 예를 들어, 약물 활성 물질의 용해 및/또는 확산을 조절함으로써 활성 약물을 방출하도록 설계할 수도 있다.
- [0149] 용해 또는 확산 조절용 방출은 약물의 정제, 캡슐제, 펠렛(pellet) 또는 과립화 제형을 적절하게 코팅시키거나 약물을 적절한 매트릭스(matrix)에 혼입시켜 달성가능하다. 서방성 코팅제는 상술한 하나 이상의 코팅용 물질 및/또는 예를 들어, 셸락(shellac), 밀납(beeswax), 글리코왁스(glycowax), 케스터왁스(castor wax), 카나우바 왁스(carnauba wax), 스테아릴 알콜(stearyl alcohol), 글리세릴 모노스테아레이트(glyceryl monostearate), 글리세릴 디스테아레이트(glyceryl distearate), 글리세롤 팔미토스테아레이트 (glycerol palmitostearate), 에틸셀룰로오스(ethylcellulose), 아크릴성 수지(acrylic resins), dl-폴리락트 산(polylactic acid), 셀룰로오스 아세테이트 부티레이트(cellulose acetate butyrate), 폴리비닐 클로리드(polyvinyl chloride), 폴리비닐 아세테이트 (polyvinyl acetate), 비닐 피롤리돈(vinyl pyrrolidone), 폴리에틸렌 (polyethylene), 폴리메타크릴레이트(polymethacrylate), 메틸메타크릴레이트 (methylmethacrylate), 2-히드록시메타크릴레이트 (hydroxymethacrylate), 메타크릴레이트 히드로겔(methacrylate hydrogels), 1,3- 부틸렌 글리콜(butylene glycol), 에틸렌 글리콜 메타크릴레이트(ethylene glycol methacrylate), 및/또는 폴리에틸렌 글리콜 (polyethylene glycols)을 포함할 수 있다. 서방성 방출 매트릭스 제형(controlled release matrix formulation)에서, 상기 매트릭스 소재로는 예를 들어, 함수 메틸셀룰로오스(hydrated metylcellulose), 카나우바 왁스(carnauba wax) 및 스테아릴 알콜(stearyl alcohol), 카보폴(carbopol) 934, 실리콘 (silicone), 글리세릴 트리스테아레이트(glyceryl tristearate), 메틸 아크릴레이트(methyl acrylate)-메틸 메타크릴레이트 (methyl methacrylate), 폴리비닐 클로리드(polyvinyl chloride), 폴리에틸렌(polyethylene), 및/또는 할로젠 화 플루오로카본(halogenated fluorocarbon)을 포함할 수 있다.
- [0151] 청구된 조합의 하나 이상의 약물을 함유한 서방성 조성물은 또한 부유성 정제(buoyant tablet) 또는 캡슐제 (capsule) (즉, 경구 투여시, 특정한 기간 동안 위 내용물 상단에 부유하는 정제 또는 캡슐제)의 형태일 수 있다. 상기 약물의 부유성 정제 제형은 약물 혼합물을 부형제 및 20-75% w/w 함량의 히드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose), 히드록시프로필셀룰로오스(hydroxypropylcellulose), 또는 히드록시프로필메틸셀룰로오스(hydroxypropylmethylcellulose)과 같은 히드로콜로이드(hydrocolloids)로 과립화하여 제조가능하다. 상기 수득된 과립을 정제로 압축가능하다. 위액과 접촉시에, 상기 정제는 그 표면 주위에 실질적으로 수-불투과성 겔 방어벽(water-impermeable gel barrier)을 형성한다. 이러한 겔 방어벽은 정제가 위액에서 부유성을 유지하도록, 1 이하의 밀도를 유지시키는 작용을 갖는다.
- [0152] 경구 투여용 액제

- [0153] 수첨가에 의한 액상 현탁액의 제조에 적당한 산제(Powders), 분산성 산제 (dispersible powders), 또는 과립제 (granules)가 경구 투여용으로 간편한 투여 형태이다. 현탁제로서의 제형은 활성 성분에 분산제(dispersing) 또는 습윤제(wetting agent), 현탁화제 (suspending agent), 및 하나 이상의 방부제(preservatives)와 혼합하여 제조한다. 적당한 현탁화제로는 예를 들어, 소듐 카복시메틸셀룰로오스(sodium carboxymethylcellulose), 메틸셀룰로오스 (methylcellulose), 소듐 알지네이트 (sodium alginate) 등을 들 수 있다.
- [0155] *비경구용 조성물*
- [0156] 또한 약학 조성물은 통상적인, 비독성 약학적으로 허용가능한 담체(carriers) 및 보체(adjuvants)를 함유하는 투여 형태, 제형 또는 적절한 전달 기구 또는 임플란트(implants)를 통하여 주사제(injection), 정맥내 주사 (infusion) 또는 피하주입(implantation) (정맥내(intravenous), 근육내(intramuscular), 피하주사 (subcutaneous) 등)에 의해 비경구적으로 투여 가능하다. 상기 조성물의 제형 및 제제는 약학 제형의 당업계에 종사하는 자에게 잘 알려져 있다.
- [0157] 비경구용 조성물이 몇 가지 용량을 함유하고 적절한 방부제가 첨가 가능한 단위 투여 용량 형태 (예를 들어 단일-용량 앰플 (single-dose ampules)), 또는 바이알(vials) 형태로 제공가능하다 (하기 참조). 상기 조성물은 액제(solution), 현탁제(suspension), 에멀전(emulsion), 피하주입용 정맥내 주사 기구 또는 전달 기구의 형태 일 수 있거나 사용전 수분 또는 기타 적당한 운반체(vehicle)로 제조될 건조 산제 형태로 제공될 수 있다. 활성 약물(들)과 별개로, 상기 조성물은 적당한 비경구적으로 수용가능한 담체 및/또는 부형제를 포함할 수 있다. 상기 활성 약물(들)은 방출 조절을 위하여 미세구(microspheres), 미세캡슐(microcapsules), 나노입자 (nanoparticles), 리포솜(liposomes), 등에 혼입가능하다. 상기 조성물은 현탁화제(suspending), 가용화제 (solubilizing), 안정화제(stabilizing), pH-조절제 (adjusting agents), 및/또는 분산제(dispersing agents)를 포함할 수 있다.
- [0159] 본 발명에 따른 조성물은 멸균 주사용에 적합한 형태일 수 있다. 이러한 조성물을 제조하기 위하여, 적당한 활성 약물(active drug(s))을 비경구용으로 수용 가능한 운반체로 용해 또는 현탁 가능하다. 수분을 적용 가능한 수용 가능한 운반체 및 용매 중에서, 수분은 적당량의 염산, 수산화 나트륨 또는 적당한 완충액, 1,3-부탄디올(butanediol), 링거액(Ringer's solution), 및 등장용 염화 나트륨 용액을 첨가함으로써 적당한 pH로 적정한다. 상기 수성 제형은 하나 이상의 방부제 (예를 들어, 메틸, 에틸 또는 n-프로필 p-히드록시벤조에이트)를 함유할 수도 있다. 상기 약물중 하나가 물에 매우 적게 또는 약간만 용해되는 경우에, 용해 증진제 또는 가용화제를 첨가가능하고 상기 용매는 10-60% w/w의 폴리에틸렌 글리콜 등을 함유할 수 있다.
- [0160] 서방성 비경구적 조성물은 수성 현탁액(aqueous suspensions), 미세구 (microspheres), 미세캡슐 (microcapsules), 자기적 미세구(magnetic microspheres), 오일 용액(oil solutions), 오일 현탁액(oil suspensions), 또는 현탁액(emulsions)의 형태일 수 있다. 호환적으로, 상기 활성 약물은 생분해성 담체 (biocompatible carriers), 리포솜(liposomes), 나노입자(nanoparticles), 임플란트(implants), 또는 정맥 주사 기구(infusion devices)로 혼입가능하다. 미세구 및/또는 미세캡슐 제조에 사용하기 위한 소재로는 예를 들어, 폴리갈락틴 (polygalactin), 폴리(poly)-(이소부틸 시아노아크릴레이트(isobutyl cyanoacrylate)), 폴리 (poly)(2-히드록시에틸(hydroxyethyl)-L-글루타민(glutamine))와 같은 생분해성(biodegradable)/생체흡수성 (bioerodible) 중합체를 사용가능하다. 서방성 비경구적 제형을 제형화시 사용가능한 생분해성 담체로는 탄수화물(carbohydrates) (예를 들어, 텍스트란(dextrans)), 단백질(proteins) (예를 들어, 알부민(albumin)), 지질 단백질(lipoproteins), 또는 항체(antibodies)를 들 수 있다. 임플란트에 사용하기 위한 소재로는 비-생분해성 (non-biodegradable) (예를 들어, 폴리디메틸 실록산(polydimethyl siloxane)) 또는 생분해성(biodegradable) (예를 들어, 폴리(카프로락톤)(poly(caprolactone)), 폴리(글리콜산)(poly(glycolic acid)) 또는 폴리(ortho 에스테르)(poly(ortho esters))일 수 있다.
- [0162] *직장투여용 조성물*
- [0163] 직장투여를 위하여, 조성물을 위한 적당한 투여 형태로는 좌제(에멀전 또는 현탁제 형태), 및 직장용 젤라틴 캡슐(rectal gelatin capsules) (액제 또는 현탁제)을 포함한다. 전형적인 좌제 제형으로서, 활성 약물(들)은 코

코아 버터(cocoa butter), 에스테르화 지방산(esterified fatty acids), 글리세린화 젤라틴 (glycerinated gelatin)과 같은 적절한 약학적으로 수용가능한 좌제 기재 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 다양한 수용성 또는 분산용 기재와 조합된다. 다양한 첨가제, 개선제 또는 계면활성제가 혼입될 수 있다.

[0165] 경피 및 국소용 조성물

[0166] 또한 약학 조성물은 미세구 및 리포솜을 포함하는 통상적인 비-독성 약학적으로 허용가능한 담체 및 부형제를 함유하는 투여 형태 또는 제형으로 경피투여 흡수를 위하여 피부에 국소적으로 투여가능하다. 상기 제형은 크림제(creams), 연고제(ointments), 로션제(lotions), 리니먼트제(liniments), 겔제(gels), 히드로겔제(hydrogels), 액제(solutions), 현탁제(suspensions), 스틱제(sticks), 스프레이제(sprays), 페이스트제(pastes), 플라스틱제(plasters) 및 기타 경피 약물 전달 시스템(transdermal drug delivery systems)을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제로는 유화제(emulsifying agents), 항산화제(antioxidants), 완충화제(buffering agents), 방부제(preservatives), 습윤제(humectants), 투과 증진제(penetration enhancers), 킬레이트화제(chelating agents), 겔-형성화제(gel-forming agents), 연고 기재(ointment bases), 방향제 (perfumes), 및 피부보호제 (skin protective agents)를 포함가능하다.

[0168] 유화제는 자연 발생적 검(예를 들어 아카시아 검 또는 트라카칸트 검)일 수 있다.

[0170] 방부제, 습윤제, 투과 증진제로는 메틸 또는 프로필 p-히드록시벤조에이트(hydroxybenzoate)와 같은 파라벤류(parabens), 및 벤잘코니움 클로리드 (benzalkonium chloride), 글리세린(glycerin), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 요소(urea) 등일 수 있다.

[0172] 피부상의 국소 투여를 위한 상기한 약학 조성물은 또한 치료할 신체 또는 신체 일부와 근접한 곳에 국소 투여하는 데 사용가능하다. 상기 조성물은 직접 적용하거나 또는 드레싱제(dressings)와 같은 특수 약물 전달 기구 또는 호환적으로, 플라스틱제(plasters), 패드(pads), 스폰지(sponges), 스트립(strips), 또는 기타 적당한 탄성 물질로의 적용을 위해 적용가능하다.

[0174] 치료용량 및 치료 기간

[0175] 상기 조합의 약물들은 동일 또는 상이한 약학 제형으로 동시에 또는 연속적으로 투여가능함도 인지되어야 할 것이다. 만일 연속적 투여라면, 제 2차 (또는 추가적) 활성 성분의 투여 지연은 상기 활성 성분의 조합상의 이로운 효과를 소실하지 않아야 한다. 본 발명에 따른 최소한의 요건은 상기 조합이 상기 활성 성분의 조합상의 이로운 효과를 갖는 조합된 용도를 위해 의도되어야 하는 것이다.

[0176] 본 발명의 조합의 의도된 용도는 본 발명의 다른 조합을 이용하는 것에 도움을 주는 설비, 규정, 적용 및/또는 기타 수단에 의하여 추론 가능하다.

[0177] 본 발명의 주제인 치료학적으로 효과적인 양의 2개 이상의 약물들은 PMP22 유전자의 상승된 발현을 감소시키고, CMT1A 질환으로 발전할 위험성을 예방하거나 감소시키며, 일단 CMT1A 질환이 임상적으로 명백한 경우는 CMT1A 질환 진행을 중지시키거나 약화시키고, 신경병증 최초 또는 연속된 발병의 위험성을 예방 또는 감소시키기 위해 유용한 약제 제조를 위하여 같이 사용될 수 있다.

[0178] 본 발명의 활성 약물을 예를 들어, 1일 2회 또는 3회의 분할된 용량으로 투여 가능함에도 불구하고, 조합된 개개 약물을 1일 1회 투여함이 바람직하고, 단일 약학 조성물 (단위 투여 형태)의 1일 1회 투여하는 것이 가장 바람직하다.

[0179] 투여 기간은 수일 동안 1회 또는 수회 투여가능하고, 심지어 환자가 일생동안 투여가능하다. 만성 또는 적어도 주기적으로 반복적인 장기간 투여가 대부분 고지될 것이다.

[0180] 본원에서 용어 "단일 투여 형태(unit dosage form)"는 인간 객체를 위한 단일 투여량에 적합 가능한 물리적으로 구분된 단위(예를 들어, 캡슐제, 정제 또는 적재된 주사 실린더 형태)를 의미하고, 개개 단위는 요구되는 약학

담체와 함께, 원하는 치료학적 효과를 달성하기 위하여 활성 물질 또는 계산된 활성 물질의 예정된 양을 포함하는 것이다.

- [0182] 단위 투여량을 위하여 바람직한 상기 조합의 개개 약물의 양은 치료할 개인의 전반적인 건강 상태를 고려하여, 투여 방법, 환자의 체중 및 연령, CMT1A 질환으로 야기된 신경병증성 손상의 심각도 또는 잠재적 부작용 위험성에 따라 좌우될 것이다.
- [0183] 추가적으로, 특정 환자에 대한 약제유전체학 (치료의 약물동력학, 약력학적 또는 유효성 양태의 유전자형 효과) 은 사용된 투여 용량에 영향을 미칠 수 있다.
- [0184] 보다 고용량의 투여가 요구되는 특히 손상된 CMT 질환 상황에 반응하는 경우 또는 보다 저용량이 선택되어야 하는 소아 치료 경우를 제외하고, 상기 조합의 개개 약물의 바람직한 투여용량은 장기간 치료요법 또는 임상 3상 시험에서 입증된 당업계 통상적으로 처방되는 용량을 초과하지 않는 범위 이내 여야 할 것이다.
- [0186] 예를 들어,
- [0187] (1) 메티마졸은 경구투여시, 약 0.5 내지 약 15mg /일 범위내이다. 특정 용량은 국소적으로 투여시에 선택되어야 할 것이다.
- [0188] (2) 필로카핀은 경구투여시, 약 0.1 내지 약 20mg /일 범위내이다.
- [0189] (3) 화합물 B는 경구투여시, 약 2 내지 약 20mg /일 범위내이다. 가장 바람직한 투여용량은 장기간 유지 치료에 통상적으로 처방되는 용량의 1% 내지 10% 에 상응하는 양이다.
- [0190] 실제 투여되는 약물의 양은 병적 상태를 포함한 관련 상황 또는 치료할 대상의 상태, 투여될 정확한 조성물, 개개 환자의 연령, 체중 및 반응도, 환자 증상의 심각도 및 투여 선택경로를 감안하여 의사에 의하여 결정되는 것으로 이해되어야 할 것이다. 결국, 상기 투여 용량 범위는 본원에서의 전반적인 지침 및 교시하고 있는 근거를 제공하도록 의도된 것이나, 본 발명의 범위는 이에 제한되지는 않는다.
- [0192] 치료 일정, 투여용량 및 투여경로
- [0193] 하기에 인간에서 약물 조합에 대한(투여경로 상에서 상이함) 투여용량에 대하여 개시한다.
- [0194] 메티마졸 및 필로카핀
- [0195] 1. 단일 약학 조성물로서의 경구투여시: 수개월 동안 경구로 매일 메티마졸은 약 0.5 내지 약 15mg이고 필로카핀은 0.1 내지 약 20mg이며 조성물중 2개 약물에 대한 가장 바람직한 투여용량은 0.6 내지 35mg/단위/일 범위이다.
- [0196] 2. 수개월간 경구 동시 투여시: 수개월 동안 경구로 매일 메티마졸은 약 0.1 내지 약 15mg이고 필로카핀은 0.02 내지 약 20mg이며 조성물중 2개 약물에 대한 가장 바람직한 투여용량은 1.02 내지 35mg/단위/일 범위이다.
- [0197] 3. 수개월간 동시 투여시: 수개월 동안 경구로 매일 메티마졸은 약 0.05 내지 약 15mg이고 필로카핀은 0.01 내지 약 20mg이며 조성물중 2개 약물에 대한 가장 바람직한 투여용량은 0.06 내지 35mg/단위/일 범위이다.
- [0199] 본원에서 개시된 내용중 임의 조합에서의 이러한 약물의 투여용량은 남자 또는 여자 치료를 위해 제시된 제형에서 상이할 수 있다.
- [0200] 본 발명의 추가적인 측면 및 이점은 단지 예시적인 것으로 간주되어야 할, 하기한 실시예에서 구체적으로 개시될 것이다.

발명의 효과

- [0202] 본 발명은 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 관련 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법

에 관한 것으로, 본 발명은 CMT 또는 관련 장애의 치료 및 예방에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0204]

본 발명의 상기한 목적들 및 장점들은 하기의 발명의 상세한 설명뿐만 아니라, 명세서 전반에 걸친 실시되는 일부들을 의미하는 참고 기호 및 이에 제한되지 않은 첨부되는 하기 도에 대한 설명란을 고려한다면 보다 명확히 설명될 것이다.

도 1은 상대수준을 화합물 A 및 B로 24시간 처치후, 1차 래트 슈완 세포에서의 PMP22 mRNA 발현율을 백분율(%)로 표시한 도이며(좌측은 1 mM 또는 1 micromole 화합물 A (메티마졸)을 24시간 처치 후, PMP22 mRNA 수준의 %이며, PMP22 mRNA가 1차 슈완 세포에서 유의적으로 감소하고 저용량의 화합물 A가 대조군과는 유의적으로 상이하게(*: p<0.05; ***: p<0.001) 가장 중요한 PMP22 하위-조절을 유도함을 확인함(쌍체 스튜던트(pairwise student) t 검정법(test)). 우측에서는 화합물 B(필로카핀)에 24시간 노출 후에, 발현의 PMP22 mRNA 수준이 매우 적은 용량(10nM 및 50nM)에서 1차 슈완 세포에서 유의적으로 하위-조절됨. 유사하게, 화합물 B (1 μM)가 배양 24시간 후에 발현의 PMP22 단백질 수준을 1차 슈완 세포에서 38%로 유의적으로 감소시킴을 확인하고 이러한 효과는 배양 48시간 후에도 유의적으로 나타남 (-18%, p<0.001));

도 2은 RT4-D6P2T 슈완노마 세포(schwannoma cells)에서의 RT-Q-PCR 로 정량화된 PMP22 mRNA 발현 수준에 대한 선별된 약물의 효과를 나타낸 도이며(***:p<0.0001)(이는 대조군(약물 없음)과 유의적으로 상이하고 $\Delta\Delta$ Ct 값상에서 이측 스튜던트(Bilateral Student's) t 검정법);

도 3은 경향(trend)의 형태로 제시된 치료 연구를 통하여 막대-시험법(Bar-test)에서의 암컷 래트(rat)의 운동성 측정법(motor assessment) 결과를 나타낸 도이며 (WT placebo: 플라세보(placebo)로 처치된 정상 래트(normal rats) ;TGplacebo: 플라세보(placebo)로 처치된 대조용 형질전환 래트(control transgenic rats), TGptx25: 음성대조용 물질(negative control substance)로 처치된 형질전환 래트, TGA: 0.2mg/kg 메티마졸로 매일 처치된 형질전환 래트; TGB: 0.35 mg/kg 필로카핀으로 매일 처치된 형질전환 래트);

도 4은 20주간 약물로 처치한 CMT 래트에서의 감각신경 전위증폭(sensitive nerve potential amplitude)의 전기 생리학적 측정 결과이며 (TGplacebo: 플라세보(placebo)로 처치된 대조용 형질전환 래트(control transgenic rats), TGptx25: 음성대조용 물질(negative control substance)로 처치된 형질전환 래트, TGA: 0.2mg/kg 메티마졸로 매일 처치된 형질전환 래트; TGB: 0.35 mg/kg 필로카핀으로 매일 처치된 형질전환 래트);

도 5은 상기 도 1 내지 3에서 개시한 바와 같은 약물로 처치한 동물들로부터 얻은 사후 시료들의 분석 결과이며 (20주간 약물 및 플라세보로 처치한 래트들을 깊게 마취시키고 전체 좌골신경 및 가자미근을 조심스럽게 채집하고 무게를 재었으며 그래프는 이러한 측정결과의 30 평균 수치(mean values)임);

도 6은 보행평가 시험법(gait evaluation test; 암컷 래트)에서 Mix1의 양성적 효과를 나타낸 도이며 검정선(black line)은 플라세보로 처치한 대조군 래트를 표시; 검정 볼드 선(black bold line)은 플라세보로 처치한 유전자 변이 래트를 표시하고; 점선(dotted line)은 Mix1으로 처치한 유전자 변이 래트를 표시. (* p<0,05; black * : wt placebo vs tg placebo; grey * : tg placebo vs tg mix1. 이며 통계는 스튜던트 이측 검정법(Student bilateral test)으로 구현하였으며; 평균은 \pm s.e.m으로 표기함);

도 7은 미추신경의 흥분성 역치(excitability threshold)에 대한 Mix2의 양성적 효과를 나타낸 도이며 백색 막대(white bars)는 플라세보로 처치된 대조용 수컷 래트(control male rat)를 나타내며; 흑색 막대(black bars)는 플라세보로 처치된 형질전환 수컷 래트(transgenic male rats)를 나타내며; 회색 막대(grey bars)는 Mix2로 처치된 형질전환 수컷 래트(transgenic male rats)를 나타내며, 통계는 스튜던트 이측 검정법(Student bilateral test)으로 구현하였으며; 평균은 \pm s.e.m으로 표기함);

도 8은 막대시험법에서 치료 4주후 Mix2의 양성적 효과를 나타낸 도이며 (백색 막대(white bars)는 플라세보로 처치된 대조용 수컷 래트(control male rat)를 나타내며; 흑색 막대(black bars)는 플라세보로 처치된 형질전환 수컷 래트(transgenic male rats)를 나타내며; 회색 막대(grey bars)는 Mix2로 처치된 형질전환 수컷 래트(transgenic male rats)를 나타내며, 통계는 스튜던트 이측 검정법(Student bilateral test)으로 구현하였으며; 평균은 \pm s.e.m으로 표기함);

도 9은 치료 4주후 Mix2의 보행에 대한 양성적 효과를 나타낸 도이며 (백색막대(white bars)는 유연한 보행

(fluid gait)으로 걷는 개개 군에서의 수컷 래트 백분율을 나타내고; 회색 막대(grey bars)는 유연한 보행이 아닌 것을 나타내며; 흑색 막대(black bars)는 보행불능을 표시한 것이며, 통계는 스튜던트 이측 검정법 (Student bilateral test)으로 나타냄):

도 10은 만성 OXALPN 모델(model)에서의 항-이질성 효과(Anti-allodynic effect)를 나타낸 도이다(청색(blue)은 대조용 동물에 대한 아세톤 시험법에서의 반응 회수를 나타내고, 적색(red)은 옥살리플라틴(oxaliplatin) 처치 동물에 대하여, 녹색(green)은 옥살리플라틴(oxaliplatin) 및 mix2로 처치된 동물에 대한 것을 의미함).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0205] 하기의 예에 있어서, 본 발명을 구체적으로 설명하지만, 이 실시에는 결코 본 발명의 범위를 한정하고자 함이 아닌 것으로 간주되어야 한다.

[0207] **실시에 1. 시험관내 시험법**

[0208] 1.1. 상업적으로 입수가 가능한 래트 일차성 슈완세포(Commercially available rat primary Schwann cells)

[0209] 래트 슈완세포(SC) 일차성 배양물(Sciencell # R1700) 바이알을 해동한 후, 폴리(poly)-L-리신으로 미리 코팅된 75cm² 플라스크 속 배양액("Sciencell Schwann cell medium", Sciencell # R1701의 기본 배지)에서 10000 cells/cm² 밀도로 접종하였다. 상기 배양물은 증식을 촉진시키기 위하여 기초 배지에 5% 우태아혈청(3H-Biomedical AB #1701-0025), 1% 슈완세포 성장 보조제(3H Biomedical AB #1701-1752), 1% 겐타마이신(시그마사 #G1397) 및 10 μM 포르스콜린(Forskolin, 시그마사 # F6886)으로 구성되었다.

[0211] 충만도에 도달후 (세포 배치(batch)에 따라 4 내지 10 일), 슈완세포를 95% 이상 순도를 갖는 배양물을 제조하기 위하여, 부착된 섬유아세포로부터 SC 분리할 수 있는 부드러운 교반 또는 면역패닝법(thy1.1 immunopanning)으로 정제하였다. 그리고 SC를 판독하고(염색법: Tryptan blue 방법), 동일한 SC 배양물에서 폴리(poly)-L-리신으로 미리 코팅된 75cm² 플라스크에서 접종하였다. 충만도에 도달시, 세포를 세척, 트립신처리(트립신-EDTA 1x 희석, Invitrogen #1540054), 칼슘 및 마그네슘 없이 PBS로 희석), 판독 및 5% FBS, 1% 세포 성장 보조제(CGS), 40μg/ml 겐타마이신 및 4 μM 포르스콜린으로 처리된 슈완세포배지 (Sciencell Schwann cell)에서 12 웰-디쉬(well-dishes, 140000 세포/웰)로 플레이팅시켰다.

[0213] 1.2 통상 방법으로 제조한 일차성 슈완세포 (Custom-made rat primary Schwann cells)

[0215] 일차성 슈완세포 배양물(SC)을 스프라그-도울리 신생 래트 좌골 신경 (Sprague-Dawley newborn rats, P0 내지 P2)로부터 확립되었다. 모든 신생 래트를 희생시키고 페트리 디쉬(Petri dish)에서 분리하였다. 절편화는 멸균 조건하에서 수행하였다.

[0217] 등 부위 피부를 뒷발 및 몸통 하부로부터 제거하였다. 좌골 신경을 분리하고 1% 페니실린/스트렙토마이신 용액 (50UI/ml 및 50μg/ml, 각각; Invitrogen #15070) 및 1% 우 태아 알부민 (BSA, Sigma A6003)을 첨가한 빙냉 배지(Leibovitz, L15, Invitrogen #11415) 함유 배양 디쉬에 이동하였다. 래트당 모든 신경을 빙냉 L15을 함유한 15ml 튜브에 옮겼다. 그리고 L15 배지를 제거하고 10mg/ml 콜라게나아제 (Sigma #A6003)를 첨가한 2.4ml DMEM (Invitrogen #21969035)으로 갈아 주었다. 신경을 37°C에서 30분간 배지에 배양하였다. 상기 배지를 제거하고 모든 신경들을 37°C에서 20분간 칼슘 및 마그네슘을 제거한 PBS (Invitrogen # 2007-03)로 희석한 트립신 (10% trypsin EDTA 10x, Invitrogen #15400054)으로 분해시켰다. 상기 반응을 DNase I (II 급, 0.1mg/ml Roche diagnostic #104159) 및 우 태아 혈청 (FCS 10%, Invitrogen #10270)을 포함한 DMEM을 첨가하여 정지시켰다. 세포 현탁액을 10ml 피펫으로 적정하였고 50ml 튜브 (Swinnex 13mm filter units, Millipore, 20μm nylon-mesh filters, Fisher)속 필터를 통하여 통과시켰다. 세포 현탁액을 상온에서 10분간 원심분리(350g)하였고 펠렛을 10% FCS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 DMEM에서 현탁시켰다. 세포를 계수하고 (트립탄 블루 법:

Tryptan blue method), 5×10^5 내지 10^6 세포/디쉬(dish)의 밀도에서 배양 플레이트(Falcon 100mm Primaria tissue culture plates)에 접종시켰다.

- [0219] 하룻밤 배양 후, 배지를 DMEM, 10% FCS, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 $10 \mu\text{M}$ 시토신 b-D-아라비노푸라노시드 (cytosine b-D-arabinofuranoside, Sigma #C1768)으로 갈았다. 48시간 후에, 배지를 제거하고 세포를 DMEM으로 3회 세척하였다. DMEM, 10% FCS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, $2 \mu\text{M}$ 포르스콜린(Forskolin, Sigma #F6886), $10 \mu\text{g/ml}$ 우 피질 추출물 (bovine pituitary extract, PEX, Invitrogen #13028)로 구성된 SC 성장 배지를 첨가하였다. 상기 배지를 2-3일마다 갈아 주었다.
- [0221] 배양 8일후 (세포 배치(batch)에 따라 4 내지 10일), 슈완세포는 증만도(confluency)에 도달하고, 다수의 오염된 섬유아세포를 포함하는 배양물을 면역패닝법(thy1.1 immunopanning)으로 정제하였다. 정제후, 세포들을 폴리(poly)-L-리신으로 미리 코팅된 75cm^2 플라스크에서 10000 cells/cm^2 의 밀도로 성장 배지에서 현탁시켰다. 증만도에 도달시, 세포를 세척, 트립신처리(트립신-EDTA), 관독 및 12 웰-디쉬 ($100,000 \text{ cells/well}$)에 플라이팅시켰다.
- [0223] 1.3 약물 배양
- [0224] 세포들을 12 웰-디쉬에서 플라이팅한 후에, 배지를 1% N_2 보조제 (Invitrogen # 17502), 1% L-글루타민 (Invitrogen #25030024) 2.5% FBS (Sciencell #0025), $0.02 \mu\text{g/ml}$ 코르티코스테론(corticosterone, Sigma #C2505), $4 \mu\text{M}$ 포르스콜린 및 $50 \mu\text{g/ml}$ 겐타마이신을 보충한 DMEM-F12 (Invitrogen # 21331020) 혼합물로 구성된 정제된 배지로 대체하였다. SC 분화를 촉진시키기 위하여 성장 인자는 상기 배지에 첨가하지 않았다.
- [0225]
- [0226] 24 시간 후, 배지를 1% 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (Insulin-Transferrin-Selenium) -X (ITS, Invitrogen # 51300), $16 \mu\text{g/ml}$ 푸트레신 (Putrescine, Sigma # P5780), $0.02 \mu\text{g/ml}$ 코르티코스테론 및 $50 \mu\text{g/ml}$ 겐타마이신을 보충한 정제된 배지(DMEM-F12) 로 대체하였다. 이 단계에서, 배지에는 프로게스테론 또는 포르스콜린도 넣지 않았다.
- [0228] 하루 후, 일차성 슈완세포를 24시간 (3 wells/condition) 동안 약물들로 자극시켰다. 개개 화합물의 준비는 세포 배양 배지에 약물 첨가 전에 수행하였다.
- [0230] 필로카핀(SIGMA)을 $10 \mu\text{M}$ 내지 10nM 농도 범위에서 1차성 슈완 세포에서 시험한 반면에 메티마졸(SIGMA)을 $10 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, 100nM 내지 10nM 농도들에서 시험하였다.
- [0231] 약물들은 1% 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (Insulin-Transferrin-Selenium) -X (ITS, Invitrogen # 51300), $16 \mu\text{g/ml}$ 푸트레신(Putrescine), $0.02 \mu\text{g/ml}$ 코르티코스테론(corticosterone), 10nM 프로게스테론(Progesterone) 및 $50 \mu\text{g/ml}$ 겐타마이신(gentamicin)을 첨가한 DMEM-F12으로 구성된 정제 배지액에 참가하였다. 약물 자극 전 및 도중에 포르스콜린(Forskolin)의 제거가 아데닐레이트 시클리나제 포화(adenylate cyclase saturation)를 차단하였다.
- [0233] 배양된 슈와노마 세포(Cultured Schwannoma cells)
- [0234] 래트 슈와노마(Rat schwannoma) RT4-D6-P2T 세포주 (ATCC #CRL-2468TM) 를 DMEM (ATCC #30-2002) 및 10% FCS (invitrogen #10106)으로 해동하였다. 상기 세포들을 공기 (95%) - CO_2 (5%)의 대기 하에 가슴 배양기에서 37°C 로 유지하였다. 4 세대 (passage n° 4)에서 세포를 37°C 에서 5 내지 15분 동안 트립신화(trypsinization; +1ml Trypsin-EDTA, 0.25%-0.53mM; Invitrogen)로 분해하였다. 상기 반응을 10% 우태아혈청(FBS)을 함유한 DMEM을 첨가하여 중지시켰다. 웰(Well)들을 트립판 블루 배제법(trypsin blue exclusion test; Sigma)을 이용한 계수

기(Neubauer cytometer)로 계수하였다. 현탁액을 10ml 피펫(pipette)으로 적정하고 세포를 상온에서 10분간 350xg 로 원심분리를 하였다. 분해된 세포 펠렛(pellet)을 재현탁하고 12 웰-플레이트에서 30,000 cells/ml 기준으로 접종하였다. 48시간 후에, 상기 배지를 무혈청배지(medium without serum; DMEM)으로 교체하였다. 15시간 후에, RT4-D6P2T 웰들을 선택된 농도에서 세포 배양 배지에 약물을 첨가하여 자극시켰다. 개개 단독 약물 또는 약물 조합들의 준비는 세포 배양 배지에 첨가 전에 수행하였다.

[0237] **실시예 3. 정량적 역전사 중합 연쇄 반응 (Q-RT-PCR)**

[0239] 정량적 RT-PCR을 RT4-D6P2T 세포주에서 하우스키핑(housekeeping) RPS9 mRNA와 비교하여, 약물 자극 후의 PMP22 mRNA 수준을 비교하는 데 사용하였다.

[0241] 약물 배양 8시간 후에, 세포를 차갑게 멸균된 PBS로 세척한 후에, 개개 세포 시료로부터 총 RNA를 추출하고 키트(Qiagen RNeasy micro kit, Qiagen #74004)를 이용하여 SC로부터 정제하였다. 핵산은 1 μ l RNA 시료를 이용하여 기기(Nanodrop spectrophotometer)로 정량하였다. RNA 보전성(integrity)은 기기 (BioAnalyzer, Agilent)로 측정하였다.

[0243] RNAs를 표준 프로토콜에 따라 cDNA로 역전사시켰다. PCR 증폭을 위한 cDNA 주형을 20 μ l의 최종 부피로, oligo(dT) 존재하에 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 역전사 효소 (SuperScript II reverse-transcriptase, Invitrogen # 18064-014)를 이용하여 100ng의 총 RNA로부터 합성하였다.

[0245] cDNA를 《LightCycler 480》시스템 (Roche Molecular Systems Inc.)을 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 개개 cDNA를 PCR 증폭에 사용하기 전에 5배 희석하였다. 이러한 2 μ l cDNA를 PCR 반응용액에 마스터 믹스 키트(Master mix kit; Roche #04-887301001)와 같이 넣었다 (최종 부피: 10 μ l). 예비실험 결과는 정량화가 양쪽 서열에 대한 증폭 과정의 증식기에 완료되고 반응 효율은 목표(target) 및 하우스키핑(housekeeping) 유전자 사이에 유사함을 확인하였다.

[0247] 타크만 화학법(Taqman chemistry)을 RT-Q-PCR 분석을 수행하기 위하여 사용되었다. PCR 반응은 회사(Sigma-Aldrich)로부터 구입한 500nM 개개 프라이머(primers; F 및 R) 및 200nM 프로브(probe) Taq1을 이용하여 래트 PMP22 (NM_017037) 증폭으로 수행하였다.

[0249] PCR 조건은 하기와 같다: 95 $^{\circ}$ C에서 10초, 63 $^{\circ}$ C에서 10초 및 72 $^{\circ}$ C에서 12초 및 40 $^{\circ}$ C에서 1분 처치후 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성(40회 증폭 순환). PMP22 유전자 발현의 상대적인 수준은 목표 유전자 PMP22으로부터 발생한 산물들의 양을 비교하는 하기 Ct 방법 및 유세포분석법(flow cytometry :FACS)에 의한 PMP22 발현 분석법으로 측정하였다: 약물 배양 8시간, 24시간 및 48시간 후에, 1차성 래트 슈완세포 상등액을 회수하고, 원심분리하고 해동하였다. SC는 트립신(trypsin)-EDTA으로 탈착하였다. 대다수 세포들이 현탁이 되자 마자, 트립신을 10% FCS 첨가 DMEM을 이용하여 중화시켰다.

[0251] 세포가 있는 상등액을 회수하고 원심분리하였다. 세포들의 펠렛(pellets)을 미세튜브(micro tubes)에 옮기고, PBS 로 1회 세척하고 특정 용액 (AbCys #Reagent A BUF09B)으로 고정시켰다. 10분후에, 세포들을 PBS로 1회 세척하고 4 $^{\circ}$ C로 유지시켰다.

[0253] 세포 고정 5일 후에, 서로 상이한 배양 횟수를 갖는 모든 세포 제조물들을 하기 프로토콜을 이용하여 표지화시

켰다.

- [0255] 세포들을 5분간 7000rpm으로 원심분리하고 상기 펠렛들을 침습화제 용액(AbCys #ReagentB BUF09B)로 현탁시키고 상온에서 1시간동안 1차성 PMP22 항체 (Abcam #ab61220, 1/50)로 표지화하였다. 그리고 세포들을 5분간 7000rpm으로 원심분리하고 세포 펠렛을 PBS로 1회 세척하였다. 2차 항체를 첨가하고 상온에서 1시간동안 Alexa Fluor 488 (goat 항-토끼 IgG, Molecular Probes #A11008, 1/100)에 결합시켰다. 그리고 세포들을 5분간 7000rpm으로 원심분리하고 세포 펠렛을 PBS로 1회 세척하였다. 표지화(labeling)는 상온에서 1시간 배양을 위해 Alexa Fluor 488 (chicken anti-goat IgG, Molecular Probes #A21467, 1/100)와 결합된 3차 항체를 첨가하여 증강시켰다. 세포를 PBS로 1회 세척하였다. 어떠한 항체도 없는 대조군(Control; 비표지된 세포: unlabelled cells)을 자가형광도 (autofluorescence) 수준을 측정하고 광증폭기의 민감도에 적용시키기 위하여 사용하였다. 제 1차 항체가 없고 2차 및 3차 항체가 존재하는 대조군(Control)을 항체의 비특이적 결합을 측정하기 위하여 사용하였다.
- [0256]
- [0257] 데이터 획득 및 분석을 5000개 세포에 대하여 계수기 (FACS Array cytometer) 및 소프트웨어 (FACS Array software; Becton Dickinson)를 이용하여 수행하였다. 세포의 내부 복합성(입도granularity)에 따른 세포 부피(크기)와 관련된 전면 산란 검출기(Forward Scatter; FSC) 및 측면 산란 검출기(Side Scatter; SSC)로 분석하였다. PMP22 발현을 위하여, 전체 세포 내에서 분석이 수행되었으며 양성 세포들의 백분율을 계산하였다. 양성 세포(Positive cells)들은 제 2차 항체를 갖는 대조군에 비하여 강력한 형광 강도를 갖는 세포들이다.
- [0259] SC 수를 정량하기 위하여, 대조용 배지 중 세포들을 항체 항-S100 단백질(antibody anti-S100-protein)을 이용하여 분석하였다.
- [0261] 세포들을 하기 프로토콜에 따라 준비하였다: 슈완 세포를 상온에서 1시간 동안 항체 항-S100 단백질(Dako #S0311, 1/100)로 염색하였다. 상기 항체를 3차 항체와의 배양이 없이 PMP22 면역염색법(immunostaining)을 위하여 상술한 프로토콜에 따라 표지시켰다.
- [0263] 결과
- [0264] 본 발명자들은 PMP22 mRNA 수준이 (도 1) 제 1차 슈완 세포에서 유의적으로 감소하고 1 μ M 용량의 필로카핀이 가장 중요한 PMP22 하위-조절(down-regulation)을 유도함을 관찰하였다. (*: p<0.05; ***: p<0.001; 대조군에 비하여 유의적으로 상이함; 쌍체 스튜던트(pairwise student) t 검정법(test)). 우측에서는 필로카핀에 24시간 노출 후에, 발현의 PMP22 mRNA 수준이 매우 적은 용량(10nM 및 50nM)에서 1차 슈완 세포에서 유의적으로 하위-조절되었다. 유사하게, 필로카핀 (1 μ m)가 배양 24시간 후에 발현의 PMP22 단백질 수준을 1차 슈완 세포에서 38%로 유의적으로 감소시킴을 확인하고 이러한 효과는 배양 48시간 후에도 유의적으로 나타났다 (-18%, p<0.001).
- [0265] 또 다른 실험으로서 약물들을 (표 1에 나열) 8시간 동안 래트 슈와노마 세포주에서 배양하고 PMP22 mRNA 발현 수준을 RT-Q-PCR로 정량하였다.
- [0266] 본 발명자들은 일반적인 약물로서 상용되는 메티마졸 (0.1nM) 및 필로카핀 (0.001nM)이 발현의 PMP22 mRNA 수준에 유의적인 활성을 나타내지 않으나 이들의 조합 투여로 유의적으로 감소함을 확인하였다(도 2). 이러한 2개 약물의 상승적인 활성을 도 2에 상술하였다. 이러한 데이터는 선택된 농도에서 필로카핀 및 메티마졸 조합이 배양된 슈와노마 세포에서 PMP22 유전자 발현을 유의적으로 하위 조절할 수 있으나 1차 슈완 세포에서 고 농도에서 활성을 나타내는 필로카핀 및 메티마졸이 이러한 시스템에서 이러한 유전자 발현을 감소시키지 못한다는 점을 입증하였다.
- [0269] **실시예 4. CMT 동물 실험에서 생체내 시험**

- [0270] 본 발명자들은 시험된 화합물들 및 조합들의 치료학적 효과를 CMT 형질전환 래트 모델에서 시험하였다. 마우스 PMP22 유전자의 3개의 추가적인 복사 유전자를 갖는 반접합체성 PMP22 형질전환 래트는 말초 및 뇌 신경에서 말 이집탈락증 신호를 나타낸다(Sereda et al., 1996; Grandis et al., 2004).
- [0271] mRNA 수준에서, CMT 래트에서의 PMP22의 평균 1.6배 과발현 현상은 임상적 표현형과 관련된다. 야생형 유전자라 질병 유전자로 변환되는 PMP22 과발현의 추정적 역치 수준은 PMP22 유전자 발현을 감소시키는 것을 목표로 하는 치료법에 의하여 접근가능한 명백한 "목표(target)"가 될 수 있다.
- [0272] 이러한 CMT 래트 모델은 임상적 관점에서 인간 CMT1A 질환의 우수한 유사시험 모델이다. 성인 CMT 래트는 CMT1A 환자의 운동 신경 전도 속도 감소와 유사한 수치, 즉, 50% 이하를 갖는다. 좌골 신경 자극 후에, 복합 근 활동전위는 감소된 강도 및 비동기화를 나타낸다. 조직학적 및 전기생리학적 변화가 운동 신경 손상의 명백한 임상 증상 이전에 나타난다 (Sereda et al., 1996, 2003). 조직학적으로 근 위축증으로 확인되는 축삭 손상은 인간 CMT1A 증상과 일치한다.
- [0273] CMT 래트는 실험용 CMT1A 치료법에 대한 모델로서 제공되었다 (Meyer zu Horste et al. 2007). CMT1A 질병의 이러한 모델에서, 은밀하고 숨겨진 병리학적 소견(운동 결핍증), 특히 전기 생리학적 및 조직 특성 및 종국에는 PMP22 과발현 수준은 CMT1A 환자에서 발견되는 특징들과 가장 근접한 것으로 밝혀졌다.
- [0274] 본 발명자들은 래트 모델에서 치료학적 효과를 위한 화합물들 및 조합들을 시험하여 왔다. 실험군은 암수 모두의 젊은 래트들로 각각 구성하였다. 상기 래트들을 체중을 토대로 한 하기 확률화 계획에 따라 할당하였다. 몇몇 실험에서, 상기 확률화는 막대시험법(bar-test)에서의 래트 행동에 기초하여 수행하였다. 모든 암수 래트들은 치료군과 숫적으로 동일하거나 큰 분리된 대조군으로 대표된다.
- [0275] 래트를 3 또는 6주간의 개개 약물의 생체이용률에 따라 약물로 정기적으로 강제 사료 투입 또는 펌프(Alzet 삼투압 경피 펌프, DURECT Corporation Cupertino, CA)에 의한 주사로 처치하였다.
- [0276] 성장하는 체중에 따라 투여량을 조정하기 위하여 주당 2회씩 동물 체중을 측정하였다. 만일 상기 삼투압 펌프가 치료적 투여법으로 위하여 선택되는 경우에는, 상기 약물의 투여량은 펌프 지속기간(6주)를 초과하는 연령으로 예측되는 계산된 평균 동물 체중을 근거로 하여 계산되었다. 상기 펌프는 적절한 마취 프로토콜에 따라 필요시 재장착된다.
- [0278] 행동 시험(Behavioural tests)
- [0279] 개개 3주 또는 4주째, 상기 동물을 행동시험에 사용하였다. 각 시험은 동일한 시간대에 동일한 방안에 동일한 연구원에 의하여 수행되었다: 이러한 일치는 전체 실험과정 내내 유지되었다. 모든 처치법 및 유전자형 결정은 연구원에게 맹검하에 수행되었다. "막대 시험법(Bar test)" 및 "악력 시험법(Grip strength)"을 주로 연구내내 시험에 사용하였다. 막대시험법의 시험계획은 예를 들어 기억력에 기인한 오차를 방지하고자 동물 성장에 따라 변화가능하다.
- [0280] 악력 시험법은 근력 (muscle force), 민감도 상태(sensitivity status) (예를 들어, 통증감각은 힘의 특정치를 변화시킬 수 있다) 및 행동 요소 (behavioural component, "동기화(motivation)")로 구성되는 것으로 간주되는, 악력 수행상의 미묘한 차이를 탐지할 수 있게 한다. 그 수치는 앞발 및 뒷발 간에 차이를 나타내고 동물 연령에 크게 좌우된다.
- [0282] 본 악력 시험법은 동물이 앞발 또는 뒷발로 봉을 쥐는 행동을 지속하는 힘을 각각 측정하는 시험이다. 악력계로 힘을 측정하기 위해 그립(grip)에 설치한다 (Force Gauge FG-5000A). 래트를 앞발 또는 뒷발로 그립을 잡고 그립을 놓을 때까지 뒤로 래트를 부드럽게 잡아 당기도록 실험자가 지속하였다. 동물이 그립을 놓을 때 측정된 힘을 기록하였다.
- [0283] 동물 당 앞발 힘을 측정하는 2번의 연속적인 시험 및 뒷발 힘을 측정하는 2번의 연속적인 시험을 수행하였고 최대 수치(앞발에 대해 한번 및 뒷발에 대해 한번)만을 기록하였다(N 중).
- [0285] 막대시험법(Bar Test)

- [0286] 막대시험법(Bar Test)은 고정된 막대를 붙잡는 래트의 능력을 평가한다. 근육 약화를 나타내는 PMP22 래트는 본 시험법에서 행동 결함을 나타낸다(Sereda et al, 1996). 이 래트는 막대 (직경 : 2.5cm, 길이: 50cm, 탁자위: 30cm) 중간에 네발로 위치하게 한다. 시험은 연속적으로 수행하고, 본 실험에서 시험 횟수 (5 또는 10) 및 지속 기간은 (30 또는 60초) 동물의 배취(batch)에 좌우된다. 본 실험의 가변성은 실험중 CMT 래트에서의 운동결함을 가장 잘 감지하기에 적합한 계획을 결정하기 위하여 도입된다.
- [0288] 개개 세션(session)에서 기록된 수행 지수(Performance indices):
- [0289] (1) 막대에서 60초 또는 30초간 붙잡는데 필요한 도전수.
- [0290] (2) 개개 도전 및 세션 평균에서 막대에서 소요된 평균 시간(즉, 떨어지는 지연시간). 본 실험 과정중, 래트들이 막대에서 측정 한계 시간(cut-off time), 즉 30초 또는 60초 동안 머문 후 세션이 종료되는 경우는 상기 측정 한계 시간(cut-off time, 즉 30초 또는 60초)은 도전이 완료되지 않는 것으로 간주함.
- [0291] (3) 떨어진 횟수.
- [0293] 전반적 건강 측정
- [0294] 동물의 체중, 명백한 신호(털모양, 자세, 진전 등의 현상)를 실험내내 조사하였다. 등급 크기는 기록을 위해 사용되었다: 0= 정상, 1= 비정상.
- [0295]
- [0296] 걸음 걸이
- [0297] 개개 래트는 5분간 깨끗한 새로운 래트 케이지(cage; 직경 55x33x18cm)에서 관찰하였다. 하기 4개의 매개변수로 평가하였다:
- [0298] (1) 점수(Score) 0: 정상 걸음걸이 (유연한),
- [0299] (2) 점수 1: 비정상 걸음걸이(유연하지 않거나 또는 래트가 약간 다리를 절뚝거림),
- [0300] (3) 점수 2: 중등정도 장애(래트가 다리를 끌고 똑바로 세워 보행이 가능함),
- [0301] (4) 점수 3: 심각한 장애(래트가 한쪽 또는 양쪽 뒤다리를 끌 수 있으나 똑바로 세워 보행이 불가능함).
- [0303] 경사면 시험법
- [0304] 미끄럼 장치는 0° (수평) 내지 60° 각으로 기울 수 있는 30x50cm 투명 안전유리 평면을 포함한다. 개개 래트들은 거꾸로 된 자세로 25° 각으로 기울어진 면에 초기에 위치시키고; 1분 간격의 2회 시도를 수행하였다. 30분 후에, 동일한 실험을 35° 각도의 경사 및 이후 40° 각도의 경사 면에서 수행하였다. 이 기간 동안 래트들을 케이지로 귀환시켰다. 경사면들은 개개 시도 후에 청소하였다.
- [0305] 래트들의 업무 수행을 하기 4개의 상이한 점수로 평가하였다:
- [0306] (1) 점수(Score) 0: 안 미끌어짐,
- [0307] (2) 점수 1: 약간 미끌어짐 (1 또는 2개 발)
- [0308] (3) 점수 2: 중등정도 미끌어 지나 (4개 발) 경사면의 말단까지는 안 미끌어짐.
- [0309] (4) 점수 3: 경사면의 말단까지 래트들이 미끌어짐.
- [0311] 전기 생리학
- [0312] 적절한 경우, 상기 래트들은 전기 생리학적 평가를 수행하였으며: 잠복기 및 전위 진폭(potential amplitude)뿐만 아니라 감각 신경 전도 속도(nerve conduction velocity; NCV)도 측정하였다. NCV 측정 및 전위 주입(피하)을 증폭기 (AM System 1700 및/또는 EMG-UTC), 자극제(Havard apparatus 223) 및 주입 카드(acquisition

card) 및 주입 및 신호 처리(CALVISE)를 위한 소프트웨어(SPATOL)가 장착된 컴퓨터로 구성된 체인(chain)의 도움으로 수행하였다.

[0313] 동물들은 케타민(ketamine)/잘라진(xalazine)을 이용하여 마취시키고 시험 내내 37℃로 온도가 조절된 온도조절 장치 플레이트상에서 유지되었다(마취는 필요한 대로 보충하였다). 자극용 은침 전극을 꼬리의 몸쪽 부위에 삽입하였다. 기록용 전극을 꼬리의 원부(자극용 전극으로부터 4 및 6cm 위치)에서 피부 약 1mm 깊이에 피하적으로 삽입하였다.

[0314] 0.2초간의 정전류 직사각형과 자극(Constant-current square-wave stimuli)을 초당 0.3회 주기로 주입하였다. 5.000-20.000배 증폭된 반응을 데이터 집적 시스템을 기반으로 한 컴퓨터 상에서 시각화하고 수집하였다. 잠복기(Latencies)들은 개개 과장 출발점(기전선으로부터 처음 명확하게 동정가능한 편향(identifiable deflection)이라고도 함)에서 측정하였다. 가장 큰 편향의 피크대 피크 진폭(Peak to peak amplitudes)을 최대 진폭으로 결정하여 계산하였다. 개개 기록에 대하여, 측정법을 10개 이상 동일한 자극들에 대한 평균적인 반응들에서 수행되었다.

[0315] 감각신경전도속도(Sensory related conduction velocity; SNCV)를 자극된 양극들간의 거리를 자극을 준 2개 부위로부터 얻은 상당하는 잠복기간의 차이로 나누어서 계산하였다.

[0317] 조직학적 측정법

[0318] 최종 시험법으로(최종일까지 연속처리), 래트들을 즉시시켰다. Hind feet of 자연형(wild-type) 및 형질전환 래트들의 뒷발을 절개하고 48시간 동안 포르몰(formol) 4% 용액에 침수시켜 고정하고 추가 2일 동안 10% 포르몰 용액으로 옮겼다. 물에서 15분간 세척시킨 후에, 26시간 동안 탈회과정을 위해 가공을 수행하였다 (Labonord Decalcifiant rapide n° 3 #DC3_09128300).

[0319] 그리고 다리들을 횡단선으로 2개 절편으로 절개하였고 이 절편들을 염색(osmium coloration)하였다.

[0320] 조직들을 24시간동안 1%이상 오스뮴 테트로사이드 용액(osmium tetroxyde solution; VWR, Osmium VIII oxide 0.5g #20551.076)에 적시고 4 내지 6시간 동안 탈이온수로 세척하였다. 그리고 조직들을 함침 자동화기기(VIP2000 Vertical, Bayer Diagnostics)에서 탈수시키고 고전적으로 파라핀에서 함침시켰다.

[0321] 4µm 조직 절편을 연속적인 자일렌 및 알콜 욕조에서 탈수시키고 다음 분석을 위하여 고정화시켰다(Pertex glue, #T/00811_MICROM).

[0323] 영상 분석

[0324] 6 마리 동물로부터 얻은 절편들을 동일한 해부학적 수준(발가락 접합부)을 나타내기 위하여 세심하게 선별되고 소프트웨어(Saisam microvision software)가 연결된 현미경(Olympus microscope; Archimed Pro 1997-2000 by Microvision Instruments)하에 분석을 수행하였다. 말초 신경은 국소화하고 하기와 같이 분석하였다: 원형 미엘린화 섬유(circularly myelinated fibers)를 계수하였다 (적어도 150개 이상 섬유/동물의 다발 신경에서). 미엘린화 섬유의 내경 및 동일 섬유의 외경에 상응하는 실린드락세(Cylindraxe) 직경을 측정하였다. 그리고, 본 발명자들은 자연형 및 형질전환 동물들의 미엘린(myelin) 직경 및 액손(axons) 직경의 분포를 비교하였다.

[0326] 게다가, 본 발명자들은 비-미엘린화 섬유 양(non myelinated fibers; 오스뮴 단편상에는 안 보여 분석되지 않는)이 형질전환 동물에서 (신경 단편의 구형의 흐릿한 형태로 특징되는)보다 높게 나타나는지 여부를 결정하기 위하여 동일한 신경 절편의 광학 밀도를 측정하였다.

[0327] 결국, 신경 분석에 사용되는 것과 동일한 절편 상에 존재하는, 모든 다리 근육들은 수동적으로 구형 근육 표면을 결정하기 위하여 분석되었다. 그리고 본 발명자들은 "근육 양(muscle content)/단편 표면적(section surface)" 양을 계산하였다.

[0328] 좌골 신경을 무게 측정뿐만 아니라 분자 생물학적 및/또는 생화학적 어세이법 [분석적 과정(약물 농도 측정)을 위하여 일반적으로 사용되는 프로토콜(protocol)에 따라 수행되는 PMP22 mRNA에 대한 RT-Q-PCR 및 미엘린 단백질 정량을 위한 웨스턴 블랏법(Western blots); 아라키돈 산 대사체(arachidonicacid metabolites)와 같은 생

화학적 표지자에 대한 Cayman's EIA 키트(kits), 스테로이드 및 아민류에 대한 HPLC 정량, CNTF, IL-6 등에 대한 ELISA] 을 수행하는데 사용하였다.

- [0330] 뒷발 근육(가자미근)을 채취하고, 무게를 재고, 순간-냉동시켜 분석 전까지 -80℃에서 보관하였다 (좌골 신경에 대한 과정과 동일).
- [0332] 결 과
- [0333] 화합물(compound) PXT25(비교용으로만 본원에서 제공된)이 어떠한 개선효과를 나타내지 못한데 반하여, 강제 급여로 투여된 메티마졸(0.35mg/kg 일일 용량) 및 필로카핀(0.2mg/kg 일일 용량)은 처치 과정 내내 막대 시험 수행을 개선시켰다 (도 3).
- [0334] 운동 수행은 자연형 군(Wild type; WT group)에 비하여 플라세보로 처리된 서로 상이한 CMT TG 래트에서 평균 3 배 적은 성공률을 나타냈다. 메티마졸 및 필로카핀 처치군은 이러한 실험에서 TG 동물의 개선을 나타냈고, 이러한 효과는 강제 급여 8주 후처럼 빨리 통계학적으로 유의성을 나타냈다.
- [0335] 이러한 상대적으로 고용량에서 메티마졸 및 필로카핀으로 처리한 CMT 래트가 플라세보 군과 비교시에 보다 유익적으로 잘 수행됨을 상기 데이터에서 확인되었다. 심지어 화합물 필로카핀으로 처리한 군은 WT 플라세보 군과는 더 이상 유의적으로 차이가 없는 수준으로 회복되었다.
- [0336] The 꼬리의 원접 부위에서 측정된 SNAP 가 결국 탈수초화로 기인하는 중요한 액손 손실을 반영할 수 있는 TG 플라세보 군에서 유익적으로 감소되는 것으로 밝혀졌다. 이러한 전기생리학적 매개변수는 화합물 B로 처리한 형질 전환 래트에 대한 SNAP가 유의도 면에서 명목상의 5% 역치에만 근접하는 반면에 화합물 A로 처리한 군은 유의적으로 개선되는 것으로 밝혀졌다 (도 4).
- [0337] 본 관찰 결과는 말초 신경의 미엘린화 상태가 그다지 개선되지 않음에도 불구하고 메티마졸의 작용은 액손 손실을 차단할 수 있는 것으로 간주하게 한다. 필로카핀의 이러한 효과는 그룹간 변이성으로 인하여 플라세보 군 매개변수와 차이가 통계학적 유의성에는 이르지 못한다하더라도 필수적으로는 동등한 것으로 간주된다. CMT1A에서, (감각신경 활동 전위; SNAP) 진폭은 보다 감소하고, SNAP 지속시간은 CMT2에서 보다는 더 연장되었다. CMT1A에서의 복합근활동전위(CMAP) 및 SNAP 진폭 감소는 아마도 탈수초화 및 액손 기능부전의 조합효과일 것이다 (Bienfait et al., 2006).
- [0338] 연구 종료시점에서 형태측정세포학적 분석법을 수행하였다. 뒷다리 조직의 측정에서 좌골 신경 및 가자미근은 대조군 WT 래트에 비교하여 플라세보로 처리된 CMT 암컷 래트에서 유의적으로 감소함을 밝혀냈다.(도 5)
- [0339] 이러한 결함은 화합물 A 처치로 완정하게 교정되는 것으로 밝혀졌다: 상기 근육 및 상기 신경의 절대 중량은, 플라세보 군과 비교시에 화합물 A 처치 군에서 전체 체중이 보다 감소하였는데 반하여, 대조군 WT 래트에서 보다 증가하였다 (데이터는 표시안함). 뒷발 근육 및 신경에 대한 필로카핀 처치의 효과는 메티마졸의 효과보다는 적은 것으로 나타났다.
- [0340] 메티마졸 (4mg/kg) 및 필로카핀 (7mg/kg) 보다 50배 낮은 저용량의 Mix1 (표 1)는 도 6에 나타난 바와 같이, 강제 급여 처치 10주 후에 암컷 래트의 걸음걸이 점수를 개선시켰다. 본 발명자들은 처치 6주 후에 양성적 경향을 관찰하였다.
- [0341] 하기 도들은 3개의 서로 다른 행동학적 및 전기생리학적 시험법으로 수행한 수컷 래트들에 대하여 필로카핀 (7mg/kg); 메티마졸(4mg/kg), 미페프리스톤(mifepristone; 40mg/kg), 날트렉손(naltrexone; 4mg/kg); 바클로펜(baclofen; 60mg/kg) 및 소르비톨(sorbitol; 2mg/kg)을 함유하는 mix2 (표 1)의 양성적 효과를 설명한다.
- [0342] 도 7은 이러한 용량에서의 Mix2 이 신경 미측 전기 자극이후에 CMT 플라세보 래트에서 발견되는, 흥분성 역치(excitability threshold)의 상승을 감소시킴을 보여 준다.
- [0343] 도 8는 막대 시험법에서 수컷 행동상에 미치는 양성적 효과를 나타낸다; 처치 4주 후에, 미끌어지는 횡수가 감소하고 막대에서 소비하는 시간이 증가한다.
- [0344] 상기 도는 Mix2 도 처치 3 주후에 수컷 래트의 걸음걸이 행동을 개선시키고 유연한 걸음걸이로 걷는 래트의 확

물이 CMT 플라세보 래트에 비하여, 치료된 래트에 대하여 35% 증가함을 나타낸다.

[0346] 유사한 결과들이 기타 조합에 대해서도 발생되었으며 결과의 요약을 표 1에 나타냈다.

표 1

POS: 생체내에서 질병증상의 회복

effect in vivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
combination	mix1	mix2	mix3	mix4	mix5	mix6	mix7	mix8	mix9	mix10	mix11	mix12	mix13	mix14	mix15	mix16	mix17	mix18	
mifepristone	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
pilocarpine	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
methimazole	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
sorbitol	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
naltrexone	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
baclofen	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
rapamycin	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ketoprofen	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
flurbiprofen	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
cevimeline	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
propylthiouracil	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

[0347]

[0349] 이러한 데이터는 생체 내에서 본 발명의 조합 및 처방이 CMT를 효과적으로 치료할 수 있음을 나타낸다.

[0352] 실시예 5. 독성 신경병증 모델에서의 생체내 시험

[0353] 약물 치료 또는 처방을 최종 시험일(D16) 전날까지 옥살리플라틴(Oxaliplatin) 3mg/kg (D-1)의 최초 복강주사 전부터 경구로 투여하였다. 옥살리플라틴-처리 군에 속하는 동물들에게 증류수를 매일 투여하였다 (10ml/kg). 동물들에게 옥살리플라틴은 정오에 투여하는 반면에, 시험 처리 및 증류수는 아침에 매일 투여하였다.

[0354] 시험일 동안(즉 D1, D4, D10)에, 처리 및 증류수를 시험 후에 투여하였다. 화합물 및 부형제 투여 및 옥살리플라틴 주사를 포함하는 시험일(D4)에 있어서, 시험 후 옥살리플라틴 주사 전에 처리 및 증류수를 투여하였다. 참고약물-처리 군(reference-treated group)에 속하는 동물들에게는 시험일들 (즉 D1, D4, D10 및 D17) 동안에만 투여하였다.

[0355] 냉 이질통은 D1(옥살리플라틴 3mg/kg 최초 주사 24시간 후경; 옥살리플라틴의 급성효과), D4, D10(옥살리플라틴의 만성 효과) 및 D17 (처리 완료 1주일 후의 옥살리플라틴의 잔여 효과)에 열 비통증성 자극 (아세톤 시험법; acetone test)에 대한 반응을 측정함으로써 평가하였다.

[0356] 시험은 참고 약물의 2시간 후에 아세톤 시험법을 사용함으로써 종료하였다. 사용된 참고약물은 가바펜틴 (Gabapentin), 100 mg/kg, /os (1일 1회 x 4 시험일)이었다.

[0358] 아세톤 시험법

[0359] 냉 이질통은 아세톤 시험법을 이용하여 평가되었다. 이 시험에서, 뒷발 위축 잠복기는 양 뒷발들(반응 시간)의 편편한 표면에 아세톤 한 방울을 적용 후에 측정하고 반응 강도를 점수화하였다(냉 점수:cold score).

[0360] 아세톤의 냉각효과에 대한 반응 시간(Reaction time)을 아세톤 적용 20초 (cut-off) 이내에 측정된다. 또한 아세톤에 대한 반응도 하기 4-포인트 스케일(4-point scale)로 등급화된다: 0 (반응 무); 1 (빠른 위축, 발 튀기기); 2 (발의 연장된 위축 또는 현저한 튀기기); 3 (활동작과 함께 반복된 발 튀기기).

[0361] 래트에 의하여 6번의 시도가 수행되었다. 개개 실험군에 대하여, 결과는 개개 래트에 대한 6 점수의 합 ±SEM을 정의되는 축적 냉 점수(cumulative cold score)로 표시된다. 최소 점수는 0 (6번 시도중 어느 하나에도 반응이 없음) 이고 최대 가능한 점수는 18 (개개 6번 시도에 발을 핥거나 무는 행동이 반복됨)이다.

[0362] 가바펜틴(Gabapentin): 기원 (Zhejiang Chiral Medicine Chemicals, 중국)

[0363] 옥살리플라틴(Oxaliplatin): 기원 (Sigma, 프랑스)

[0365] 결 과

[0366] 옥살리플라틴에서 mix2 의 시험 결과는 도 10에 나타냈다. 본 실험 결과는 mix2가 독성 약물 처치로 유도되는 신경병증으로부터 동물을 보호함을 명백하게 한다.

[0369] **실시예 6. ALS 모델에서의 생체내 시험**

[0370] 동물 모델

[0371] 본 발명자들은 근위축성 측삭 경화증 병리를 모방하기 위하여 SOD1^{G93A} 래트 모델 (Howland DS et al, 2002에 따라 생산)을 선택하였다. 이 모델은 척수뿐만 아니라 다수 뇌 영역 및 말초 조직에서 변이된 SOD1 유전자를 과발현시킨다 (Howland DS et al, 2002). 이러한 모델의 운동신경 질환의 시발은 뒷발이 비정상적인 걸음걸이를 나타내는 약 115일 경이다 (Howland DS et al, 2002). 수일내에, 뒷발 마비가 발생한다.

[0373] 실험 과정

[0374] 본 발명자들은 스프라그 도울리 암컷 래트와 잡종교배한 SOD1^{G93A} 래트 군체를 얻었다. 이형 접합적 (Heterozygous) SOD1^{G93A} 래트를 hSOD1 (Howland DS et al, 2002)에 특이적인 프라이머(primer)로 테일(tail) DNA의 증합효소연쇄반응(PCR)로 동정하였다. 동물들은 조절된 조명 (0500-1900 h 밝기) 및 온도 (23±1℃)가 유지되는 방에서 식이 및 음용수에 자유롭게 접근 가능토록 하였다. 본 연구에서 모든 동물 실험 과정은 동물 보호 표준 지침에 따라 수행되었다.

[0375] 체중 측정은 매주 수행되었고 행동 시험은 60일 연령부터 시작하여 종말 점까지 수행하였다. 본 처치는 5주령부터 경구 또는 피하적 방법으로 매일 투여되었다.

[0377] 관찰 시험법: 일반적 측면에서의 특징

[0378] 개개 래트를 5분간 깨끗하게 새로운 케이지(크기: 55x33x18cm)에서 관찰하였다. 5가지 매개변수들을 기록하였다:

[0380] **1. 걸음 걸이**

[0381] (1) 점수(Score) 0: 정상 걸음걸이 (유연한),

[0382] (2) 점수 1: 비정상 걸음걸이 (유연하지 않거나 또는 래트가 약간 다리를 절뚝거림),

[0383] (3) 점수 2: 중등정도 장애 (래트가 다리를 끌고 똑바로 세워 보행이 가능함),

[0384] (4) 점수 3: 심각한 장애 (래트가 한쪽 또는 양쪽 뒤다리를 끌 수 있으나 똑바로 세울 수 없음).

[0386] **2. 털 모양 측면**

[0387] (1) 점수 0: 털이 깨끗하고 비단같음,

[0388] (2) 점수 1: 털이 서있거나 더러움

- [0390] **3. 떠는 상태**
- [0391] (1) 점수 0: 떨지 않음,
- [0392] (2) 점수 1: 떠는 상태
- [0394] **4. 신체 모습**
- [0395] (1) 점수 0: 정상,
- [0396] (2) 점수 1: 비정상 (뺨이 있거나 허리를 굽히는 상태)
- [0398] **5. 뒷발 자세**
- [0399] (1) 점수 0: 정상,
- [0400] (2) 점수 1: 뒷발을 뺀 상태
- [0402] 운동 점수 시험법: 운동 결함 특성
- [0403] 본 시험법은 30초 이내에 어느 한측으로 돌아선 위치를 원래 위치로 자세를 고치는 능력을 평가한다(올바른 반사) (Gale K. et al, 1985).
- [0404] 비-매개변수적 점수화 시스템(non-parametrical scoring system)을 하기 기준들에 따라 이용하였다 (Matsumoto A. et al, 2006; Thonhoff JR et al, 2007):
- [0405] (1) 점수(Score) 0: 래트가 30초 이내에 어느 한측으로 돌아선 위치를 원래 위치로 자세를 고칠 수 없음,
- [0406] (2) 점수 1: 래트가 30초 이내에 한측만으로 돌아선 위치를 원래대로 위치로 자세를 고칠 수 없음,
- [0407] (3) 점수 2: 래트가 30초 이내에 양측으로 돌아선 위치만을 원래대로 위치로 자세를 고칠 수 있으나 케이지에서 똑바로 서지 못하고 신체 일부를 항상 끄는 행동을 보임,
- [0408] (4) 점수 3: 래트가 30초 이내에 양측으로 돌아선 위치만을 원래대로 위치로 자세를 고칠 수 있고 케이지에서 똑바로 서지 못하나 신체 일부를 끌지 않음,
- [0409] (5) 점수 4: 래트가 30초 이내에 양측으로 돌아선 위치만을 원래대로 위치로 자세를 고칠 수 있고 케이지에서 똑바로 설 수 있으나 시각적으로 기능적 결함을 나타냄,
- [0410] (6) 점수 5: 래트가 30초 이내에 양측으로 돌아선 위치만을 원래대로 위치로 자세를 고칠 수 있고 케이지에서 똑바로 설 수 있으며 시각적으로 기능적 결함이 없음.
- [0411] 질병의 종말 점은 점수 0으로 고정: 그리고 래트를 도살함.
- [0413] 경사면 시험법: 운동 결함상의 특징
- [0414] 미끄럼 장치는 0° (수평) 내지 60° 각으로 기울 수 있는 30x50cm 투명 안전유리 평면을 포함한다. 개개 래트들은 거꾸로 된 자세로 25° 각으로 기울어진 면에 초기에 위치시키고; 1분 간격의 2회 시도를 수행하였다. 30분 후에, 동일한 실험을 35° 각도의 경사 및 이후 40° 각도의 경사 면에서 수행하였다. 이 기간 동안 래트들을 케이지로 귀환시켰다. 경사면들은 개개 시도 후에 청소하였다.
- [0415] 래트들의 업무 수행을 하기 4개의 상이한 점수로 평가하였다:
- [0416] (1) 점수(Score) 0: 안 미끌어짐,
- [0417] (2) 점수 1: 약간 미끌어짐 (1개 또는 2개 발)
- [0418] (3) 점수 2: 중등정도 미끌어 지나 (4개 발) 경사면의 말단까지는 안 미끌어짐.

- [0419] (4) 점수 3: 경사면의 말단까지 래트들이 미끌어짐.
- [0421] 철망 시험법: 어려운 상황에서의 운동 능력의 특성
- [0422] 철망의 박스와 접촉시켜 상단(70° 각도) 및 하단에서의 테이블 끝에 설치하였다 (Thonhoff JR et al, 2007). 개개 래트들을 철망 바닥에 위치시키고 박스 상단에 새끼들을 위치시켜 기어 오르도록 동기화시켰다. 개개 래트들은 주 1회 훈련시켰다 (3 회 시도).
- [0423] 기록된 매개변수는 철망의 상단에 도달하는 잠복 시간이다.
- [0425] 개방지 시험법: 보행성 운동 활성의 특징
- [0426] 보행운동(locomotor) 활성을 바닥 상단 1 및 5cm에 2개의 축을 갖고 16개 광전지-광선을 갖는 투명 안전유리 박스(45x45x30 cm, Acti-Track by BIOSEB, Lyon, France)에서 측정하였다.
- [0427] 개개 래트의 즉흥적이고 탐구적인 활성을 3시간 동안 평가하였다.
- [0428] 4개의 매개변수들이 기록되었다(전체 이동 거리, 앞발들기 횟수, 이동거리 및 개방지 중심에서 소비된 시간 백분율).
- [0430] **참고문헌**
- [0432] 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.
- [0433] Amici SA, Dunn WA Jr, Notterpek L. Developmental abnormalities in the nerves of peripheral myelin protein 22-deficient mice. *J Neur Res.* 2007; 85(2):238-249.
- [0434] Anger T, Klintworth N, Stumpf C, Daniel WG, Mende U, Garlisch CD. RGS protein specificity towards Gq- and Gi/o-mediated ERK 1/2 and Akt activation in vitro. *J Biochem Mol Biol.* 2007; 40(6):899-910.
- [0435] 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.
- [0436] Bassi S, et al., Encephalo myelitis with thyro toxicosis. *J Neur.* 1978; 218(4): 293-296.
- [0437] 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.
- [0438] Bienfait HM, Verhamme C, van Schaik IN, Koelman JH, de Visser BW, de Haan RJ, Baas F, van Engelen BG, de Visser M. Comparison of CMT1A and CMT2: similarities and differences. *J. Neurol.* 2006 Dec; 253(12):1572-80.
- [0439] 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.
- [0440] Castellone MD, Teramoto H, Gutkind JS. Cyclooxygenase-2 and Colorectal Cancer Chemoprevention: The B-Catenin Connection. *Cancer Res.* 2006; 66(23):11085-11088.
- [0441] 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.

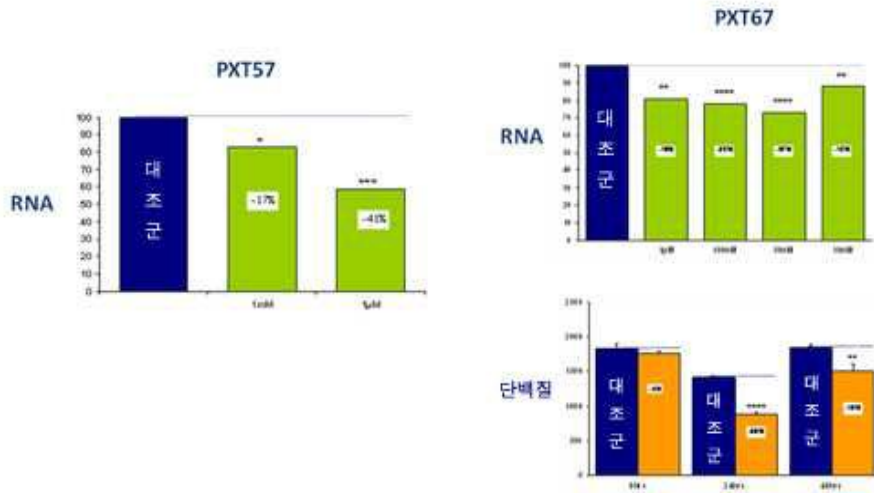
- [0442] Cosgaya J. M., Chan J. R., Shooter E. M. 2002. The Neurotrophin Receptor p75NTR as a Positive Modulator of Myelination Science 298; 1245-1248.
- [0443] Devaux JJ, Scherer SS. Altered ion channels in an animal model of Charcot-Marie-Tooth disease type IA. J Neurosci. 2005; 25(6): 1470-1480.
- [0444] D'Urso D, Ehrhardt P, Muller HW. PMP22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. J Neurosci. 1999; 19(9):3396-3403.
- [0445] Fortun J, Dunn WA Jr, Joy S, Li J, Notterpek L. Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. J Neurosci. 2003; 23(33): 10672-10680.
- [0446] 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.
- [0447] Fortun J, Verrier JD, Go JC, Madorsky I, Dunn WA, Notterpek L. The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of cytoplasmic chaperones. Neur.Dis. 2007; 25(2): 252-265.
- [0448] Keltner J. et al. Myotonic pupils in Charcot-Marie-Tooth disease. Archives of ophthalmology, 1975; 93(11):1141-1148.
- [0449] 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.
- [0450] King TD, Song L, Jope RS. AMP-activated protein kinase (AMPK) activating agents cause dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase-3. Biochem Pharmacol. 2006; 71(11):1637-1647.
- [0451] 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.
- [0452] Ma W, Li BS, Zhang L, Pant HC. Signaling cascades implicated in muscarinic regulation of proliferation of neural stem and progenitor cells. Drug News Perspect. 2004; 17(4):258-266.
- [0453] Meyer Zu Horste G., Nave K-A. Animal models of inherited neuropathies. Curr. Opin. Neurol. 2006; 19(5): 464-473.
- [0454] 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.
- [0455] Nave KA, Sereda MW, Ehrenreich H. Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies. Nat Clin Pract Neurol. 2007; 3(8): 453-464.
- [0456] Niemann S, Sereda MW, Rossner M, Stewart H, Suter U, Meinck HM, Griffiths I.R., Nave K-A. The "CMT rat": peripheral neuropathy and dysmyelination caused by transgenic overexpression of PMP22. Ann. N.-Y. Acad. Sci. 1999; 883:254-261.
- [0457] Notterpek L, Shooter EM, Snipes GJ. Upregulation of the endosomal-lysosomal pathway in the trembler-J neuropathy. J Neurosci. 1997;17(11): 4190-4200.
- [0458] 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.
- [0459] Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontes M. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of CMT

disease. *Nature Med.* 2004; 10(4): 396-401.

- [0460] 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.
- [0461] Rangaraju S., Madorsky I., Go Pileggi J., Kamal A., Notterpek L. 2008. Pharmacological induction of the heat shock response improves myelination in a neuropathic model *Neurobiology of Disease* 32; 105-115.
- [0462] Roa BB, et al.. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med.* 1993; 329(2): 96-101.
- [0463] 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.
- [0464] 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.
- [0465] Sereda M. et al. A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron.* 1996;16(5):1049-60.
- [0466] 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.
- [0467] Sereda MW, Nave KA. Animal models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A). *Neuromol Med* 2006; 8: 205-215.
- [0468] Suter U, Scherer SS. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4: 714-726.
- [0469] 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.
- [0470] Tashiro H, Fukuda Y, Hoshino S, Furukawa M, Shintaku S, Ohdan H, Dohi K. Assessment of microchimerism following rat liver transplantation. *Transplant Proc.* 1996 Jun;28(3):1279-80
- [0471] 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.
- [0472] Tobler AR, Liu N, Mueller L, Shooter EM. Differential aggregation of the Trembler and Trembler J mutants of peripheral myelin protein 22. *PNAS U S A.* 2002; 99(1):483-488.
- [0473] 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.
- [0474] 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.
- [0475] Zelman SJ, Rapp NS, Zenser TV, Mattammal MB, Davis BB. Antithyroid drugs interact with renal medullary prostaglandin H synthase. *J Lab Clin Med.* 1984; 104(2):185-192.

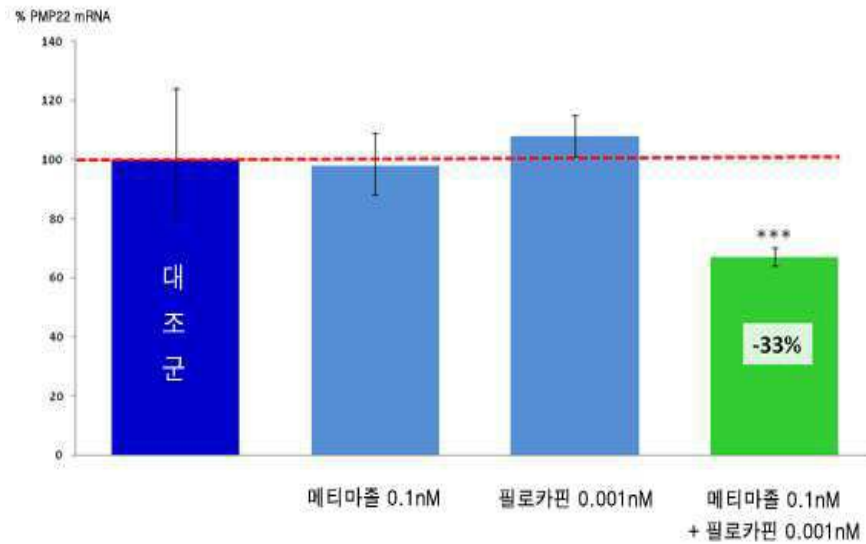
도면

도면1

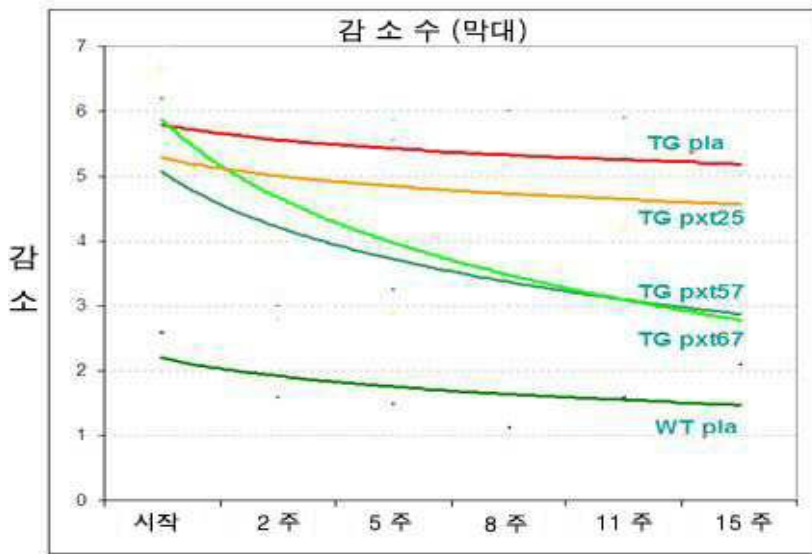


** : p<0.01 ; ****p<0.0001 ; 대조군과는 유의적으로 상이함 (쌍체 스튜던트 t 검정법).

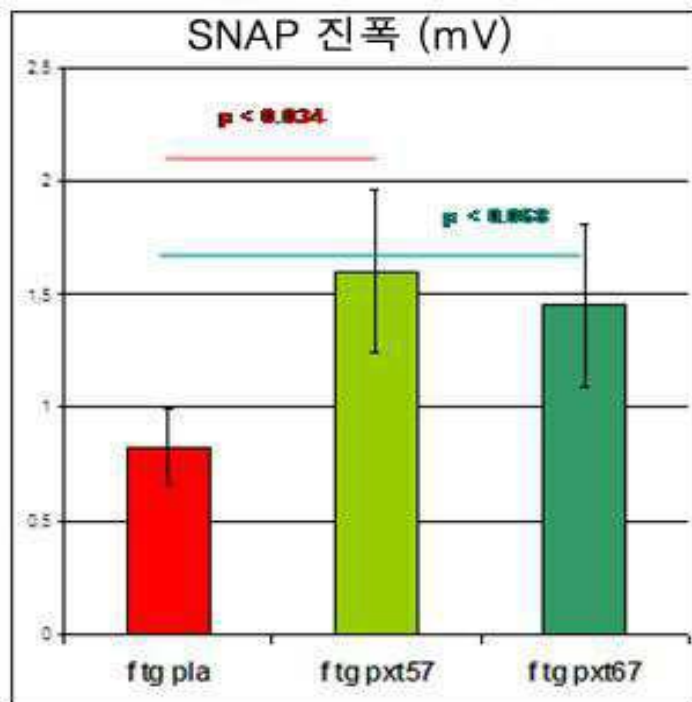
도면2



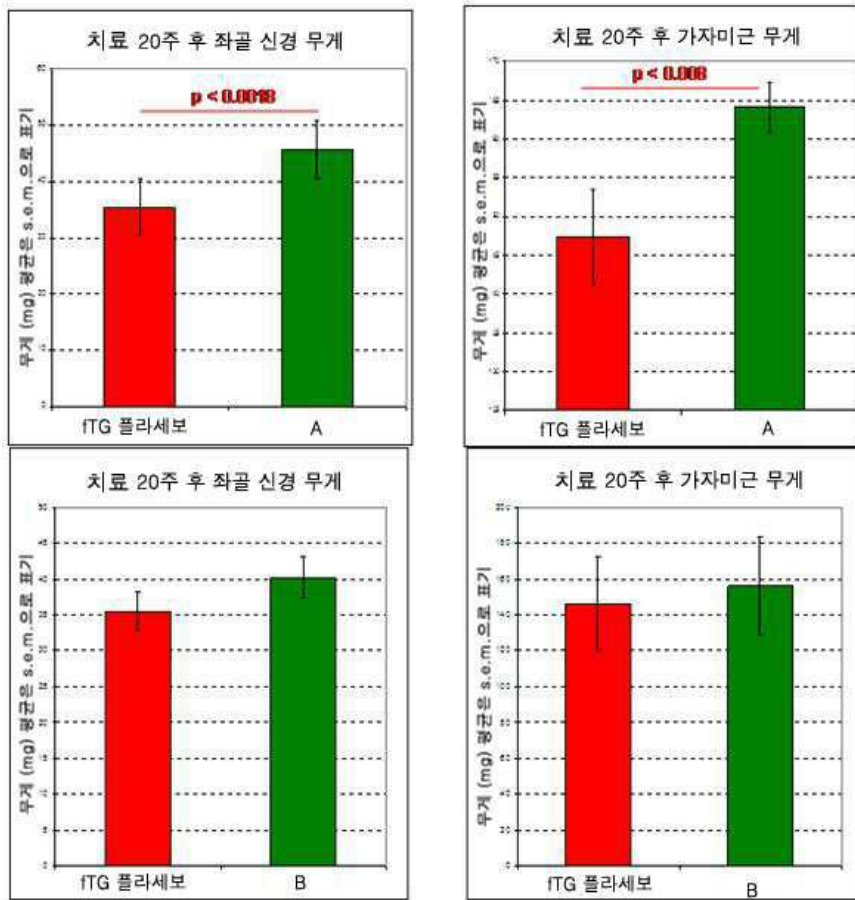
도면3



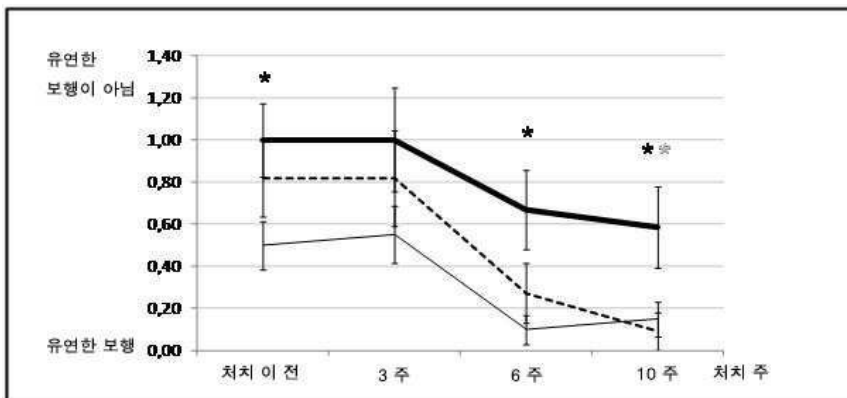
도면4



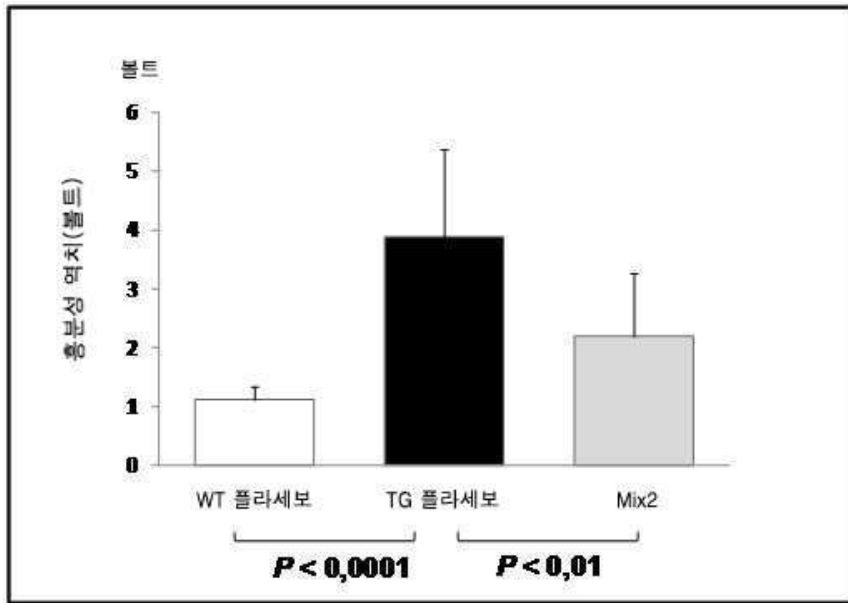
도면5



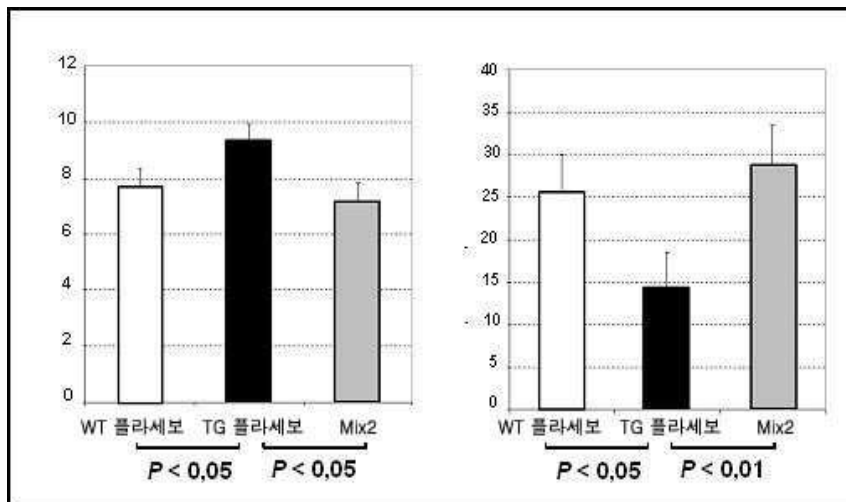
도면6



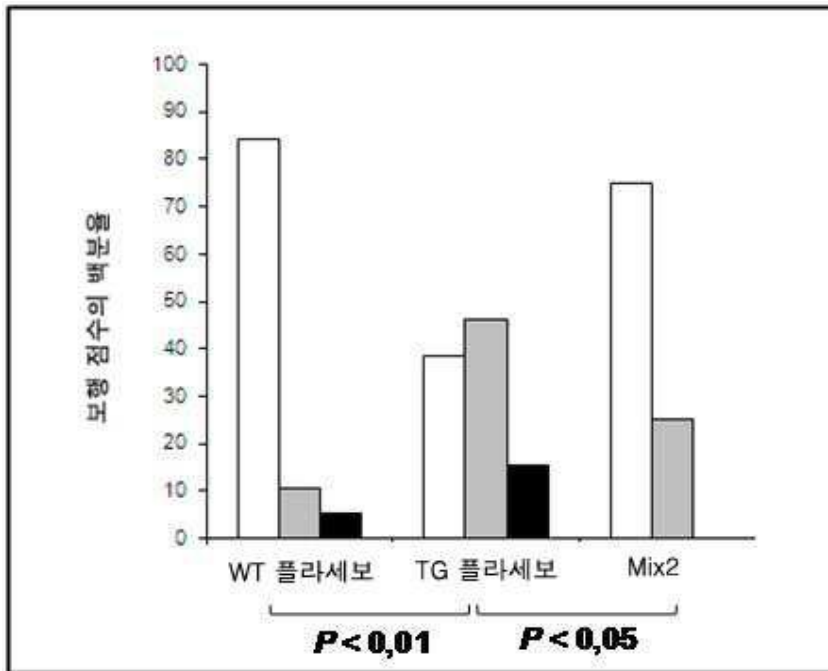
도면7



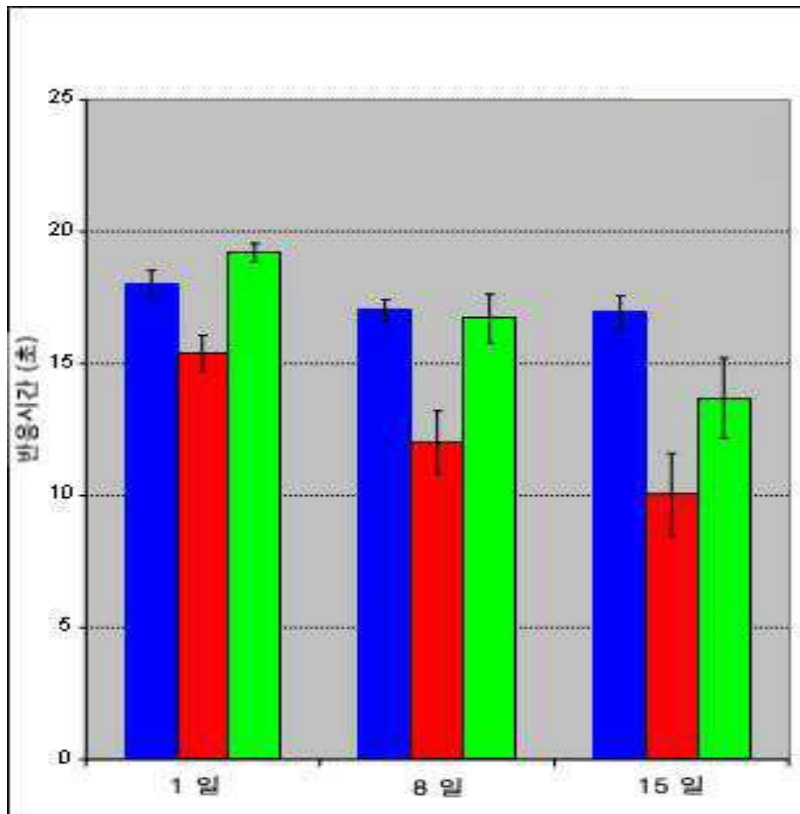
도면8



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Pharnext

<120> COMBINATIONS OF PILOCARPIN AND METHIMAZOL FOR TREATING CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE AND RELATED DISORDERS

<130> B738PC00

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1816

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220><221> CDS

<222> (208)..(690)

<400> 1

gagttacagg gagctccacc agagaacatc tcagggagcc tggctggaag cagcagagct 60

ccgagtctgg tctgctgtga gcatccgctg tcctgcgggg agggctcca tccttgctc 120

tcgattgcaa agaaatcaa gcggaggaag ggcgtacacc attggtctgg cacgctccac 180

cgagcccgag cccaactccc agccacc atg ctt cta ctc ttg ttg ggg atc ctg 234

Met Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ile Leu

1 5

ttc ctt cac atc gcg gtg cta gtg ttg ctc ttc gtc tcc acc atc gtc 282

Phe Leu His Ile Ala Val Leu Val Leu Leu Phe Val Ser Thr Ile Val

10 15 20 25

agc caa tgg ctc gag ggc aat gga cac agg act gat ctc tgg cag aac 330

Ser Gln Trp Leu Glu Gly Asn Gly His Arg Thr Asp Leu Trp Gln Asn

30 35 40

tgt acc aca tcc gcc ttg gga gcc gtc cag cac tgc tac tcc tca tct 378

Cys Thr Thr Ser Ala Leu Gly Ala Val Gln His Cys Tyr Ser Ser Ser

45 50 55

gtg agc gaa tgg ctt cag tct gtc cag gcc acc atg atc ctg tct gtc 426

Val Ser Glu Trp Leu Gln Ser Val Gln Ala Thr Met Ile Leu Ser Val

60 65 70

atc ttc agc gtc ctg tcc ctg ttc ctg ttc ttc tgc cag ctc ttc act 474

Ile Phe Ser Val Leu Ser Leu Phe Leu Phe Phe Cys Gln Leu Phe Thr

75	80	85	
ctc acc aaa ggc ggc cgc ttt tac atc act gga gtc ttc caa atc ctt			522
Leu Thr Lys Gly Gly Arg Phe Tyr Ile Thr Gly Val Phe Gln Ile Leu			
90	95	100	105
gct ggt ctg tgt gtg atg agt gca gcg gcc atc tac aca gtg aga cac			570
Ala Gly Leu Cys Val Met Ser Ala Ala Ala Ile Tyr Thr Val Arg His			
	110	115	120
agt gag tgg cat gtc aac aac gac tac tcc tat ggc ttt gct tac atc			618
Ser Glu Trp His Val Asn Asn Asp Tyr Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Ile			
	125	130	135
ctg gcc tgg gtg gct ttc ccg ctg gcc ctc ctt agt ggc atc atc tac			666
Leu Ala Trp Val Ala Phe Pro Leu Ala Leu Leu Ser Gly Ile Ile Tyr			
	140	145	150
gtg atc ctg cgg aaa cgc gaa tga ggcgccgac gcaccatccg tctaggetct			720
Val Ile Leu Arg Lys Arg Glu			
	155	160	
gagcgtgcat agggtacaca gggagggagg aaggaaacca gaaaaccaa ccaaccaacc			780
caaaagagct agccccaaa cccaacgca agccaaacca aacagaacac agttgagtgg			840
ggattgctgt cgattgaaga tgtatataat atctatggtt tataaaacct atttataaca			900
ctttttacat acatgtacat aggattgttt gctttttatg ttgacctca gcctcgtgtt			960
gaatcttaaa cgactctaca tctaacact ataaccaagc tcagtatttt cgttttgttt			1020
cgtttttttc atctttttgt tttgetcaga cataaaaaaa aaaaaatcca cgtggccccc			1080
tttcatctga aagcagatcc ctccctcca ttcaacctca taggataacc aaagtgcggg			1140
gacaaacccc agatggccag aggttcacac tatgggtgac ccagtgaatt tagcaggaat			1200
aatccgctgc ccgaatcaat gtgtgaagcc ctaagcactc acagacgaaa cgccctgacc			1260
agagccctct gcgaaaccaa tagctggtgg ctgcggaaca cttgacctg aaggcggagt			1320
actggggcca catgttttaa tgagacgtca gagacaagca atctgtgaaa tgggtctata			1380
gatttaccat tccttgttat tactaatcat ttaaaccact cactggaaac tcaattaaca			1440
gttttatgac ctacagcaga acagagacc gatacaaacg gttcgttaact gctttcgtac			1500
atagctagge tgttgttatt actacaataa ataaatctca aagccttcgt cacteccaca			1560
gttttctcac ggtcggagca tcaggacgag cgtctagacc cttgggacta gcaaattccc			1620

tggtttctg ggictagagt gttctgtgcc tccaaggact gtctagcgat gacttgtatt 1680

ggccaccaac ttagatgta tatacgggtgt cttctgatg ctaagactcc agacctttct 1740

tggttttgc tgccttttct gattttatac caactgtgtg gactaagatg cattaaaata 1800

aacatcagag taactc 1816

<210> 2

<211> 160

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Met Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ile Leu Phe Leu His Ile Ala Val Leu

1 5 10 15

Val Leu Leu Phe Val Ser Thr Ile Val Ser Gln Trp Leu Glu Gly Asn

 20 25 30

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

 35 40 45

Ala Val Gln His Cys Tyr Ser Ser Ser Val Ser Glu Trp Leu Gln Ser

 50 55 60

Val Gln Ala Thr Met Ile Leu Ser Val Ile Phe Ser Val Leu Ser Leu

65 70 75 80

Phe Leu Phe Phe Cys Gln Leu Phe Thr Leu Thr Lys Gly Gly Arg Phe

 85 90 95

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

 100 105 110

Ala Ala Ala Ile Tyr Thr Val Arg His Ser Glu Trp His Val Asn Asn

 115 120 125

Asp Tyr Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Ile Leu Ala Trp Val Ala Phe Pro

 130 135 140

Leu Ala Leu Leu Ser Gly Ile Ile Tyr Val Ile Leu Arg Lys Arg Glu

145 150 155 160

<210> 3

<211> 17

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Forward primer_rat PMP22
 <400> 3
 ggaaacgcga atgaggc 17
 <210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Reverse primer_rat PMP22
 <400> 4
 gttctgtttg gtttgctt 19
 <210> 5
 <211> 690
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus
 <220><221> CDS
 <222> (15)..(626)
 <400> 5
 ggccggctgcc gaag atg gcg gag ggg cag gtt cta gta ttg gat ggc cgg 50

 Met Ala Glu Gly Gln Val Leu Val Leu Asp Gly Arg
 1 5 10
 ggc cat ctt ctg ggc cgc ctg gcg gcc att gtg gcc aag cag gta ctg 98
 Gly His Leu Leu Gly Arg Leu Ala Ala Ile Val Ala Lys Gln Val Leu
 15 20 25
 ctg ggc cga aag gtg gtg gtt gta cgc tgt gag ggc atc aac att tct 146
 Leu Gly Arg Lys Val Val Val Val Arg Cys Glu Gly Ile Asn Ile Ser

 30 35 40
 gga aat ttc tac aga aac aag tta aag tat ctg gcc ttt ctc cga aag 194
 Gly Asn Phe Tyr Arg Asn Lys Leu Lys Tyr Leu Ala Phe Leu Arg Lys
 45 50 55 60
 cgg atg aac acc aac ccg tct cga ggc ccc tac cac ttc cga gcc cca 242
 Arg Met Asn Thr Asn Pro Ser Arg Gly Pro Tyr His Phe Arg Ala Pro

65	70	75	
agc cgc att ttt tgg cgc act gtg cga ggc atg ctg ccg cac aag acc			290
Ser Arg Ile Phe Trp Arg Thr Val Arg Gly Met Leu Pro His Lys Thr			
80	85	90	
aaa aga ggc cag gct gcc ctg gaa cgc ctc aag gtg ttg gat ggg atc			338
Lys Arg Gly Gln Ala Ala Leu Glu Arg Leu Lys Val Leu Asp Gly Ile			
95	100	105	
cct cca ccc tat gac aag aaa aag cgg atg gtg gtc cct gct gcc ctc			386
Pro Pro Pro Tyr Asp Lys Lys Lys Arg Met Val Val Pro Ala Ala Leu			
110	115	120	
aag gtt gtg cgg ctg aag cct acc aga aag ttt gct tac ctg ggg cgt			434
Lys Val Val Arg Leu Lys Pro Thr Arg Lys Phe Ala Tyr Leu Gly Arg			
125	130	135	140
ctg gct cat gag gtc ggg tgg aag tac cag gca gtg aca gct act ctg			482
Leu Ala His Glu Val Gly Trp Lys Tyr Gln Ala Val Thr Ala Thr Leu			
145	150	155	
gag gag aaa cgg aag gaa aag gca aag atc cat tac cgg aag aag aag			530
Glu Glu Lys Arg Lys Glu Lys Ala Lys Ile His Tyr Arg Lys Lys Lys			
160	165	170	
cag ctc ttg agg cta agg aaa cag gca gaa aag aat gtg gag aag aaa			578
Gln Leu Leu Arg Leu Arg Lys Gln Ala Glu Lys Asn Val Glu Lys Lys			
175	180	185	
atc tgc aag ttc aca gag gtc ctc aag acc aat gga ctc ttg gtg tga			626
Ile Cys Lys Phe Thr Glu Val Leu Lys Thr Asn Gly Leu Leu Val			
190	195	200	
acccaataaa gactgtttgt gcctcaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa			686
aaaa			690
<210> 6			
<211> 203			
<212> PRT			
<213> Rattus norvegicus			

<400> 6

Met Ala Glu Gly Gln Val Leu Val Leu Asp Gly Arg Gly His Leu Leu

1 5 10 15
 Gly Arg Leu Ala Ala Ile Val Ala Lys Gln Val Leu Leu Gly Arg Lys
 20 25 30
 Val Val Val Val Arg Cys Glu Gly Ile Asn Ile Ser Gly Asn Phe Tyr
 35 40 45
 Arg Asn Lys Leu Lys Tyr Leu Ala Phe Leu Arg Lys Arg Met Asn Thr
 50 55 60
 Asn Pro Ser Arg Gly Pro Tyr His Phe Arg Ala Pro Ser Arg Ile Phe

65 70 75 80
 Trp Arg Thr Val Arg Gly Met Leu Pro His Lys Thr Lys Arg Gly Gln
 85 90 95
 Ala Ala Leu Glu Arg Leu Lys Val Leu Asp Gly Ile Pro Pro Pro Tyr
 100 105 110
 Asp Lys Lys Lys Arg Met Val Val Pro Ala Ala Leu Lys Val Val Arg
 115 120 125
 Leu Lys Pro Thr Arg Lys Phe Ala Tyr Leu Gly Arg Leu Ala His Glu

130 135 140
 Val Gly Trp Lys Tyr Gln Ala Val Thr Ala Thr Leu Glu Glu Lys Arg
 145 150 155 160
 Lys Glu Lys Ala Lys Ile His Tyr Arg Lys Lys Lys Gln Leu Leu Arg
 165 170 175
 Leu Arg Lys Gln Ala Glu Lys Asn Val Glu Lys Lys Ile Cys Lys Phe
 180 185 190
 Thr Glu Val Leu Lys Thr Asn Gly Leu Leu Val
 195 200

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Forward primer_RPL13A
 <400> 7
 ctgccctcaa ggttgtg 17
 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Reverse primer_RPL13A
 <400> 8
 cttcttcttc cggtaatgga t 21
 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> FRET probe_Pmp22_fluoresc?ne labelled
 <400> 9
 gctctgagcg tgcataagggt ac 22
 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> FRET probe_Rpl13A_fluoresc?ne labelled
 <400> 10
 tcgggtggaa gtaccagcc 19
 <210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> FRET probe_Pmp22_rhodamine labelled
 <400> 11
 agggagggag gaaggaaacc agaaa 25
 <210> 12
 <211> 28
 <212> DNA

<213> Artificial sequence
 <220><223> FRET probe_Rp113A_rhodamine labelled

<400> 12
 tgacagctac tctggaggag aaacggaa 28
 <210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer 1_Sry-specific
 <400> 13
 gagagaggca caagttggc 19
 <210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer 2_Sry-specific
 <400> 14
 gcctcctgga aaaagggcc 19
 <210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220><223> Forward primer _PMP22 transgene
 <400> 15
 gacaaacccc agacagttg 19
 <210> 16
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Reverse primer_PMP22 transgene
 <400> 16
 ccagaaagcc agggaactc 19