



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2137537 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
G01N 33/68 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.09.16
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.05.29
(86)	Europeisk søknadsnr	08725256.5
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.02.07
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2009.12.30
(30)	Prioritet	2007.02.08, US, 888921 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(73)	Innehaver	Biogen Idec MA Inc., 14 Cambridge Center, Cambridge, Massachusetts 02142, USA
(72)	Oppfinner	LUKASHEV, Matvey, E., 3 Louis Road, Tewksbury, MA 01876, USA O'NEILL, Gilmore, 17 Grove Street, Medford, MA 02155, USA
(74)	Fullmektig	Nordic Patent Service A/S, Højbro Plads 10, DK-1200 KØBENHAVN K, Danmark

(54)	Benevnelse	Sammensetninger og anvendelser for behandling av multipel sklerose
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-2007/005879 WO-A2-2006/037342 GOLD R ET AL: "Safety of a novel oral single-agent fumarate, BG00012, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase 2 study", JOURNAL OF NEUROLOGY - ZEITSCHRIFT FUER NEUROLOGIE, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 253, no. Suppl. 2, 1 May 2006 (2006-05-01), pages II144-II145, XP009157336, ISSN: 0340-5354 SCHIMRIGK S ET AL: "Oral fumaric acid esters for the treatment of active multiple sclerosis: an open-label, baseline-controlled pilot study" EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY, vol. 13, no. 6, June 2006 (2006-06), pages 604-610, XP002496537 ISSN: 1351-5101 WIERINCKX ET AL: "Detoxication enzyme inducers modify cytokine production in rat mixed glial cells" JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, XX, vol. 166, no. 1-2, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 132-143, XP005000427 ISSN: 0165-5728

Sammensetninger og anvendelser for behandling av multippel sklerose

Beskrivelse

5 **[0001]** Det tilveiebringes visse forbindelser for å behandle nevrologiske sykdommer, inkludert demyeliniserende nevrologiske sykdommer, særlig multippel sklerose.

[0002] Multippel sklerose (MS) er en autoimmun sykdom der den autoimmune aktiviteten rettes mot antigener fra sentralnervesystemet. Sykdommen kjennetegnes ved
10 betennelse i deler av sentralnervesystemet, som fører til tap av myelinmantelen rundt nevronele aksoner (demyelinisering), tap av aksoner og til slutt død av nevroner, oligodendrocytter og gliaceller.

[0003] Anslagsvis lider 2 500 000 mennesker i verden av MS. Den er en av de vanligste sykdommene i sentralnervesystemet hos unge voksne. MS er en kronisk,
15 progressiv, invalidiserende sykdom, som vanligvis rammer ofrene litt etter ungdomsalderen, og diagnosen stilles vanligvis et sted mellom 20- og 40 års alderen, selv om utbruddet kan skje tidligere. Sykdommen er ikke direkte arvelig, selv om genetisk mottakelighet spiller en rolle i utviklingen av sykdommen. Relapserende-remitterende MS er i form av tilbakevendende anfall av fokal eller multifokal nevrologisk dysfunksjon. Anfall kan
20 forekomme, remittere, og gjenta seg, tilsynelatende tilfeldig, over mange år. Remisjonen er ofte ufullstendig og når anfallene kommer etter hverandre, følger en trinnvis nedadgående progresjon med økende varige nevrologiske svekkelser.

[0004] Selv om ulike immunoterapeutiske legemidler kan gi lindring hos pasienter med MS, er det ingen som kan reversere sykdomsutviklingen, og noen kan gi alvorlige
25 bivirkninger. De fleste eksisterende behandlingene for MS dreier seg om å dempe betennelse eller undertrykke eller modulere immunsystemet. Siden 2006, har de tilgjengelige behandlingene for MS redusert betennelse og antall nye episoder, men ikke alle har en effekt på sykdomsutviklingen. En rekke kliniske studier har vist at undertrykkelse av betennelse i kronisk MS sjelden begrenser progresjonen av uførhet gjennom vedvarende
30 sykdomsprogresjon i særlig grad, noe som tyder på at nevronele skade og betennelse er uavhengige patologier. Å fremme remyelinisering av sentralnervesystemet som en reparasjonsmekanisme og ellers forebygge aksontap og nevrondød, er noen av de viktigste tiltakene ved behandling av MS. For en omfattende gjennomgang av MS og dens eksisterende behandlingsformer, se f.eks. McAlpine's Multiple Sclerosis, av Alastair Compston et al., 4. utgave, Churchill Livingstone Elsevier, 2006.
35

[0005] I pattedyrceller fungerer "fase 2-enzymene" som en beskyttelsesmekanisme mot oksygen-/nitrogenforbindelser (ROS/RNS), elektrofiler og xenobiotika. Disse enzymene uttrykkes ikke vanligvis ved sine maksimale konsentrasjoner og uttrykkningen av dem kan induseres med en rekke naturlige og syntetiske midler. Kjernefaktor E2-relatert faktor 2

(Nrf2) er en transkripsjonsfaktor som er ansvarlig for å indusere en rekke viktige antioksidant- og avgiftningsenzymmer som koordinerer en beskyttende cellerespons til metabolsk og toksisk stress.

[0006] ROS/RNS gjør mest skade i hjernen og nevronvev, der de angriper post-mitotiske (dvs. celler som ikke deler seg) som gliaceller, oligodendrocytter, og nevroner, som er særlig følsomme overfor frie radikaler. Denne prosessen fører til nevronal skade. Oksidativt stress har blitt implisert i patogenesen av en rekke neurodegenerative sykdommer, inkludert ALS, Alzheimers sykdom (AD) og Parkinsons sykdom (PD). For gjennomgang, se f.eks. van Muiswinkel et al., *Drug Targets CNS--Neurol. Disord.*, 2005, 4:267-281. Et anti-oksidativt enzym under kontroll av Nrf2, NQO1 (NAD(P)H-dehydrogenase, kinon (1), ble nylig rapportert å være i det vesentlige oppregulert i hjernevevene til AD- og PD-pasienter (Muiswinkel et al., *Neurobiol. Aging*, 2004, 25: 1253). Tilsvarende ble økt uttrykkelse av NQO1 rapportert i ryggmargen til ALS-pasientene (Muiswinkel et al., *Curr. Drug Targets--CNS. Neural. Disord.*, 2005, 4:267-281) og i aktive og kroniske lesjoner i hjernen til pasienter som lider av MS (van Horssen et al., *Free Radical Biol. & Med.*, 2006, 41. 311-311). Disse observasjonene indikerer at Nrf2-reaksjonsveien kan aktiveres i neurodegenerative og neuroinflammatoriske sykdommer som en endogen beskyttende mekanisme. Faktisk, har det nylig blitt rapportert at induert aktivering av Nrf2-avhengige gener med visse syklopenanon-baserte forbindelser (NEPP) motvirker de toksiske effektene på metabolsk inhibering og ROS/RNS-produksjon i hjernen og beskytter nerveceller mot å dø in vitro og in vivo (se Satoh et al., *PNAS*, 2006, 103(3): 768-773).

[0007] I tillegg har mange publikasjoner rapportert neurobeskyttende effekter av forbindelser i naturlige forbindelser som stammer fra planter ("fytokjemikalier"), inkludert α -tokoferol (vitamin E), lykopen (tomater), resveratrol (røde druer), sulforafan (brokkoli), EGCG (grønn te), osv. For gjennomgang, se Mattson and Cheng, *Trends in Neurosci.*, 2006, 29(11): 632-639. Opprinnelig ble effekten av disse forbindelsene tilskrevet de anti-oksiderende egenskapene deres. Mens de fleste anti-oksidanter kun er virksomme i høye konsentrasjoner, ser imidlertid i det minste noen av disse forbindelsene ut til å utøve neurobeskyttende effekter ved mye lavere doser. Nye funn tyder på at disse forbindelsene kan utøve sine neurobeskyttende effekter ved å aktivere cellulære stressreaksjonsveier, inkludert Nrf2-reaksjonsveien, som fører til oppregulering av neurobeskyttende gener. Den eksakte virkningsmekanismen til disse forbindelsene er foreløpig dårlig forstått.

[0008] Hittil har mer enn 10 forskjellige kjemiske klasser av induerere i Nrf2-reaksjonsveien blitt identifisert, inkludert isotiocyanater og deres tioladdisjonsprodukter, ditiokarbamater, samt 1,2-ditiol-3-tioner, treverdige arsenderivater (f.eks. fenylarsenoksid), tungmetaller, visse konjugerte sykliske og asykliske polyener (inkludert porfyriner, klorofylliner og klorofyll) og nabodimerkaptaner. Disse induererne har få strukturelle likheter. De er stort sett elektrofiler og alle kan reagere kjemisk med tiolgrupper ved alkylering, oksidasjon eller reduksjon, noe som tyder på at den intracellulære sensoren for

induserere sannsynligvis inneholder svært reaktive (cystein)-tioler. Indusererne kan modifisere tiolgrupper av en rekke mekanismer, inkludert: alkylering (Michael-addisjonsakseptorer, isotiocyanater, kinoner); oksidasjon (f.eks. peroksider og hydroperoksider); og direkte reaksjon med tiol-/disulfidbindinger (f.eks. nabo-ditioler som

5 1, 2-dimerkaptopropanol, liponsyre). Disse ulike responsmekanismene gjør cellulære responser plastiske for en rekke elektrofile og oksidative stressfaktorer.

[0009] Kappos et al., "BG00012, et nytt oralt fumarat, er effektivt hos pasienter med relapserende-remitterende multippel sklerose, "SAGE JOURNALS: MULTIPLE SCLEROSIS, september 2006, bind 12, side 585, s. 325, og angir resultatene av en fase 2b-

10 studie utført for å bestemme effekten av tre doser av BG00012: 120 mg/dag, 360 mg/dag og 720 mg/dag. BG00012 på 720 mg/dag (240 mg tre ganger daglig) ble funnet å redusere hjerneslesjonsaktivitet som kunne detekteres ved MR hos RRMS-pasienter.

[0010] Det er beskrevet fremgangsmåter som omfatter i det minste én av de følgende fremgangsmåtene:

- 1) fremgangsmåter for å ettersøke minst én ny kandidatforbindelse for å behandle en
- nevrologisk sykdom;
- 2) fremgangsmåter for å evaluere nevrobeskyttende egenskaper med minst én
- legemiddelkandidat for å behandle en nevrologisk sykdom;
- 20 3) fremgangsmåter for å sammenligne (f.eks. bioekvivalens) minst to farmasøytiske sammensetninger som omfatter fumarsyrederivater;
- 4) fremgangsmåter for å behandle en nevrologisk sykdom ved å administrere minst én
- forbindelse som er delvis strukturelt lik DMF eller MMF til individet som trenger det;
- og
- 25 5) fremgangsmåter for å behandle en nevrologisk sykdom med en kombinasjonsterapi som omfatter å administrere minst én første forbindelse som oppregulerer Nrf2-
- reaksjonsveien og minst én andre forbindelse som ikke oppregulerer Nrf2-
- reaksjonsveien.

30 **[0011]** En nevrologisk sykdom er en nevrodegenerativ sykdom som for eksempel ALS, Parkinsons sykdom, Alzheimers sykdom og Huntingtons sykdom. I oppfinnelsen er MS den nevrologiske sykdommen.

[0012] Den medisinske anvendelsen ifølge oppfinnelsen omfatter å administrere DMF eller MMF oralt til et pattedyr.

35 **[0013]** I en utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en farmasøytisk sammensetning til bruk ved behandling av multippel sklerose, idet sammensetningen består av: (a) dimetylfumarat (DMF) eller monometylfumarat (MMF), og (b) ett eller flere farmasøytisk akseptable hjelpestoffer, der sammensetningen administreres oralt til et individ som har behov for behandling av multippel sklerose, og der dosen av dimetylfumarat

eller monometylfumarat som skal administreres er 480 mg per dag.

[0014] I noen utførelsesformer består sammensetningen av dimetylfumarat (DMF) og én eller flere farmasøytisk akseptable hjelpestoffer. I noen utførelsesformer består sammensetningen av monometylfumarat (MMF) og én eller flere farmasøytisk akseptable
5 hjelpestoffer. I noen utførelsesformer skal sammensetningen administreres i form av en tablett, en suspensjon, eller en kapsel. I noen utførelsesformer skal sammensetningen administreres til individet i 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 eller 200 uker eller mer. I noen utførelsesformer skal sammensetningen administreres til individet i minst 12 uker.

[0015] I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen dimetylfumarat (DMF)
10 eller monometylfumarat (MMF) for anvendelse ved behandling av multipel sklerose, der dimetylfumarat (DMF) eller monometylfumarat (MMF) er den eneste nevrobeskyttende forbindelsen som skal administreres, og der dimetylfumarat (DMF) eller monometylfumarat (MMF) skal administreres oralt til et individ som har behov for behandling av multipel sklerose i en dose på 480 mg per dag.

[0016] I noen utførelsesformer er dimetylfumarat (DMF) den eneste nevrobeskyttende
15 forbindelsen som skal administreres. I noen utførelsesformer er monometylfumarat (MMF) den eneste nevrobeskyttende forbindelsen som skal administreres. I noen utførelsesformer skal dimetylfumarat (DMF) eller monometylfumarat (MMF) administreres i form av en tablett, en suspensjon eller en kapsel. I noen utførelsesformer skal dimetylfumarat (DMF)
20 eller monometylfumarat (MMF) administreres til individet i 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 eller 200 uker eller mer. I noen utførelsesformer skal dimetylfumarat (DMF) eller monometylfumarat (MMF) administreres til individet i minst 12 uker.

[0017] Andre trekk og utførelsesformer ifølge oppfinnelsen vil fremgå av den følgende beskrivelsen og patentkravene.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

[0018] Figur 1 viser at DMF og MMF er aktivatorer av Nrf2 ved konsentrasjoner innenfor et klinisk eksponeringsområde (celler i kultur).

[0019] Figur 2 viser resultatene av RNAi-eksperimenter.

[0020] Figur 3 viser tegn på Nrf2-aktivering av DMF og MMF in vivo.

[0021] Figur 4 viser tegn på Nrf2-aktivering av DMF og MMF in vivo.

[0022] Fumarsyreestere, som DMF, er foreslått for behandling av MS (se f.eks. Schimrigk et al., Eur. J. Neural., 2006, 13(6):604-10; Drugs R&D. 2005, 6(4):229-30).

[0023] Det er blant annet beskrevet midler for å identifisere forbindelser med en
35 ny terapeutisk modalitet som er nyttig i det minste ved én av flere nevrologiske indikasjoner og eventuelt komplementær med andre legemidler for å behandle en nevrologisk sykdom, inkludert en rekke av immunmodulatorer som brukes i dag.

[0024] DMF er et medlem av en stor gruppe av anti-oksiderende molekyler som er

kjent for de cytopeskyttende og anti-inflammatoriske egenskapene sine. Disse molekylene deler også den egenskapen at de aktiverer Nrf2-reaksjonsveiaktiveringen. Således gir funnet at DMF aktiverer Nrf2-reaksjonsveien i sammenheng med de nevrobeskyttende effektene av DMF ytterligere en begrunnelse for identifikasjon av strukturelt og/eller mekanistisk beslektede molekyler som ville forventes å være terapeutisk effektive ved behandling av nevrologiske forstyrrelser, som f.eks. MS.

[0025] Visse uttrykk defineres i denne delen; andre definisjoner gis gjennom hele beskrivelsen.

[0026] Uttrykkene "aktivering" og "oppregulering", når de anvendes med henvisning til Nrf2-reaksjonsveien, anvendes om hverandre her.

[0027] Uttrykkene "sykdom" og "forstyrrelse" anvendes om hverandre her.

[0028] Uttrykket "et legemiddel for å behandle en nevrologisk sykdom" henviser til en forbindelse som har en terapeutisk fordel i en spesifisert nevrologisk sykdom som vist i minst én dyremodell av den nevrologiske sykdommen eller i humane kliniske forsøk for behandling av den nevrologiske sykdommen.

[0029] Uttrykket "nevrobeskyttelse" og beslektede uttrykk henviser til forebygging eller bremsing av nevronal degenerasjon, inkludert for eksempel, demyelinisering og/eller aksonalt tap, og/eller at nevroner eller oligodendrocytter dør. Nevrobeskyttelse kan foregå på flere måter, f.eks. ved å redusere inflammasjon, å gi nevroτροφiske faktorer, å fange frie radikaler, osv. Som anvendt her anses en forbindelse som nevrobeskyttende hvis den (1) oppregulerer Nrf2-reaksjonsveien over en viss terskel, og (2) tilveiebringer nevrobeskyttelse, uavhengig av andre potensielle virkningsmekanismer.

[0030] Uttrykkene "behandling", "terapeutisk fremgangsmåte", "terapeutiske fordeler" og lignende henviser til både terapeutiske og profylaktiske/forebyggende tiltak. Således kan det blant de som trenger behandling være personer som allerede har en spesifisert sykdom og som står i fare for å få denne sykdommen.

[0031] Uttrykkene "terapeutisk effektiv dose" og "terapeutisk effektiv mengde" henviser til den mengden av en forbindelse som fører til minst én av forebyggelse eller forsinkelse av utbruddet eller lindring av symptomer av en nevrologisk sykdom i et individ eller at det oppnås et ønsket biologisk resultat, slik som redusert nevrodegenerasjon (f.eks. demyelinisering, aksonalt tap, og nevronal død) eller redusert betennelse av cellene i sentralnervesystemet.

[0032] Det er her beskrevet fremgangsmåter for å evaluere de nevrobeskyttende egenskapene til testforbindelser, inkludert de følgende fremgangsmåtene:

- 1) fremgangsmåter for å ettersøke nye kandidatforbindelser som kan være nyttige for å behandle en nevrologisk sykdom;
- 2) fremgangsmåter for å evaluere nevrobeskyttende egenskaper av midlene og

kandidatene som anvendes eller foreslås for å behandle en nevrologisk sykdom;

- 3) fremgangsmåter for å sammenligne (f.eks. for bioekvivalens) to eller flere farmasøytiske sammensetninger som inneholder fumarsyrederivater.

5 **[0033]** Som beskrevet her omfatter fremgangsmåtene 1-3:

- a) å bringe en celle i kontakt med testforbindelsen,
- b) å bestemme om Nrf2-reaksjonsveien oppreguleres i cellen,
og, i noen utførelsesformer, i tillegg å utføre følgende trinn:
- 10 c) å bestemme om testforbindelsen bremser eller forebygger demyelinisering, aksonalt tap, og/eller nevronal død, og/eller
- d) å velge ut testforbindelsen som en kandidat for å behandle nevrodegenerasjon i en nevrologisk sykdom dersom 1) Nrf2-reaksjonsveien oppreguleres og 2) demyelinisering, aksonalt tap, og/eller nevronal død er/blir forhindret eller bremsset.

15

Fremgangsmåte 1

[0034] Fremgangsmåtene for å ettersøke en kandidatforbindelse for å behandle en nevrologisk sykdom som beskrevet her omfatter:

20

- a) å bringe en celle i kontakt med flere testforbindelser,
- b) å bestemme om Nrf2-reaksjonsveien oppreguleres i cellen, og
- c) å velge blant de flere forbindelsene minst én forbindelse som oppregulerer Nrf2-reaksjonsveien,

25

der en oppregulering av Nrf2-reaksjonsveien med den valgte minst ene forbindelsen indikerer at den valgte minst ene forbindelsen kan anvendes til å behandle en nevrologisk sykdom. De flere forbindelsene kan for eksempel representeres ved et kombinatorisk kjemisk bibliotek, og søkefremgangsmåten kan utføres av et høy-gjennomstrømningssøk som beskrevet i f.eks. High-Throughput Screening in Drug Discovery (Methods and Principles in Medicinal Chemistry), av Jörg Hüser (utg.), John Wiley & Sons (2006).

30

[0035] Kombinatoriske bibliotek av forbindelser er også beskrevet i f.eks. Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries (Tetrahedron Organic Chemistry) Ian Salusbury (utg.), Elsevier (1998); Combinatorial Libraries: Synthesis, Screening and Application Potential (Library Binding), av Riccardo Cortese (utg.), Walter de Gruyter (1995). Forbindelsesbibliotekene kan for eksempel være kinonbibliotek og andre biblioteker, som beskrevet i Mittoo, Comb. Chem. & High Throughput Screen, 2006, 9:421-423.

35

[0036] Den minst ene forbindelsen eller flere forbindelsene som ettersøkes

og/eller velges, omfatter minst én forbindelse valgt blant minst én av de følgende forbindelsesgruppene: milde alkyliserende midler, Michael-addisjonsakseptorer eller forbindelser som metaboliseres til Michael-addisjonsakseptorer, inkludert forbindelsene av formlene I, II, III, eller IV.

- 5 **[0037]** Den minst ene forbindelsen velges blant fumarsyre, fumarsyresalter og fumar-syrederivater.

Fremgangsmåte 2

- 10 **[0038]** Her er det også beskrevet fremgangsmåter for å evaluere neurobeskyttende egenskaper til minst ett legemiddel eller legemiddelkandidat for å behandle minst én neurologisk sykdom. Slike fremgangsmåter omfatter:

- 15 a) å bringe en celle i kontakt med det minst ene legemiddelet eller legemiddelkandidaten, og
b) å bestemme om Nrf2-reaksjonsveien oppreguleres i cellen,

der oppreguleringen av Nrf2-reaksjonsveien med det minst ene legemiddelet eller legemiddelskandidaten indikerer at det minst ene legemiddelet eller legemiddelkandidaten er neurobeskyttende ved å behandle et menneske som har en neurologisk sykdom.

- 20 **[0039]** Oppreguleringen av Nrf2-reaksjonsveien med det minst ene legemiddelet eller legemiddelkandidaten kan indikere at det minst ene legemiddelet eller legemiddelkandidaten har minst én aktivitet valgt blant å bremse demyelinisering, å bremse tapet av aksoner og å bremse hastigheten av nevronal død.

- 25 **[0040]** Fremgangsmåten for å evaluere minst ett legemiddel eller legemiddelkandidat kan omfatte ett ytterligere trinn:

- c) å evaluere demyelinisering, tap av aksoner og/eller nevronal død.

- 30 **[0041]** Trinn a) og c) kan utføres in vivo i minst en modell av en neurologisk sykdom, f.eks., som beskrevet nedenfor.

- [0042]** I de beskrevne fremgangsmåtene, spesielt de der den neurologiske sykdommen er multippel sklerose eller annen demyeliniserende sykdom, velges det minste ene legemiddelet eller legemiddelkandidaten for en neurologisk sykdom fra følgende:
- 35 FTY720 (2-(4-oktylfenetyl)-2-aminopropan-1,3-diol; Novartis), anti-IL 12-antistoff (f.eks. ABT-874; Abbott Laboratories); GSK683699 (GSK/Tanabe); NeuroVax (Immune Response Corp.; Darlington, Curr. Opin. Mol. Ther., 2005, 7(6):598-603); anti-CCR2-antistoff (f.eks., MLN 1202; Millennium); interferon β -1a (f.eks., Avonex®; Biogen Idec); anti- α 4-integrintantistoff (f.eks., Tysabri®; Biogen Idec/Elan); anti-CD20-antistoff (f.eks. Rituxan®

(Biogen Idec/Genentech); TV 5010 (Teva); NBI-788 (Neurocrine); MBP8298 (BioMS (se Warren et al., Eur. J. Neurol., 2006, 13(8):887-95); Mylinax (oral kladribin; 2-klordeoksyadenosin; Serono/IVAX); teriflunomid ((Z)-2-cyano -N-(4-(trifluormetyl)fenyl)-3-hydroksybut-2-enamid; Sanofi-Aventis); Temsirolimus (Wyeth); Laquinimod (5-klor-N-etyl-1,2-dihydro-4-hydroksy-1-metyl-2-okso-N-fenylkinolin-3-karboksamid; Active Biotech/Teva); og interferon tau (Tauferon; Pepgen).

[0043] Det/den minst ene legemiddelet eller legemiddelkandidaten som evalueres kan være minst én forbindelse valgt blant minst én klasse valgt blant et mildt alkyleringsmiddel, en Michael-addisjonsakseptor, og en forbindelse som metaboliseres til en Michael-addisjonsakseptor, inkludert forbindelser av formler I, II, III eller IV.

[0044] Forbindelsen kan være fumarsyre, dets salt eller et fumarsyrederivat.

Fremgangsmåte 3

[0045] Det er også beskrevet fremgangsmåter for å sammenligne (dvs. for bioekvivalens) minst to farmasøytiske sammensetninger. Slike fremgangsmåter omfatter:

- a) å bringe en celle i kontakt med minst en første sammensetning omfattende en testforbindelse, og
- b) å sammenligne konsentrasjonen av Nrf2-reaksjonsveioppreguleringen i cellen av testforbindelsen til den tilsvarende konsentrasjonen i Nrf2-reaksjonsveioppreguleringen i en celle som er behandlet med minst én annen sammensetning ("sammenligningssammensetning") omfattende DMF, MMF, eller begge deler.

[0046] Vesentlig ulike konsentrasjoner av oppregulering av de minst ene første og minst ene andre sammensetningene kan indikere at sammensetningene ikke er bioekvivalente.

[0047] Testforbindelsen kan være fumarsyre, saltet av denne, et fumarsyrederivat, eller blandinger av disse. Den første sammensetningen kan omfatte minst én av DMF eller MMF, eller både DMF og MMF. Dosen og/eller formuleringen av den minst ene sammensetningen kan være forskjellig fra dosen og eller formuleringen av den minst ene sammensetningen. Den minst ene sammensetningen kan være en sammensetning med kontrollert frigjøring, som f.eks. sammensetninger som er beskrevet i WO 2006/037342.

[0048] Fremgangsmåten kan videre omfatte et ytterligere trinn:

- c) å sammenligne minst ett farmakokinetisk parameter av det minst ene første og den minst ene andre sammensetningen.

[0049] Farmakokinetiske parametere og fremgangsmåter for å evaluere dette er godt kjent og beskrevet i f.eks. Pharmacokinetics, Second Edition (Drugs and the Pharmaceutical Sciences) av Milo Gibaldi et al. (utg.), Informa Healthcare (1982). Eksempler på slike farmakokinetiske parametere som kan evalueres inkluderer

5 serumhalveringstid, utskilling og volumfordeling.

[0050] Vesentlig ulike farmakokinetiske parameter(e) for den minst ene første og minst ene andre sammensetningen kan indikere at sammensetningene ikke er bioekvivalente.

[0051] Testforbindelsen som evalueres kan være et mildt alkyleringsmiddel, og

10 nærmere bestemt en Michael-addisjonsakseptor, eller en forbindelse som metaboliseres til en Michael-addisjonsakseptor.

[0052] Testforbindelsen kan være fumarsyre eller salt av denne, eller et fumarsyrederivat.

[0053] Det beskrives også fremgangsmåter for å behandle et pattedyr som har

15 eller står i fare for å utvikle en nevrologisk sykdom, inkludert de følgende fremgangsmåtene:

- 1) fremgangsmåter for å behandle en nevrologisk sykdom ved å administrere til individet som trenger det minst én forbindelse som er delvis strukturelt lik DMF eller

20 MMF (inkludert forbindelser som velges ved hjelp av fremgangsmåtene 1-3 som er beskrevet 1-3 ovenfor); og

- 2) fremgangsmåter for å behandle en nevrologisk forstyrrelse ved en kombinasjonsterapi som inkluderer å administrere en første forbindelse som ikke oppregulerer Nrf2-reaksjonsveien og en andre forbindelse som oppregulerer Nrf2-

25 reaksjonsveien.

Fremgangsmåte 4

[0054] Det er også tilveiebrakt en anvendelse for å behandle MS ved å administrere DMF eller MMF til individet som har behov for dette.

[0055] Anvendelsen omfatter å administrere DMF eller MMF oralt i en dose på 480 mg per dag.

[0056] Den medisinske anvendelsen innebærer å bremse eller forebygge

35 nevrodegenerering (nærmere bestemt f.eks. demyelinisering, aksonalt tap og/eller nevronal død) til et individ med behov for dette ved å administrere DMF eller MMF i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å gjøre minst én av å bremse eller forhindre demyelinisering, bremse eller forhindre aksonalt tap, og bremse eller forhindre nevronal død, f.eks. med minst 30 %, 50 %, 100 % eller høyere enn en kontroll gjennom en periode på minst 5, 10, 12, 20, 40,

52, 100 eller 200 uker, eller mer.

Fremgangsmåte 5

5 **[0057]** Det er også beskrevet en anvendelse for å behandle et pattedyr som har en nevrologisk sykdom ved kombinasjonsterapi. Slik anvendelse omfatter:

- a) å administrere til pattedyret en terapeutisk effektiv mengde av minst én første forbindelse som oppregulerer Nrf2-reaksjonsveien, og
- 10 b) å administrere en terapeutisk effektiv mengde av minst én andre forbindelse som ikke oppregulerer Nrf2-reaksjonsveien.

[0058] Den minst ene første forbindelsen, anvendt i trinn (a), kan være en forbindelse med formel I, II, III eller IV, f.eks. DMF eller MMF, og den minst ene andre
15 forbindelsen, som anvendes i trinn (b), kan være en immunundertrykkende eller en immunmodulerende forbindelse som ikke oppregulerer Nrf2-reaksjonsveien (f.eks. med mer enn 30 %, 50 %, 100 % mer enn en kontroll).

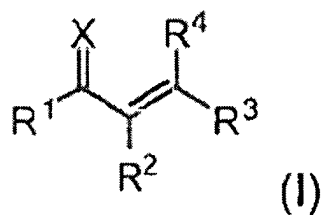
[0059] Anvendelsen som beskrives her omfatter å administrere til pattedyret en terapeutisk effektiv mengde av en forbindelse av formel I, II, III, eller IV.

20 **[0060]** I fremgangsmåte 5 som er beskrevet her, kan den minst ene første sammensetningen og den minst ene andre sammensetningen administreres samtidig (som separate sammensetninger eller en blandet sammensetning) eller etter hverandre i overlappende eller ikke-overlappende intervaller. I den sekvensielle administrasjonen, kan den minst ene første forbindelsen, og den minst ene andre forbindelsen administreres i
25 hvilken som helst rekkefølge. Lengden på et overlappende intervall er lengre enn for eksempel 2, 4, 6, 12, 24 eller 48 uker.

[0061] Michael-addisjonsakseptorer inkluderer generelt olefiner eller acetylenier konjugert til en elektrontiltrekkende gruppe, som karbonylholdige grupper, tiokarbonylholdige grupper, cyano, sulfonyl, sulfonamido, amido, formyl, keto og nitro.
30 Eksempler på karbonylgrupper er karboksylsyreestere og karboksylsyre.

[0062] I de beskrevne fremgangsmåtene blir den minst ene forbindelsen som ettersøkes, identifiseres, evalueres eller brukes til å behandle en nevrologisk forstyrrelse valgt blant et mildt alkyleringsmiddel, en Michael-addisjonsakseptor, og en forbindelse som metaboliseres til en Michael-addisjonsakseptor.

35 **[0063]** Som beskrevet her kan Michael-addisjonsakseptoren ha strukturen med formel I:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, der:

X er O, S, C(R)(C₁₋₁₂)alkyl; eller C(R)(C₂₋₁₂)alkenyl, der R er H,

(C₁₋₁₂)alkyl eller (C₂₋₁₂)alkenyl;

R¹, R², R³ og R⁴ velges uavhengig av hverandre blant: H; OH; O⁻; CO₂H, CO₂⁻; SH; S⁻; SO₂H, SO₂⁻; (C₁₋₂₄)alkyl; (C₁₋₂₄)alkenyl; (C₆₋₅₀)aryl, CO₂(C₁₋₂₄)alkyl; SO₂(C₁₋₂₄)alkyl; CO₂(C₁₋₂₄)alkenyl; SO₂(C₁₋₂₄)alkenyl; CO₂Y, der Y er psoralen-9-yl, retinyl, α-tokoferol, kalsiferyl, kortikosteroid-21-yl eller monosakkarid-ω-yl, (C₁₋₂₄)alkoksy; (C₁₋₂₄)alkenyloksy; (C₆₋₅₀)aryloksy;

(C₁₋₂₄)alkyltio; C(C₁₋₂₄)alkenyltio; (C₆₋₅₀)aryltio, amino; amido; arylalkyl; cyano; nitro; sulfonyl; sulfoksido; sulfonamid; formyl; keto; og naturlige D- og L-

aminosyre eller unaturlige aminosyrer; eller hvilke som helst to av X, R¹, R² og R³ og R⁴, kan være bundet sammen for å danne en syklisk gruppe; og der alkyl-, alkoksy-, alkenyl-, alkenyloksy-, aryl- og aryloksygruppene eventuelt kan substitueres med minst én gruppe valgt blant halogen (F, Cl, Br, eller I), OH, (C₁₋₄)alkoksy, nitro og cyano.

[0064] Som beskrevet her, kan den minst ene Michael-addisjonsakseptoren ha strukturen til formel I, med følgende forbehold:

R¹ velges fra: H; OH; O⁻; CO₂H, CO₂⁻; SH; S⁻; SO₂H, SO₂⁻; (C₁₋₂₄)alkyl;

(C₁₋₂₄)alkenyl; (C₆₋₅₀)aryl, CO₂(C₁₋₂₄)alkyl; SO₂(C₁₋₂₄)alkyl; CO₂(C₁₋₂₄)alkenyl;

SO₂(C₁₋₂₄)alkenyl; CO₂Y, der Y er psoralen-9-yl, retinyl, α-tokoferol, kalsiferyl, kortikosteroid-21-yl eller monosakkarid-ω-yl; (C₁₋₂₄)alkoksy;

(C₁₋₂₄)alkenyloksy; (C₆₋₅₀)aryloksy; (C₁₋₂₄)alkyltio; (C₁₋₂₄)alkenyltio;

(C₆₋₅₀)aryltio, amino; amido; cyano; nitro; sulfonyl; sulfoksido; sulfonamid; formyl; keto; og D- eller L-naturlige eller unaturlige aminosyrer, og der alkyl-, alkoksy-, alkenyl-, alkenyloksy-, aryl- og aryloksygruppene eventuelt kan substitueres med minst én gruppe valgt blant halogen (F, Cl, Br eller I), OH, (C₁₋₄)alkoksy, nitro og cyano;

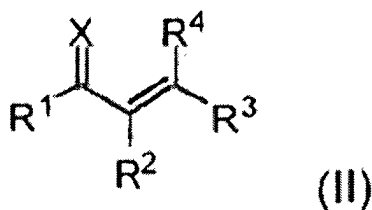
R² velges fra: H; CO₂H; CO₂⁻; SO₂H; SO₂⁻; (C₁₋₂₄)alkyl; (C₁₋₂₄)alkenyl;

(C₆₋₅₀)aryl, CO₂(C₁₋₂₄)alkyl; SO₂(C₁₋₂₄)alkyl; CO₂(C₁₋₂₄)alkenyl;

SO₂(C₁₋₂₄)alkenyl; CO₂Y, der Y er psoralen-9-yl, retinyl, α-tokoferol, kalsiferyl,

kortikosteroid-21-yl eller monosakkarid- ω -yl; (C₁₋₂₄)alkoksy;
 (C₁₋₂₄)alkenyloksy; (C₆₋₅₀)aryloksy; (C₁₋₂₄)alkyltio; (C₁₋₂₄)alkenyltio;
 (C₆₋₅₀)aryltio, amido; arylalkyl; cyano; nitro; sulfonyl, sulfoksido; sulfonamido;
 formyl, keto; og D- eller L-naturlige eller -unaturlige aminosyrer, der alkyl-,
 5 alkoksy-, alkenyl-, alkylenyl-, aryl- og aryloksy gruppene eventuelt kan
 substitueres med minst én gruppe valgt blant halogen (F, Cl, Br, eller I), OH, (C₁₋₄)alkoksy, nitro og cyano;
 og
 R³ og R⁴ er uavhengig av hverandre valgt blant: H; CO₂H, CO₂⁻; SO₂H, SO₂⁻; (C₁₋₂₄)alkyl;
 10 (C₁₋₂₄)alkenyl; (C₆₋₅₀)aryl, CO₂(C₁₋₂₄)alkyl; SO₂(C₁₋₂₄)alkyl; CO₂(C₁₋₂₄)alkenyl;
 SO₂(C₁₋₂₄)alkenyl; CO₂Y, der Y er psoralen-9-yl, retinyl,
 α -tokoferol, kalsiferyl, kortikostereoid-21-yl eller monosakkarid- ω -yl;
 (C₁₋₂₄)alkoksy; (C₁₋₂₄)alkenyl; (C₆₋₅₀)aryloksy; (C₁₋₂₄)alkyltio;
 (C₁₋₂₄)alkenyltio; (C₆₋₅₀)aryltio; amido; arylalkyl; cyano; nitro; cyano; nitro;
 15 sulfonyl; sulfoksido; sulfonamid; formyl; og keto; der alkyl-, alkoksy-, alkenyl-,
 alkylenyl-, aryl- og aryloksygruppene eventuelt substitueres med minst én
 gruppe valgt blant halogen (F, Cl, Br, eller I), OH, (C₁₋₄)alkoksy, nitro og cyano.

[0065] Som beskrevet her, kan den minst ene Michael-addisjonsakseptoren ha
 20 strukturen til formel II:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, der:

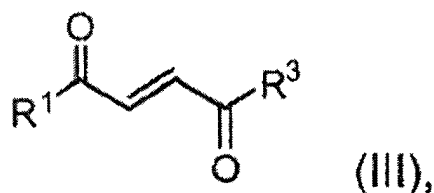
25 X velges fra O; S; C(R)(C₁₋₁₂)alkyl; og C(R)(C₂₋₁₂)alkenyl, der R velges blant H; (C₁₋₁₂)alkyl; og (C₂₋₁₂)alkenyl; og R¹, R², R³ and R⁴ er uavhengig av hverandre valgt
 blant: H; OH; O⁻; CO₂H; CO₂⁻; (C₁₋₁₂)alkenyl; (C₁₋₁₂)alkenyl; og CO₂(C₁₋₁₂)alkyl;
 eller hvilke om helst to av X, R¹, R² og R³ kan bindes sammen for å danne en
 syklisk del.

[0066] I forbindelsene av formler I-IV som beskrives her, kan det farmasøytisk
 akseptable saltet være et salt av et metall (M)-kation, der M kan være et alkali-, jordalkali-
 eller overgangsmetall som Li, Na, K, Ca, Zn, Sr, Mg, Fe eller Mn.

[0067] I de beskrevne fremgangsmåtene kan forbindelsene av formel I inkludere

fumarsyre, salter av denne og fumarsyrederivater.

[0068] Som beskrevet her, kan den minst ene forbindelsen med formel I ha strukturen ifølge formel III:



5

eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, der:

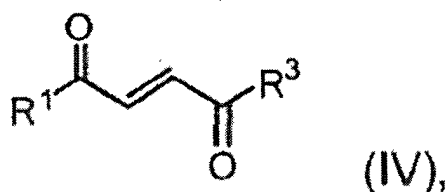
R^1 og R^3 velges uavhengig fra OH, O^- ; (C_{1-24})alkoksy; (C_{1-24})alkenyloksy; (C_{6-50})aryloksy; psoralen-9-yloksy; retinyloksy; α -tokoferoloksy; kalsiferyloksy; kortikosteroid-21-yloksy; monosakkarid- ω -yloksy, amino, og en D eller L naturlig eller unaturlig aminosyre, og der minst én av (C_{1-24})alkoksy-; (C_{1-24})alkenyloksy- og (C_{6-50})aryloksygruppene eventuelt kan substitueres med minst én gruppe valgt blant halogen (F, Cl, Br, eller I), OH, (C_{1-4})alkoksy, nitro og cyano.

15

[0069] Forbindelser der minst én av R^1 og R^3 stammer fra en naturlig eller unaturlig D-eller L-aminosyre beskrives i U.S. søknadsserienr. 10/433, 295, avsnitt 10 til 11 og 18-28, og 11/421,083.

[0070] Som beskrevet her, kan forbindelsen med formel (I) ha strukturen med formel IV:

20



25 eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, der:

30

R^1 og R^3 uavhengig velges fra OH; O^- ; (C_{1-24})alkoksy, allyloksy, vinyloksy, (C_{6-50})aryloksy; psoralen-9-yloksy; retinyloksy; α -tokoferoloksy; kalsiferyloksy; kortikosteroid-21-yloksy; monosakkarid- ω -yloksy, amino, og en D- eller L-naturlig eller unaturlig aminosyre, og der minst én av (C_{1-24})alkoksy, allyloksy, vinyloksy og

(C₆₋₅₀)aryloksy eventuelt kan substitueres med minst én gruppe valgt blant Cl, F, I, Br, OH, (C₁₋₄)alkoksy, nitro og cyano.

[0071] "Fumarsyrederivatet" beskrevet her velges fra forbindelsene av formel III, 5 forbindelse med formel IV og følgende:

- 1) fumarsyreamider som stammer fra naturlige og unaturlige aminosyrer D eller L, som beskrevet i U.S. patentsøknadsserienr. 10/433, 295, avsnitt 10 til 11 og 18-28 og 11/421,083.
- 10 2) en karbosyklisk eller oksasyklisk fumarsyreoligomer som beskrevet i U.S. patentsøknadsserienr. 10/511, 564, avsnitt 15-44, og
- 3) et glyserol- eller alkandiol eller polyolderivat av fumarsyre som beskrevet i U.S.-patent nr. 4 851 439, 5 149 695, 5 451 667, i kolonner 2-4.

15 **[0072]** I oppfinnelsen er "fumarsyrederivatet" DMF eller MMF.

[0073] I de beskrevne fremgangsmåtene er den minst ene forbindelsen som ettersøkes, evalueres, sammenlignes eller anvendes for å behandle en nevrologisk forstyrrelse ikke fumarsyre eller salt av denne eller et fumarsyrederivat (f.eks. DMF eller MMF).

20 **[0074]** Nrf2 (kjernefaktor-E2-relatert faktor 2, for sekvens av Nrf2, se aksesjonsnr. AAB32188) er en transkripsjonsfaktor som etter aktivering ved oksidativt stress bindes til antioksidantresponselementet (ARE), og aktiverer transkripsjon av Nrf2-regulerte gener. Denne reaksjonsveien har blitt godt kjennetegnet for sin rolle i leveravgiftningen og kjemisk forebygging gjennom aktivering av fase II-genuttrykkelse.

25 ARE-regulerte gener kan også bidra til å opprettholde redokshomeostasen ved å fungere som endogene antioksidantsystemer. For tiden inneholder listen over Nrf2-regulerte gener over 200 gener som koder for proteiner og enzymer som involveres i avgiftnings- og antioksidantrespons (Kwak et al. J. Biol. Chem., 2003, 278:8135), som f.eks. HO-1, ferritin, glutationperoksidase, glutation-S-transferaser (GST-er), NAD(P)H: kinonoksidoreduktaser, 30 nå allment kjent som nikotinamidkinonoksidoreduktase 1 (NQO1; EC 1.6.99.2, også kjent som DT-diaforase og menadionreduktase), NQO2, g-glutamylcysteinsyntase (g-GCS), glukuronosyltransferase, ferritin og hemeoksygenase-1 (HO-1), samt et hvilket som helst av enzymproteinene som er oppført i tabell 1 i Chen & Kunsch, Curr. Pharm. Designs, 2004, 10:879-891; Lee et al., J. Biol. Chem., 2003, 35 278(14): 12029-38, og Kwak, supra.

[0075] Følgelig, i fremgangsmåtene beskrevet her, kan det minst ene Nrf2-regulerte genet som anvendes for å vurdere aktiveringen av Nrf2-reaksjonsveien velges fra et fase II-avgiftningsenzym, et anti-oksidantenzym, et enzym av NADPH-genererings-systemet og Nrf2 i seg selv. Eksempler på fase II-avgiftningsenzymer inkluderer NQO1,

NQO2, GST-Ya, GST-π, GST-θ 2, GST-μ (1,2, 3), mikrosomal GST 3, katalytisk γ-GCS, regulatorisk GCS, mikrosomal epoksidhydrolase, UDP-glukuronosyltransferase, transaldolase, transketolase og legemiddelmetaboliserende enzym. Eksempler på antioksidantenzymene inkluderer HO-1, ferritin (L), glutationreduktase, glutationperoksidase, metallotionein-I, tioredoksin, tioredoksinreduktase, peroksiredoksin MSP23, Cu/Zn-superoksiddismutase og katalase. Eksempler på enzymene til NADPH-genereringssystemet inkluderer epleesyreenzym, UDP-glukosedehydrogenase, malatoksidoreduktase og glukose-6-fosfatdehydrogenase.

[0076] Antioksidantresponselementet (ARE, også henvist til som det elektrofile responselementet (EpRE), GRE1, ARE4 og StREb) er et cis-virkende DNA-regulatorisk element med en kjernenukleotidsekvens av 5'-TGA(C/T/G)NNNGC-3' (SEQ ID NR:1) (Rushmore et al., J. Biol. Chem., 1991, 266(18):11632-9; se også Nioi et al, Mutation Res., 2004, 555:14-171).

[0077] Følgelig kan DNA-sekvensen til ARE-elementet som Nrf2 bindes til (enten det foregående er en del av et endogent gen eller en kunstig konstruksjon), omfatte kjerne ARE-sekvensen TGA(C/T/G)NNNGC (SEQ ID NR: 2) eller ARE-konsensussekvensen (G/A)TGA(C/T/G)NNNGC(A/G) (SEQ ID NR:3). ARE-sekvensen kan omfatte hvilket som helst av de "minimale forsterker"-sekvensene som er vist i tabell 1.

[0078] ARE-sekvensen kan videre omfatte i det minste én av tilsvarende 5'- og 3'-USR-sekvenser som vist i tabell 1. I noen utførelsesformer omfatter ARE-sekvensen sekvensen GTGANNNNGCA (SEQ ID NR: 4), eller mer spesielt, muse (NNNN = gtcg) eller humane (NNNN = ctca) versjoner av denne.

Tabell 1

Arter	Gen	Element	5'-USR	Minimal forsterker	3'-USR	SEQ ID NR
mus	nqo1	ARE	agTCaCa	GTGAgtcgGCA	aaattt	SEQ ID NR:5
rotte	NQO1	ARE	agTCaCa	GTGACttgGCA	aaatct	SEQ ID NR:6
menneske	NQO1	ARE	agTCaCa	GTGACtcaGCA	gaatct	SEQ ID NR:7
mus	gsta1	EpRE	gcTAAtg	GTGACaaaGCA	actttc	SEQ ID NR:8
rotte	GSTA2	ARE	gcTAAtg	GTGACaaaGCA	actttc	SEQ ID NR:9
mus	gsta3	ARE	ctcAggc	ATGACattGCA	tttttc	SEQ ID NR:10
rotte	GSTP1	GPE1	agTCAct	ATGATtcaGCA	acaaa a	SEQ ID NR:11
menneske	GCLC	ARE4	ccTCccc	GTGACtcaGCG	ctttgt	SEQ ID NR:12
menneske	GCLM	EpRE	gaagAca	ATGACtaaGCA	gaaat c	SEQ ID NR:13
mus	ho1	StREb	cccAAcc	ATGACacaGCA	taaaa g	SEQ ID NR:14
ARE 'kjerne'...			TGACnnnGC			SEQ ID NR:15
ARE konsensus ...			T A Ann A T G A C nnn G C A aaaa			SEQ ID NR:16

[0079]

En dagsaktuell modell av Nrf2-funksjonen er som følger. Under basale forhold, sekvestreres Nrf2 i cytoplasmaet til aktin-bundet Kelch-lignende ECH-assosiert protein 1 (Keap1; aksesjonsnr. NP_987096 for human Keap1), et Cullin3-ubiquitinligase-adaptorprotein. Nærmere bestemt antas det N-terminale domenet av Nrf2, kjent som Neh2-domenet, å samhandle med det C-terminale Kelch-lignende domenet av Keap1. Som respons på xenobiotika eller oksidativt stress, frigjøres Nrf2 fra Keap1/Nrf2-komplekset, og fremmer dermed kjernetranslokasjon av Nrf2 samtidig som ARE-mediert gentranskripsjon aktiveres. Keap1-funksjonen krever i sin tur assosiasjon med Cullin3, et plattformprotein som posisjonerer Keap1 og substratet av dette i nærheten av E3-ligasen Rbx1, slik at subtrtet (Nrf2) kan polyubikvitineres og dermed utpekes for nedbryting. Den eksakte mekanismen for hvordan Keap1/Nrf2-komplekset sanser oksidativt stress er ikke fullt ut forstått. Human Keap1 inneholder 25 cysteinrester som er antatt å fungere som sensorer for oksidativt stress. 9 av cysteinene antas å være svært reaktive (Dinkova-Kostova et al., PNAS, 2005, 102(12):4584-9). Uten at oppfinnelsen er basert på det er det teoretisert at

alkylering av cysteiner fører til en konformasjonsendring, som fører til at det frigjøres Nrf2 fra Nrf2/Keap1/Cullin3-komplekser, før kjernetranslokasjon av det frigjorte Nrf2.

[0080] Fremgangsmåtene 1-3 som beskrives her omfatter å bringe en celle i kontakt med minst én testforbindelse og bestemme om Nrf2-reaksjonsveien oppreguleres i cellen. I slike fremgangsmåter indikerer en oppregulering av Nrf2-reaksjonsveien over en terskel (f.eks. minst 30 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 % over en kontroll) at den minst ene forbindelsen har visse biologiske egenskaper som er fordelaktige ved behandling av en neurologisk sykdom (f.eks. nevrobeskyttende egenskaper).

[0081] En forbindelses evne til å aktivere Nrf2-reaksjonsveien kan bestemmes med én eller flere in vitro- og in vivo-tester, f.eks. inkludert de følgende analysene som beskrives nedenfor.

[0082] i) *Uttrykkelseskonsentrasjoner for Nrf2-sekvensen til promotorregionen i Nrf2-genet* (-1065 til -35) har blitt publisert for eksempel i Chan et al., PNAS, 1996, 93:13943-13948. Man kan anvende en kunstig bygd uttrykingskonstruksjon som inneholder Nrf2-promotorelementet og et kunstig reportergen. Man kan alternativt anvende PCR eller Northern blotting for å bestemme konsentrasjonuttrykkelseskonsentrasjonen av Nrf2-mRNA, eller Western blotting for å bestemme Nrf2-konsentrasjonproteinkonsentrasjonen. Eksempler på fremgangsmåter for å bestemme uttrykkelseskonsentrasjoner av Nrf2 beskrives i Kwak et al., Mol. Cell. Biol. 2002, 22(9):2883-2892 og Kwak et al., Mol. Med., 2001, 7:135-145. Antistoffer mot Nrf2 kan fremstilles ved fremgangsmåter som er kjent innen faget og er kommersielt tilgjengelige for eksempel fra StressGen. Følgelig aktiveres Nrf2-reaksjonsveien i noen utførelsesformer slik at uttrykkelseskonsentrasjonene av Nrf2 økes for eksempel med minst 30 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 % eller mer enn den ikke-aktiverte tilstanden.

[0083] ii) *Subcellulær lokalisering og/eller kjernetranslokasjon av Nrf2* -- Slike analyser inkluderer cellefarging, eller analyse av cytoplasmiske ekstrakter mot kjerneecelleekstrakter. For eksempel kan det framstilles en konstruksjon av Nrf2 og grønt fusjonsprotein (GFP), som innføres i cellene og visualiseres som beskrevet i f.eks. Kraft et al., J. Neurosci, 2004, 24, 1101-1112; og Satoh et al., PNAS, 2006, 103(3):768-773. Følgelig aktiveres Nrf2-reaksjonsveien i noen utførelsesformer slik at forholdet mellom cytoplasmisk og kjerne-Nrf2 forhøyes ved for eksempel minst 30 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 % eller mer enn den ikke-aktiverte tilstanden.

[0084] iii) *Uttrykkelseskonsentrasjonene og/eller aktiviteten til ett eller flere gener under kontroll av Nrf2* -- Slike gener under kontroll av Nrf2 inkluderer endogene eller kunstig innførte reportergener i reporterkonstruksjoner som føres inn i cellene. For eksempel kan uttrykkelseskonsentrasjoner for endogent eller eksogent innført NQO1 bestemmes som beskrevet i eksemplene. Alternativt kan det fremstilles en reporterengenkonstruksjon med ett eller flere ARE-steder operabelt bundet til et reportergen (f.eks. luciferase eller GFP) som beskrevet i f.eks. Satoh et al, PNAS, 2006, 103 (3):768-

773. Uttrykkelseskonsentrasjoner for et Nrf-2- induisert genprodukt kan måles med proteinet (f.eks. ved Western blotting eller enzymatiske aktivitetsanalyser) eller på mRNA-konsentrasjonene (f.eks. ved PCR). Fremgangsmåter for å utføre RT-PCT beskrives i f.eks. Calabrese et al., J. Neurosci. Res., 2005, 79:509-521 for HO-1, i Wierinckx et al., J. Neuroimmunology, 2005, 166:132-143 for NQO1. Fremgangsmåter for å måle den enzymatiske aktiviteten til NQO1, for eksempel ved hjelp av menadion som et substrat, beskrives av Dinkova-Kostova et al., PNAS, 2001, 98:3404-09, eller av Prochaska et al., Anal. Biochem., 1988, 169:328-336. Fremgangsmåter for å måle GST-aktiviteten, for eksempel ved hjelp av 1-klor-2,4-dinitrobenzen i form av et substrat, beskrives i Ramos-Gomez et al., J. Neurosci., 2004, 24 (5):1101-1112 og Habig et al., 1974, J. Biol. Chem., 219, 7130-7139. Fremgangsmåter for å måle HO-1-aktivitet beskrives i f.eks. Calabrese et al., 2005, J. Neurosci. Res., 79:509-521. Følgelig kan Nrf2-reaksjonsveien aktiveres slik at uttrykkelseskonsentrasjonene og/eller aktiviteten av genet som er produsert, økes med for eksempel minst 30 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 % eller mer enn den ikke-aktiverede tilstanden.

[0085] iv) *Konsentrasjoner for Nrf2-bindingen til ARE* -- Slike analyser kan for eksempel utnytte elektromobilitetsskiftanalyser (EMSA) og analyse ved immunfelling av kromatin (ChIP), som beskrevet f.eks. i Satoh et al., PNAS, 2006, 103(3):768-773 og Kwak et al., Mol. Cell Biol., 2002, 22(9):2883-2892. Følgelig kan Nrf2-reaksjons-veien aktiveres slik at konsentrasjonen av Nrf2-binding til ARE økes med for eksempel minst 30 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 % eller mer enn den ikke-aktiverede tilstanden.

[0086] v) *Stabiliteten i Nrf2/Keap1-komplekser* -- Slik analyse kan inkludere analyse av immunutfelte komplekser med Nrf2 og/eller Keap1 eller andre Nrf2/Keap1-assosierte proteiner som beskrevet i f.eks. Satoh et al., PNAS, 2006, 103 (3):768-773. Anti-Keap1-antistoffer kan fremstilles under ved hjelp av fremgangsmåter kjent innen faget og er kommersielt tilgjengelige fra, for eksempel, Santa Cruz Biotechnology. Følgelig kan NRF-2-reaksjonsveien aktiveres slik at stabiliteten til Nrf2/Keap1- kompleksene økes med for eksempel minst 30 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 % eller mer enn den ikke-aktiverede tilstanden.

[0087] vi) *Modifisering (f.eks. alkyleringskonsentrasjoner) av Keap1 og andre Nrf2/Keap1-assosierte proteiner* - Slike analyser kan inkludere massespektrometrisk analyse av immunutfelt Keap1, ved hjelp av fremgangsmåter som er beskrevet i f.eks. Dinkova-Kostova et al., PNAS, 2005, 102(12):4584-9 og Gao et al., J. Biol. Chem., nettpubl. Manuscript M607622200. Nrf2-reaksjonsveien kan aktiveres slik at konsentrasjonen av Keap1 og andre Nrf2/Keap1-assosierte proteiner økes med for eksempel minst 30 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 % eller mer enn den ikke-aktiverede tilstanden.

[0088] Alkyleringskapasiteten til en forbindelse kan vurderes ved hjelp av rekombinant Keap1, ved en konkurransereaksjon med 5,5 '-ditiobis (2-nitrobenzosyre)

(DTNB) som beskrevet i f.eks. Gao et al., J. Biol. Chem., nettpubl. Manuskript M607622200.

[0089] Cellen som bringes i kontakt med minst én testforbindelse kan være et nevron eller en nevroncellelinje. Cellen som bringes i kontakt med den minst ene testforbindelsen kan velges fra en tarmkarsinomcellelinje (f.eks. DLD1), en nevroblastomcellelinje (f.eks. SkNSH eller IMR32) og en primær monocyt. Cellen kan være en celle i kultur (in vitro) eller være inne i et dyr (in vivo).

[0090] Cellens levedyktighet, og særlig nevronal levedyktighet, kan vurderes in vivo eller in vitro ved hjelp av en hvilken som helst egnet fremgangsmåte, inkludert fremgangsmåter som beskrives i eksemplene. Nevronal levedyktighet kan for eksempel vurderes ved hjelp av en MTT-analyse etter eksponering av nevronale cellekulturer for cytotoksisk konsentrasjon av glutamat som beskrevet i f.eks. Shih et al. J. Neurosci., 2005, 25 (44):10321-35. I tillegg kan cellelevedyktighet også vurderes i analyser der celledød induseres ved oksidativ skade, for eksempel ved å tilsette glukoseoksidase til astrocyttcellekulturer, som beskrevet i f.eks. Calabrese et al., J. Neurosci. Res., 2005, 79:509-521. In vivo-analyser kan utføres f.eks. som beskrevet i Misgeld, Histochem. Cell Biol., 2005, 124:189-196.

[0091] Mengden av uttrykt reporter-gen kan bestemmes ved hjelp av en hvilken som helst egnet fremgangsmåte. Uttrykkelseskonsentrasjoner, ved RNA-et eller proteinkonsentrasjonen, kan bestemmes ved hjelp av rutinemessige fremgangsmåter. Uttrykkelseskonsentrasjoner blir vanligvis skalert og/eller normalisert per total mengde RNA eller protein i prøven og/eller en kontroll, som vanligvis er et husholdningsgen som aktin eller GAPDH. RNA-konsentrasjoner bestemmes ved kvantitativ PCR (f.eks. RT-PCR), Northern blotting, eller en hvilken som helst annen fremgangsmåte for å bestemme RNA-konsentrasjonen, f.eks. som beskrevet i Cloning: A Laboratory Manual, av Sambrook et al. (utg.), 2. utg, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Lodie et al., Tissue Eng., 2002, 8(5):739-751; eller som beskrevet i eksemplene. Proteinkonsentrasjoner bestemmes ved Western blotting, ELISA, enzymatiske aktivitetsanalyser, eller en hvilken som helst annen fremgangsmåte for å bestemme proteinkonsentrasjoner som f.eks. beskrevet i Current Protocols in Molecular Biology, av Ausubel et al. (utg.), John Wiley and Sons, 1998.

[0092] Uttrykkelseskonsentrasjoner kan også bestemmes ved hjelp av reporter-gen-analyser i celle-/vevsekstrakter eller ved vevs- eller heldyravbildning. I tillegg til MR kan vevsavbildning på levende dyr utføres av fluorescensdetektering (Hoffman Lancet Oncol., 2002 3:546-556; Tung et al., Cancer Res., 2000, 60:4953-4958), bioluminescensdeteksjon (Shi et al., PNAS, 2001, 98:12754-12759; Luke et al, J. Virol., 2002, 76:12149-12161; og U.S. patent nr. 5 650 135 og 6 217 847), positronemisjonstomografi (Liang et al., Mol. Ther., 2002, 6:73-82, nær infrarød fluorescens (Tung et al., Cancer Res., 2000, 60:4953-4958) eller X-røntgenfotografering (Hemmink i et al., J. Nat. Cancer Inst., 2002, 94:741-749).

[0093] En nevrologisk sykdom som beskrevet her kan være en nevrodegenerativ

sykdom som for eksempel ALS, Parkinsons sykdom, Alzheimers sykdom og Huntingtons sykdom. I oppfinnelsen er den nevrologiske sykdommen multippel sklerose (MS). MS-formen kan velges fra: relapserende-remitterende MS (RRMS), sekundær progressiv MS (SPMS), primær progressiv MS (PPMS), og ondartet MS (Marburg-varianten).

5 **[0094]** Individet som behandles eller administreres med forbindelsen i henhold til anvendelsene beskrevet her, er et pattedyr med behov for dette, slik som et individ med behov for nevrobeskyttelse, inkludert et individ som har, eller står i fare for å utvikle en demyeliniserende og en annen spesifisert neurodegenerativ sykdom. Individet er pattedyr, og kan være en gnager eller et annet laboratoriedyr, f.eks. et ikke-humant primat. I noen
10 utførelsesformer er individet et menneske.

[0095] Neurodegenerative sykdommer er for eksempel beskrevet i Neurodegenerative Diseases: Neurobiology, Pathogenesis and Therapeutics, M. Flint Beal, Anthony E. Lang, Albert C. Ludolph, Cambridge University Press (11. juli 2005). Eksempler på nevrologiske sykdommer som er egnet for fremgangsmåtene beskrevet her inkluderer
15 neurodegenerative sykdommer som amyotrofisk lateral sklerose (ALS), Parkinsons sykdom, Alzheimers sykdom og Huntingtons sykdom. Andre eksempler inkluderer demyeliniserende nevrologisk sykdom inkludert, i tillegg til MS, følgende sykdommer: akutt hemoragisk leukoencefalomyelitt, Hursts sykdom, akutt disseminert encefalomyelitt, optikusnevritt, Devics sykdom, ryggmargslesjoner, akutt nekrotiserende myelitt, tverrstilt myelitt, kronisk
20 progressiv myelopati, progressiv multifokal leukoencefalopati (PML), strålingsmyelopati, HTLV-1-assosiert myelopati, monofasisk isolert demyelinisering, sentral pontin myelinolyse og leukodystropfi (f.eks. adrenoleukodystropfi, metakromatisk leukodystropfi, Krabbes sykdom, Canavans sykdom, Alexanders sykdom, Pelizaeus-Merbacher sykdom, forsvinnende hvitt substans sykdom, oc-ulodentodigitalt syndrom, Zellwegers syndrom),
25 kronisk inflammatorisk demyeliniserende polyneuropati (CIDP), akutt inflammatorisk demyeliniserende polyneuropati (AIDP), Lebers optiske atrofi og Charcot-Marie-Tooth-sykdom.

[0096] Andre eksempler på sykdommer som egner seg for fremgangsmåtene beskrevet her inkluderer polyneuritt og mitokondrielle forstyrrelser med demyelinisering.
30 Disse forstyrrelsene kan presenteres sammen med, og kan muligens forverres av diabetes, f.eks. insulinavhengig diabetes mellitus (IDDM, type I diabetes), eller andre sykdommer.

[0097] Det kan også analyseres en testforbindelse i en dyremodell av MS, kjent som eksperimentell autoimmun encefalomyelitt (EAE) (Tuohy et al., J. Immunol., 1988, 141:1126-1130, Sobel et al. J. Immunol., 1984, 132:2393-2401 og Traugott, Cell Immunol.,
35 1989 119:114-129). Kronisk tilbakevendende EAE gir en godt etablert eksperimentell modell for å teste midler som kan brukes til å behandle MS. Murin EAE er en indusert autoimmun demyeliniserende sykdom med mange likheter til menneskelig MS i sine kliniske manifestasjoner. I både EAE og MS, er klinisk sykdom assosiert med blod-hjerne-barriere (BBB)-dysfunksjon, infiltrasjon av sentralnervesystemet av mononukleære celler (i det

vesentlige makrofager og T-lymfocytter og serumprodukter), og demyelinisering (Baker et al. J. Neuroimmunol., 1990, 28: 261; Butter et al., J. Neurol. Sci., 1991, 104:9; Harris et al., Ann. Neurol., 1991, 29:548; Kermonde et al., Brain, 1990, 113:1477).

[0098] Kliniske tegn på MS og demyeliniserende patologi i EAE oppstår ved immunisering med myelinproteiner eller -peptider fra sentralnervesystemet (f.eks. MBP, PLP og MOG) under Th1-betingelser (direkte immuniseringsmodell), eller ved adoptiv overføring av antigenspesifikke Th1-celler fra sentralnervesystemet (adoptiv overføringsmodell) (Ben-Nun et al., Eur. J. Immunol., 1981, 11:195-199; Ando et al., Cell Immunol., 1989, 124:132-143; Zamvil et al., Nature, 1985, 317:355-358; Zamvil et al., Ann. Rev. Immunol, 1990, 8:579-621). I SJL EAE-musemodellen fører immunisering med peptidet PLP 139-151 fra sentralnervesystemet eller adoptiv overføring av PLP-spesifikke Th1-celler for eksempel til et sykdomsforløp som består av en akutt fase med tap av haletonus på dag 10 til dag 12, etterfulgt av lammelse i baklemmene og mononukleær celleinfiltrasjon fra sentralnervesystemet (Tuohy et al., J. Immunol., 1988, 141:1126-1130, Sobel et al., J. Immunol., 1984, 132:2393-2401 og Traugott, Cell Immunol., 1989, 119:114-129). Oppløsning av kliniske tegn og restaurering inntreffer på dag 20 til dag 25, og dyrene kan gjennomgå flere anfall som er mindre alvorlige enn i den innledende fasen. EAE har blitt anvendt til å evaluere nye terapeutiske tilnærminger til T-celle-medierte autoimmune sykdommer på grunn av de kliniske og histopatologiske likhetene med menneskelig demyeliniserende MS.

[0099] En forbindelses evne til å bremse eller forebygge nevrodegenerering (inkludert demyelinisering og nevronal død) kan vurderes i EAE-modellen eller en annen dyremodell, inkludert for eksempel Thielers murine encefalomyelittvirus (TMEV)-induserte demyeliniserende sykdom, murint hepatittvirus (MHV), Semliki Forest-virus Sindbis-virus som beskrevet i f.eks. Ercoli et al., J. Immunol., 2006, 175:3293-3298.

[0100] En forbindelse som eventuelt kan testes i minst én annen dyremodell (se generelt, Immunologic Defects in Laboratory Animals, utg. Gershwin et al., Plenum Press, 1981), for eksempel som de følgende: SWR X NZB (SNF1)- musemodellen (Uner et al., J. Autoimmune Disease, 1998, 11 (3):233-240), den KRN-transgene (K/BxN) musemodellen (Ji et al., Immunol. Rev., 1999, 69:139); NZB X NZW (B/W) mus, en modell for SLE (Riemekasten et al., Arthritis Rheum., 2001, 44(10):2435-2445); NOD-musemodellen for diabetes (Baxter et al., Autoimmunity, 1991, 9(1): 61-67), osv.); eller musemodeller for multippel sklerose (se f.eks. Linker et al., Eur. J. Immunol., 2002, 8(6):620-624 og Eugster et al., Nat. Med., 1999, 29:626-632; og Gold et al., Brain, 2006, 129:1953-1971).

[0101] Preliminære doser, for eksempel som bestemt i dyretester, og skaleringen av doseringer for human administrering, utføres i henhold til akseptert fagpraksis. Toksisitet og terapeutisk effektivitet kan bestemmes ved standard farmasøytiske prosedyrer i cellekulturer eller forsøksdyr, f.eks. for å bestemme LD₅₀ (dosen er letal for 50 % av

populasjonen) og ED_{50} (dosen er terapeutisk effektiv i 50 % av populasjonen).

Doseforholdet mellom toksiske og terapeutiske effekter er den terapeutiske indeksen og den kan uttrykkes som forholdet LD_{50}/ED_{50} . I noen utførelsesformer anvendes sammensetninger som har høy terapeutisk indeks.

- 5 **[0102]** Den terapeutisk effektive dosen kan beregnes innledningsvis ved cellekulturanalyser. En dose kan formuleres i dyremodeller for å oppnå et sirkulerende plasmakonsentrasjonsområde som inkluderer IC_{50} (dvs. konsentrasjonen av den terapeutiske forbindelsen som gir en halvt maksimal symptomhemming) som bestemt i
- 10 eksempel ELISA eller HPLC. Effekten av en hvilken som helst bestemt dosering kan overvåkes med en egnet bioanalyse. Eksempler på doseringer er: omtrent $0,1 \times IC_{50}$, omtrent $0,5 \times IC_{50}$, omtrent $1 \times IC_{50}$, omtrent $5 \times IC_{50}$, $10 \times IC_{50}$, omtrent $50 \times IC_{50}$ og omtrent $100 \times IC_{50}$.

- 15 **[0103]** Dataene fra in vitro-analysene eller dyrestudiene kan anvendes til å formulere et område av doseringer for bruk på mennesker. Terapeutisk effektive doser som ble oppnådd i en dyremodell kan omdannes til anvendelse i et annet dyr, inkludert mennesker, ved hjelp av omregningsfaktorer kjent i faget (se f.eks. Freireich et al, Cancer Chemother Reports, 1966, 50 (4):219 -244 og tabell 2 for tilsvarende/ekvivalente overflatearealdoseringsfaktorer).

20

Tabell 2

Til: Fra:	Mus (20 g)	Rotte (150 g)	Ape (3,5 kg)	Hund (8 kg)	Menneske (60 kg)
Mus	1	1/2	1/4	1/6	1/12
Rotte	2	1	1/2	1/4	1/7
Ape	4	2	1	3/5	1/3
Hund	6	4	3/5	1	1/2
Menneske	12	7	3	2	1

- 25 **[0104]** Doseringen av slike forbindelser kan ligge innenfor et område av sirkulerende konsentrasjoner som inkluderer ED_{50} med liten eller ingen toksisitet. Dosen kan variere innen dette området avhengig av doseringsformen som anvendes og administrasjonsveien som anvendes. En terapeutisk effektiv mengde kan generelt variere både med individets alder, tilstand, kjønn og alvorlighetsgraden av den medisinske tilstanden til individet. Eksempler på farmasøytisk akseptable doser for forbindelsene
- 30 beskrevet her er fra $1 \mu\text{g/kg}$ til 25 mg/kg , avhengig av forbindelsene, alvorlighetsgraden av symptomene og progresjonen av sykdommen. De passende terapeutisk effektive dosene

kan velges av en behandlende kliniker og varierer fra omtrent 1 µg/kg til 20 mg/kg, fra 1 µg/kg til 10 mg/kg, fra 1 µg/kg til 1 mg/kg, fra 10 µg/kg til 1 mg/kg, fra 10 µg/kg til 100 µg/kg, fra 100 µg til 1 mg/kg. I tillegg indikeres visse spesifikke doseringer i eksemplene.

[0105] For DMF eller MMF, kan en effektiv mengde variere fra 1 mg/kg til 50 mg/kg (f.eks. fra 2,5 mg/kg til 20 mg/kg eller fra 2,5 mg/kg til 15 mg/kg). Effektive doser vil også variere, som kjent for fagfolk på området, avhengig av administrasjonsveien, eksipientbruk og muligheten for samtidig behandling med andre terapeutiske behandlinger inkludert bruk av andre terapeutiske midler. Særlig er en effektiv dose av DMF eller MMF som skal administreres til et individ oralt 480 mg per dag. Som beskrevet her kan det administreres 720 mg per dag i separate administreringer av 2, 3, 4 eller 6 like doser.

[0106] Doseringen kan bestemmes av en lege og om nødvendig justeres for å tilpasses observerte effekter av behandlingen. Sammensetningene kan gis som en bolusdose, for å maksimere de sirkulerende konsentrasjonene for den lengste tidsperioden etter dosen. Etter bolusdosen kan det også brukes kontinuerlig infusjon.

[0107] Sammensetninger anvendt i fremgangsmåtene beskrevet her omfatter ytterligere en farmasøytisk akseptabel eksipient. Som anvendt her henviser uttrykket "farmasøytisk akseptabel eksipient" til hvilke som helst og alle løsningsmidler, dispergeringsmedier, belegg, antibakterielle og antifungale midler, isotone og absorpsjonsforsinkende midler som er kompatible med farmasøytisk administrering. Bruken av slike medier og midler for farmasøytisk aktive substanser er godt kjent innen faget. Sammensetningene kan også inneholde andre aktive forbindelser som gir supplerende, ytterligere eller forbedrede terapeutiske funksjoner. De farmasøytiske sammensetningene kan også inkluderes i en beholder, pakke eller dispenser sammen med administreringsinstruksjoner.

[0108] En farmasøytisk sammensetning formuleres for å være kompatibelt med den tilsiktede administreringsmåten. Fremgangsmåter for å oppnå administreringen er kjent i faget. "Administrering" begrenses ikke til noe spesielt leveringssystem og kan inkludere, uten begrensning, parenteral (inkludert subkutan, intravenøs, intramedullær, intraartikulær, intramuskulær eller intraperitoneal injeksjon), rektal, topisk, transdermal eller oral (for eksempel i kapsler (f.eks. som, pulver, korn, mikrotablett, mikropelleter, osv.), suspensjoner eller tabletter). Eksempler på noen av formuleringene som inneholder DMF og/eller MMF gis i f.eks. US-patentene 6 509 376 og 6 436 992.

[0109] Administrasjon til et individ kan gjøres med en enkelt dose eller gjentatte administreringer, og i en hvilken som helst av en rekke fysiologisk akseptable saltformer og/eller som har en akseptabel farmasøytisk bærer og/eller additiv som del av en farmasøytisk sammensetning. Fysiologisk akseptable saltformer og standard farmasøytiske formuleringsteknikker og hjelpestoffer er godt kjent for fagfolk på området.

[0110] De følgende eksemplene har illustrerende formål og begrenser ikke

oppfinnelsene det søkes patent for.

EKSEMPLER

Eksempel 1

[0111] Humane tykktarmskreftceller DLD1 ble behandlet med DMF eller MMF ved indikerte konsentrasjoner (5, 15 eller 50 μ M) i 16 timer, rensset med PBS og høstet inn til en reduserende SDS-prøvebuffer. Lysatene ble underkastet SDS-PAGE og de separerte proteinene ble elektroforetisk overført til nitrocellulosemembraner for western blott-analyse. For å oppdage Nrf2 og NQO1 ble membranene inkubert med de respektive primære antistoffene over natten ved 4 °C, vasket og inkubert med peroksidase-konjugerte sekundære antistoffer, etterfulgt av det kjemiluminescerende peroksidase-substrat. Detektering av proteinbåndluminescens og fotografering ble gjort ved hjelp av CCD-utstyrt bildediagnosestasjon Kodak2000R. Resultatene i figur 1 viser at DMF og MMF er effektfulle aktivatorer av Nrf2 ved konsentrasjoner innenfor den kliniske eksponeringsrekkevidden.

Eksempel 2

[0112] Det ble dyrket DLD1-celler i MEM-supplert med 10 % kalvefosterserum. Cellene ble transfektert med indikert siRNA ved hjelp av Lipofectamine-reagensen (Invitrogen) i henhold til produsentens instruksjoner og 30 timer senere stimulert med 30 μ M DMF i 40 timer. Cellene ble høstet og bearbeidet for Western blott-analyse av Nrf2- og NQO1-konsentrasjoner som beskrevet i eksempel 1. Kilder, samt identiteten av reagenser som ble brukt i eksemplene 1 og 2 er angitt i tabell 3 nedenfor.

	Mål	Reagens	Kilde/Sekvens	Leverandør
Primært antistoff	Nrf2	Nrf2 (T-19)	geitepolyklont antistoff	Santa Cruz Biotechnology
	Keap1	Keap1 (E-20)	geitepolyklont antistoff	Santa Cruz Biotechnology
	NQO1	NQO1 (A180)	musemonoklont antibody	Santa Cruz Biotechnology
	GAPDH	Anti-GAPDH	musemonoklont antistoff	Ambion
Sekundært antistoff	antimuse	HRP-muse IgG	sau	Amersham Biosciences
	anti-kanin	HRP-kanin IgG	esel	Amersham Biosciences

	Mål	Reagens	Kilde/Sekvens	Leverandør
	anti-geit	HRP-geit IgG	Bovine	Santa Cruz Biotechnology
siRNA	Nrf2	Nrf2-2	UCAUUGAACUGC UCUUUGGUU (antisense) (SEQ ID NR:17)	Dharmacon
	Keap1	Keap1-1	GAAUUAAGGCGG UUUGUCCUU (antisense) (SEQ ID NR:18)	Dharmacon

[0113] Resultatene vises i figur 2 (for enkel fremstilling, blir bildet av Western blott snudd opp ned). Resultatene viser at DMF-indusert oppregulering av NQO1 krever Nrf2 og kan etterlignes ved aktivering av Nrf2 gjennom fortregning av Keap1. Derfor fungerer

5 DMF som en Nrf2-agonist som forårsaker cellulær opphopning av Nrf2 og Nrf2-målgenuttrykking.

Eksempel 3

10 **[0114]** For å fremkalle EAE fikk mus subkutane injeksjoner i flankene og haleroten med 50 µg MOG 35-55-peptid i PBS emulgert i samme volum fullstendig Freund's adjuvant (eng.: complete Freund's adjuvant, (CFA)) som inneholdt Mycobacterium tuberculosis H37RA (Difco, Detroit MI, USA) ved en sluttkonsentrasjon på 0.5 mg/ml. To injeksjoner av kikhosetoksin (List Biological Laboratories Inc., California, USA; 200 ng per mus i.p.) ble

15 gitt på dag 0 og 2.

[0115] DMF og MMF ble fortynnet i 200 µl 0,08 % Methocel/H₂O som bærer og administrert ved tvangsfôring fra dag 3 etter immunisering (e.i.) inntil slutten. Hver behandlingsgruppe bestod av 8 dyr: bindemiddel alene som en negativ kontroll, 5 mg/kg kroppsvekten av DMF to ganger daglig, 15 mg/kg kroppsvekt DMF to ganger

20 daglig, 15 mg/kg kroppsvekt MMF to ganger daglig. Forbindelsene ble anskaffet fra Fumapharm AG. Oral sonde ble anvendt for å sikre nøyaktig dosering og for å unngå forringelse av forbindelsen.

[0116] Ryggmargsvev ble fiksert i 4 % paraformaldehyd og innebygd i parafin. Lysbildene ble avparaffinisert og utvannet i graderte alkoholløsninger. Antigengjenfinning

25 ble utført ved å dyppe lysbildene/objektglassene i 10 mm citrat, pH 6,0 i 20 minutter i en trykkoker ved 120 °C (Pascal, Dako Cytomation).

[0117] Immunohistokjemi ble utført ved hjelp av Dako autostainer som følger. Endogen peroksidase ble inaktivert ved en 10 minutters inkubering i 3 % H₂O₂/metanol.

Nrf2-antistoffet C-20 fra kanin (sc-722, Santa Cruz Biotechnology) ble tilsatt i en 1:250 fortynning i Dako Diluent med bakgrunnreduserende komponenter (eng.: Background Reducing Components) (Dako # S3022), C-20-antistoff ble detektert ved hjelp av den merkede antileporale Envision-polymeren HRP (Dako #K4003) og DAB (Vector Labs #SK-4100) ble anvendt som det kromogene substratet. Det ble utført morfometrisk analyse av Nrf2-immunofarging ved hjelp av ImageJ- programvare fra NIH.

[0118] Resultatene, som vises i figurene 3 og 4, viser MMF- og DMF-aktivering av Nrf2 in vivo.

P a t e n t k r a v

1. Farmasøytisk sammensetning for bruk i behandling av multippel sklerose, der sammensetningen består av:

(a) dimetylfumarat eller monometylfumarat, og

(b) én eller flere farmasøytisk akseptable hjelpestoffer,

der sammensetningen administreres oralt til et individ med behov for behandling av multippel sklerose, og der dosen av dimetylfumarat eller monometylfumarat som skal administreres er 480 mg per dag.

2. Den farmasøytiske sammensetningen for bruk som i krav 1, der sammensetningen består av dimetylfumarat og ett eller flere farmasøytisk akseptable hjelpestoffer.

3. Den farmasøytiske sammensetningen for bruk som i krav 1, der sammensetningen består av monometylfumarat, og ett eller flere farmasøytisk akseptable hjelpestoffer.

4. Den farmasøytiske sammensetningen for bruk som i et hvilket som helst av kravene 1 til 3, der sammensetningen skal administreres i form av en tablett, en suspensjon, eller en kapsel.

5. Den farmasøytiske sammensetningen for anvendelse som i et hvilket som helst av kravene 1 til 4, der sammensetningen skal administreres til individet i 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 eller 200 uker eller mer.

6. Den farmasøytiske sammensetningen for bruk som i et hvilket som helst av kravene 1 til 5, der sammensetningen skal administreres til individet i minst 12 uker.

7. Dimetylfumarat eller monometylfumarat til bruk ved behandling av multippel sklerose, der dimetylfumaratet eller monometylfumaratet er den eneste nevrobeskyttende forbindelsen som skal administreres, og der dimetylfumarat eller monometylfumarat skal administreres oralt til et individ med behov for behandling for multippel sklerose i en dose på 480 mg per dag.

8. Dimetylfumarat til bruk som i krav 7, der dimetylfumaratet er den eneste nevrobeskyttende forbindelsen som skal administreres.

9. Monometylfumarat for bruk som i krav 7, der monometylfumaratet er den eneste nevrobeskyttende forbindelsen som administreres.

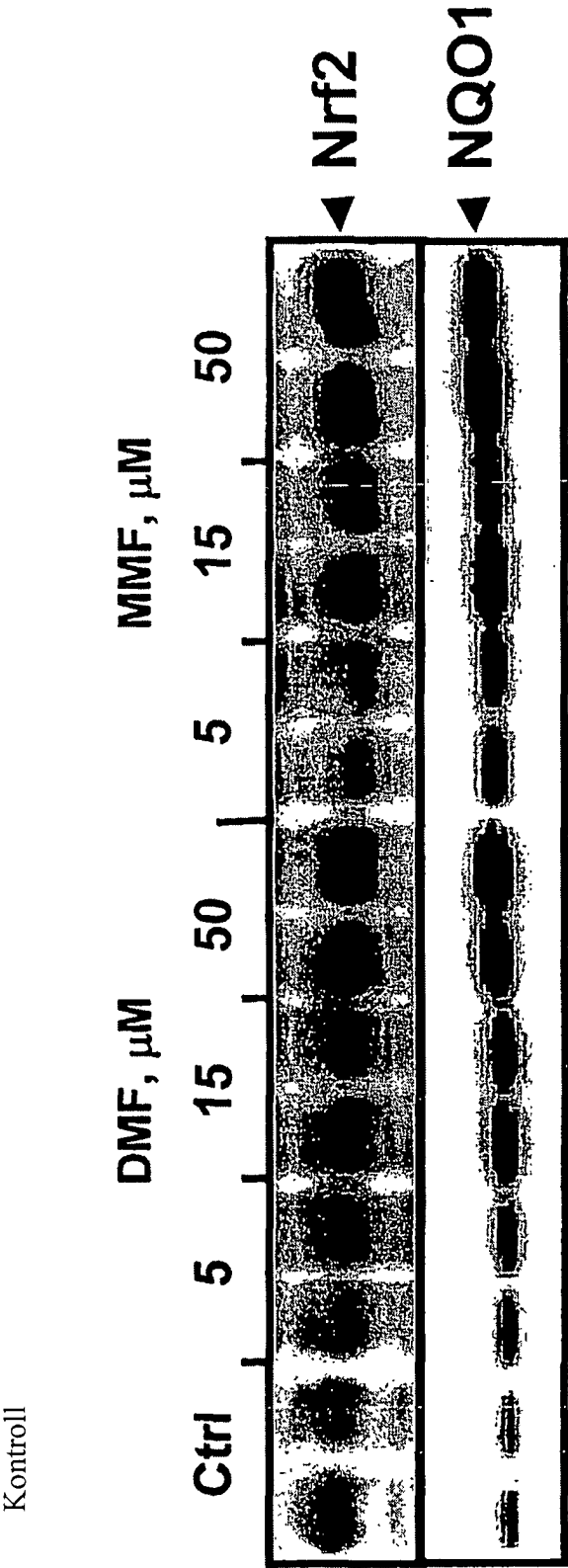
10. Dimetylfumaratet eller monometylfumaratet for bruk som i et hvilket som helst av kravene 7 til 9, der dimetylfumaratet eller monometylfumaratet administreres i form av en tablett, en suspensjon eller en kapsel.

5

11. Dimetylfumaratet eller monometylfumaratet for bruk som i et hvilket som helst av kravene 7-10, der dimetylfumaratet eller monometylfumarat skal administreres til individet i 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 eller 200 uker eller uker mer.

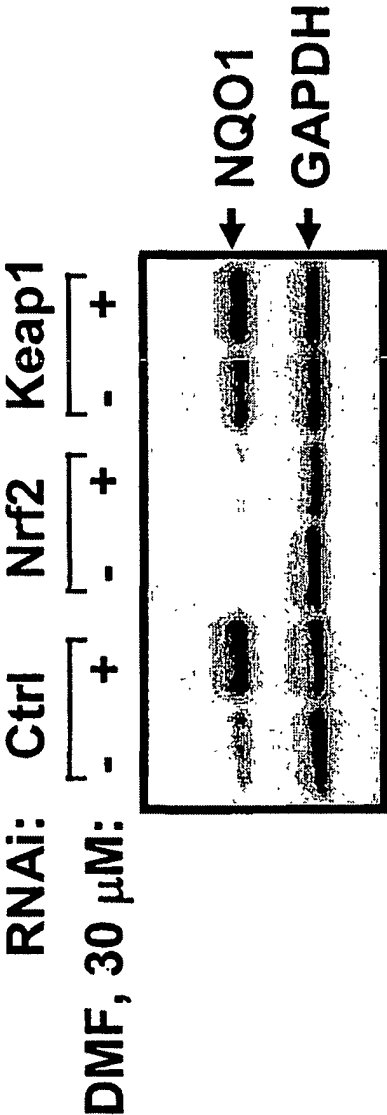
10

12. Dimetylfumarat eller monometylfumarat for bruk som i et hvilket som helst av kravene 7-11, der dimetylfumaratet eller monometylfumaratet skal administreres til individet i minst 12 uker.

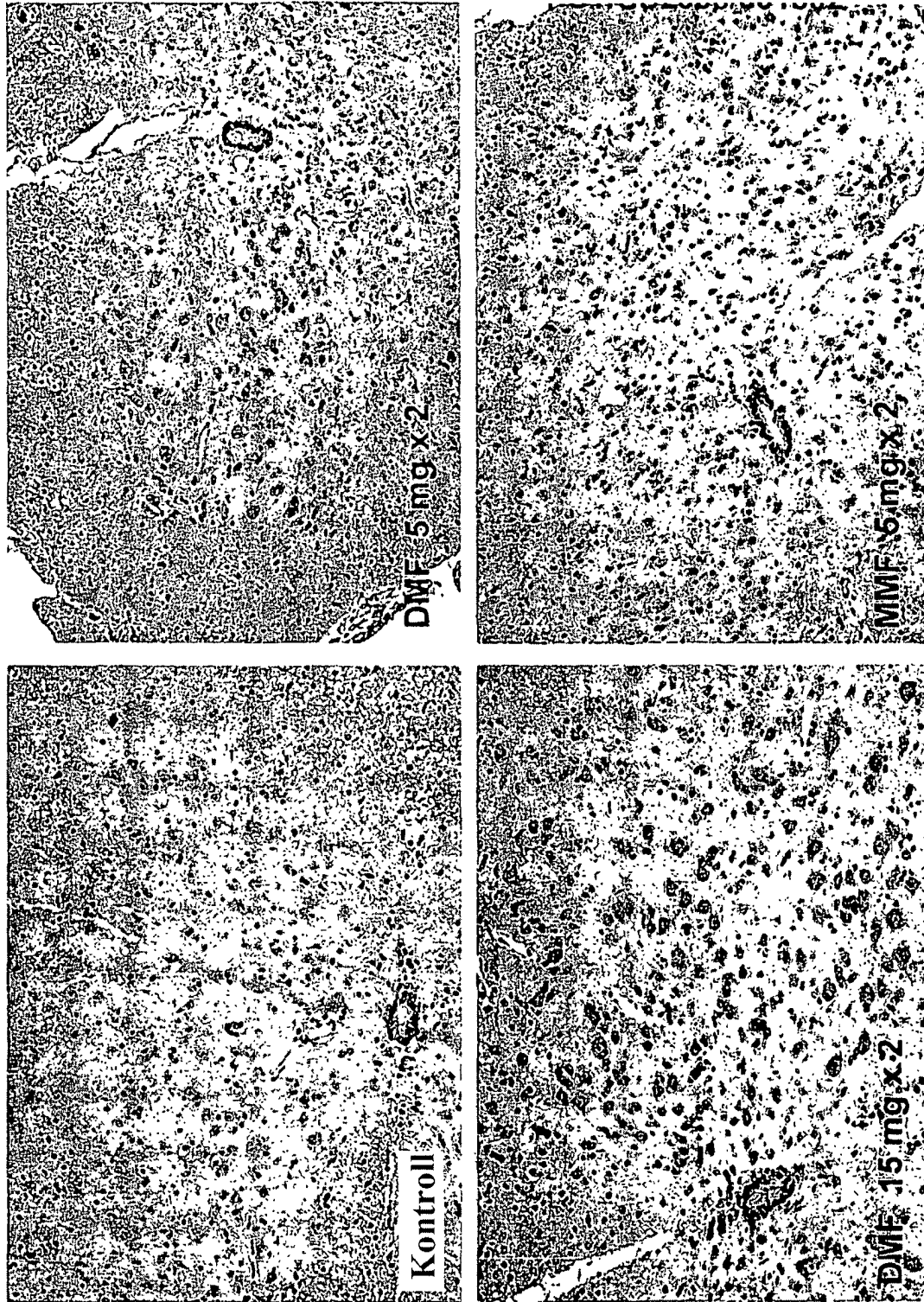


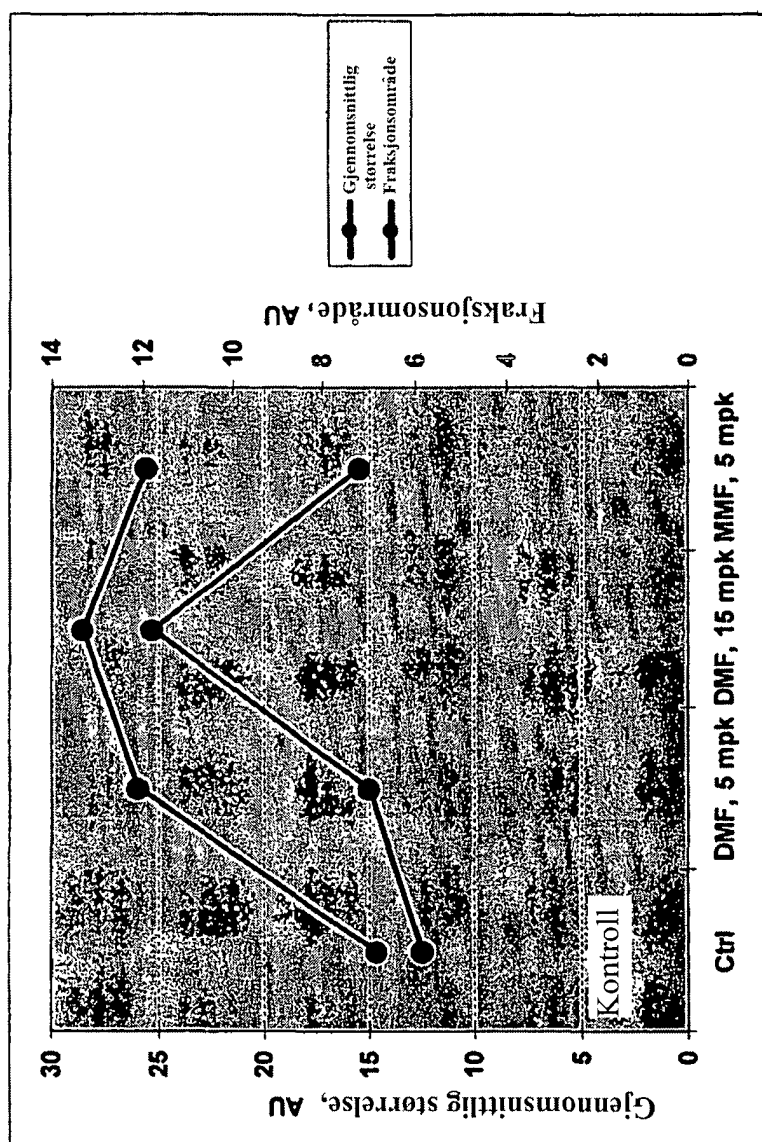
Figur 1

Kontroll



Figur 2

**Figur 3**

**Figur 4**