



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2542079 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/4704 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.10.20
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.05.21
(86)	Europeisk søknadsnr	11751300.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2011.03.02
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2013.01.09
(30)	Prioritet	2010.03.03, US, 339375 P
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	BA ME
(73)	Innehaver	Teva Pharmaceutical Industries Ltd., 5 Basel Street P.O. Box 3190, 49131 Petach-Tikva, IL-Israel
(72)	Oppfinner	BLAUGRUND, Eran, 94 Remez Street, 76449 Rehovot, IL-Israel TARCIC, Nora, Migdal David 29/1, Modiin, IL-Israel KAYE, Joel, 14/5 Hazamir St, Netanya, IL-Israel

(54)	Benevnelse	BEHANDLING AV REVMATOID ARTRITT MED EN KOMBINASJON AV LAKINIMOD OG METOTREKSAT
(56)	Anførte publikasjoner	US-A- 6 077 851 US-A1- 2005 074 451 US-A1- 2008 063 607 US-A1- 2008 166 348 US-A1- 2009 221 575 K VISSER ET AL: "Optimal dosage and route of administration of methotrexate in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature", ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, vol. 68, no. 7, 25 November 2008 (2008-11-25), pages 1094-1099, XP055065237, ISSN: 0003-4967, DOI: 10.1136/ard.2008.092668 PREININGEROVA: 'Oral laquinimod therapy in relapsing multiple sclerosis' EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS vol. 18, no. 7, 01 July 2009, pages 985 - 989, XP008157941

BEHANDLING AV REVMATOID ARTRITT MED EN KOMBINASJON AV LAKINIMOD OG METOTREKSAT

Bakgrunn

5

Revmatoid artritt

Revmatoid artritt (RA) er et kronisk syndrom karakterisert ved ikke-spesifikk, vanligvis symmetrisk inflammasjon av de perifere ledd, hvilket potensielt resulterer i progressiv destruksjon av artikulære og periartikulære strukturer, med eller uten generaliserte manifestasjoner. Selv om dens presise etiologi ennå ikke er bestemt, er genetisk predisposisjon bestemt. I tillegg antas miljømessige faktorer å spille en rolle. (The Merck Manual, 7. utg.)

Ifølge American College of Rheumatology (1987) må minst fire av følgende kriterier oppfylles før en tilstand klassifiseres som revmatoid artritt (Arnett, 1988): 1) morgenstivhet på > 1 time de fleste morgener i minst 6 uker; 2) artritt- og bløtvevshevelse i > 3 av 14 ledd/leddgrupper, til stede i minst 6 uker; 3) artritt i håndledd, til stede i minst 6 uker; 4) symmetrisk artritt, til stede i minst 6 uker; 5) subkutane noder på spesifikke steder; 6) revmatoid faktor på et nivå over 95-prosentilen; og 7) radiologiske endringer som antyder ledderosjon.

Det er ingen kjent kur for revmatoid artritt, men mange forskjellige behandlingstyper er tilgjengelige for å lindre symptomer og/eller modifisere sykdomsprosessen. Farmakologisk behandling av RA inkluderer ikke-steroider, antiflogistika og salicylater (NSAID-er), langsomtvirkende legemiddel, gullforbindelser, hydroksyklorokin, sulfasalazin, kombinasjoner av langsomtvirkende legemiddel, kortikosteroider og cytotoxiske eller immunsuppressiva. Andre former for behandling inkluderer hvile, ernæring, mosjon, fysioterapi og kirurgi. (The Merck Manual, 7. utg.)

Lakinimod

Lakinimod er en hittil ukjent syntetisk forbindelse med høy oral biotilgjengelighet, hvilken er foreslått som oral formulering for behandling av multippel sklerose (MS) (Polman, 2005; Sandberg-Wollheim, 2005). Lakinimod og dets natriumsaltform beskrives for eksempel i US-patentnr. 6,077,851. Dette dokumentet vedrører behandling av sykdommer som skyldes autoimmunitet og patologisk inflammasjon, inkludert revmatoid artritt. Effektene av lakinimod i kombinasjon med metotreksat på revmatoid artritt er ikke rapportert.

Metotreksat

Metotreksat (MTX) er et antimetabolsk legemiddel som anvendes i behandlingen av cancer og autoimmune sykdommer. Det virker ved å inhibere metabolismen av folsyre via inhibering av dihydrofolatreduktase og blokkerer DNA-syntese i hurtig prolifererende celler. Disse virkningene induserer immunsuppresjon.

MTX selges under merkenavnene Rheumatrex[®] og Trexall[™]. Rheumatrex[®] og Trexall[™] er indisert til å behandle visse typer av cancer, psoriasis og revmatoid artritt.

Visser, K. et al. (Ann. Rheum. Dis. 2009; 68:1094–1099) beskriver anvendelsen av metotreksat i behandlingen av revmatoid artritt.

Cytotoksika/immunsuppressiva inkludert MTX anvendes stadig oftere for alvorlig, aktiv RA. Disse legemidlene kan undertrykke inflammasjon og kan muliggjøre reduksjon av kortikosteroide doser. (The Merck Manual, 7. utg.)

Anbefalt dosering for alvorlig revmatoid artritt hos mennesker (konsensusbasert) er: innledningsvis 10 til 15 mg oralt én gang per uke, økt med 5 mg/uke hver 2. til 3. uke, opp til høyst 20 til 30 mg/uke. Produsentens anbefalte dosering for alvorlig revmatoid artritt hos mennesker er: innledningsvis 7,5 mg oralt én gang per uke eller 2,5 mg oralt hver 12. time i 3 doser én gang per uke, opp til høyst 20 mg/uke. (Physicians' Desk Reference)

Kombinasjonsterapi

Administreringen av to legemiddel for å behandle en gitt tilstand, slik som revmatoid artritt, medfører et antall potensielle problemer. *In vivo*-interaksjoner mellom to legemiddel er komplekse. Effektene av hvilket som helst enkelt legemiddel er knyttet til dets absorpsjon, distribusjon og eliminering. Når to legemiddel introduseres i kroppen, kan hvert legemiddel påvirke absorpsjonen, distribusjonen og elimineringen av den andre, og således endre effektene av det andre. Ett legemiddel kan for eksempel inhibere, aktivere eller indusere produksjonen av enzymer involvert i en metabolsk elimineringsvei for det andre legemiddelet (Guidance for Industry, 1999). Når to legemiddel administreres for å behandle samme tilstand, er det således ikke mulig å beregne hvorvidt hvert vil komplementere, ha ingen effekt på eller forstyrre den terapeutiske aktiviteten av den andre hos et menneske.

Ikke bare kan interaksjonen mellom to legemiddel påvirke den tiltenkte terapeutiske aktiviteten av hvert legemiddel, men interaksjonen kan øke nivåene av toksiske metabolitter (Guidance for Industry, 1999). Interaksjonen kan også øke eller redusere bivirkningene av hvert legemiddel. Ved administrering av to legemiddel for å behandle en sykdom er det således ikke mulig å beregne hvilken endring som vil forekomme i den negative sideprofilen for hvert legemiddel.

Det er i tillegg vanskelig nøyaktig å predikere når effektene av interaksjonen mellom de to legemidlene vil melde seg. Metabolske interaksjoner mellom legemiddel kan for eksempel bli åpenbare ved den initielle administreringen av det andre legemiddelet, etter at de to har nådd en jevn konsentrasjonstilstand eller ved seponering av ett av legemidlene (Guidance for Industry, 1999).

Kort beskrivelse av oppfinnelsen

Denne oppfinnelsen tilveiebringer lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse i kombinasjon med metotreksat i behandlingen av et individ med revmatoid artritt.

Denne oppfinnelsen tilveiebringer også en farmasøytisk sammensetning omfattende en mengde av lakinimod eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav

og en mengde av metotreksat for anvendelse i behandlingen av et individ med revmatoid artritt.

Kort beskrivelse av tegningene

5

Figur 1:

Figur 1 er et diagram over individuelle histopatologiske parametere (seks ledd): et stolpediagram som viser den gjennomsnittlige poengsummen (for de seks leddene) for hver histopatologisk parameter i kontroll- og behandlingsgruppene. ("LAQ" indikerer lakinimod, "MTX" indikerer metotreksat) (* $p \leq 0,05$ students t-test til vehikkel, # $p \leq 0,05$ students t-test til vehikkel, $n = 10$ /behandlingsgruppe, $n = 4$ /normalkontroll.) Y-aksen viser gjennomsnitt $\pm$ SE for individuelle histopatologiske parametere (seks ledd) (poengsum: 0 - normal, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderat, 4 = markert og 5 = alvorlig)

10

15

Stolpen ytterst til venstre i hver behandlingsgruppe (svart) representerer inflammasjon. Den andre stolpen fra venstre i hver behandlingsgruppe (lysegrå) representerer pannus. Den tredje stolpen fra venstre i hver behandlingsgruppe (hvit) representerer bruskskade, og den fjerde stolpen fra venstre i hver behandlingsgruppe (mørkegrå) representerer benskade.

20

Figur 2:

Figur 2 er et diagram over poengsum for seks ledd fra dyr: et stolpediagram som viser den samlede poengsummen (sum av poeng i individuelle histopatologiske parametere) for de seks leddene) i kontroll- og behandlingsgruppene. ("LAQ" indikerer lakinimod, "MTX" indikerer metotreksat) (* $p \leq 0,05$ students t-test til vehikkel, # $p \leq 0,05$ students t-test til vehikkel, $n=10$ /behandlingsgruppe, $n=4$ /normalkontroll.) Y-aksen viser gjennomsnitt $\pm$ SE for poengsum for seks ledd fra dyr (sum av individuelle parametere).

25

Figur 3:

Figur 3 viser progresjonen i poengsummen for klinisk artritt i hver behandlingsarm (poengsummene 0–5). (* $p \leq 0,05$ students t-test til vehikkel, # $p \leq 0,05$ students t-test til MTX, $n = 10$ /behandlingsgruppe, $n = 4$ /normalkontroll.) Y-aksen viser gjennomsnittlig poengsum $\pm$ SE for klinisk artritt (resultat 0–5).

30

35

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Denne oppfinnelsen tilveiebringer lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse i kombinasjon med metotreksat i behandlingen av et individ med revmatoid artritt. Denne oppfinnelsen tilveiebringer også en farmasøytisk sammensetning omfattende en mengde av lakinimod eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav og en mengde av metotreksat for anvendelse i behandlingen av et individ med revmatoid artritt.

I én utførelsesform er mengden av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav og mengden av metotreksat samlet sett mer virkningsfullt for å behandle individet enn når hvert middel administreres alene.

I én utførelsesform er mengden av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav og mengden av metotreksat samlet sett virkningsfullt for å redusere et klinisk symptom på revmatoid artritt hos individet. I en annen utførelsesform er det farmasøytisk akseptable saltet av lakinimod lakinimodnatrium.

I én utførelsesform utføres den periodiske administreringen av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav oralt. I en annen utførelsesform er den administrerte mengden av lakinimod 0,0005–10 mg/kg/dag. I enda en annen utførelsesform er den administrerte mengden av lakinimod 0,1–2,0 mg/dag.

I én utførelsesform utføres den periodiske administreringen av metotreksat oralt. I en annen utførelsesform er den administrerte mengden av metotreksat 0,02–1,0 mg/kg/dag. I enda en annen utførelsesform er den administrerte mengden av metotreksat 1–3 mg/dag.

I én utførelsesform omfatter behandlingen ytterligere administrering av ikke-steroidale antiflogistika (NSAID-er), salicylater, langsomtvirkende legemiddel, gullforbindelser, hydroksyklorokin, sulfasalazin, kombinasjoner av langsomtvirkende legemiddel, kortikosteroider, cytotoxika, immunsuppressiva og/eller antistoffer.

I én utførelsesform eliminerer den periodiske administreringen av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav og metotreksat i det vesentlige et symptom assosiert med revmatoid artritt. I en annen utførelsesform reduserer den periodiske administreringen av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav og metotreksat alvorlighetsgraden av et symptom assosiert med

revmatoid artritt. I enda en annen utførelsesform reduserer den periodiske administreringen av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav og metotreksat antallet av ledd som berøres av et symptom assosiert med revmatoid artritt.

5

I én utførelsesform er symptomet inflammasjon. I en annen utførelsesform er symptomet dannelse av pannusvev. I en annen utførelsesform er symptomet bruskskade. I en annen utførelsesform er symptomet benresorpsjon.

10

I én utførelsesform reduserer den periodiske administreringen av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav og metotreksat proteinuri hos individet. I en annen utførelsesform måles proteinurireduksjonen ved urinprotein etter 24 timer, protein/kreatinin-forhold etter 24 timer, spotprotein/kreatinin-forhold, urinalbumin etter 24 timer, albumin/kreatinin-forhold etter 24 timer, spotalbumin/kreatinin-forhold eller ved en urinprøvestrimmel. I enda en annen utførelsesform eliminerer den periodiske administreringen av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav og metotreksat urinsedimenter.

15

20

I én utførelsesform er hver av mengden av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav når den tas alene, og mengden av metotreksat når den tas alene, virkningsfullt for å behandle individet. I en annen utførelsesform er enten mengden av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav når den tas alene, mengden av metotreksat når den tas alene, eller hver slik mengde når den tas alene, ikke virkningsfull for å behandle individet.

25

I én utførelsesform mottar individet metotrexatterapi før initiering av lakinimodterapi. I en annen utførelsesform initierer individet periodisk metotreksatadministrering før initiering av periodisk lakinimodadministrering.

30

I én utførelsesform kommer administreringen av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav i det vesentlige før administreringen av metotreksat. I en annen utførelsesform kommer administreringen av metotreksat i det vesentlige før administreringen av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav.

35

I én utførelsesform er individet et pattedyr. I en annen utførelsesform er pattedyret et menneske.

For de foregående utførelsesformene er hver utførelsesform beskrevet heri betraktet som anvendbar på hver av de andre beskrevne utførelsesformene.

5 Det skal forstås at der et parameterområde tilveiebringes, tilveiebringer oppfinnelsen også alle heltall innenfor det området, og tideler derav. For eksempel inkluderer "0,2–5 mg/kg/dag" 0,2 mg/kg/dag, 0,3 mg/kg/dag, 0,4 mg/kg/dag, 0,5 mg/kg/dag, 0,6 mg/kg/dag osv. opp til 5,0 mg/kg/dag.

10 Det beskrives en fremgangsmåte for å behandle et individ med revmatoid artritt ved anvendelse av lakinimod med metotreksat, hvilket tilveiebringer en mer virkningsfull behandling enn hvert middel alene. Ifølge den foreliggende oppfinnelsen er administrering av lakinimod med metotreksat særlig virkningsfullt i kombinasjon for å behandle et individ med revmatoid artritt.

15 **Betegnelser**

Som anvendt heri, og med mindre annet er angitt, skal hver av følgende betegnelser ha definisjonen anført nedenfor.

20 "Lakinimod" som anvendt her i betyr lakinimodsyre eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

"Et individ med revmatoid artritt" som anvendt heri bety et individ som er positivt diagnostisert med revmatoid artritt.

25 En "mengde" eller "dose" av lakinimod som målt i milligram som anvendt heri betyr de milligrammene av lakinimodsyre som er til stede i en fremstilling, uavhengig av fremstillingens form.

30 "Virkningsfull" i sammenheng med en mengde av lakinimod og/eller metotreksat som anvendt heri betyr den kvantiteten av lakinimod og/eller metotreksat som er tilstrekkelig for å gi en ønsket terapeutisk respons uten unødige bivirkninger (slik som toksisitet, irritasjon eller allergisk respons) i tråd med et fornuftig nytte/risiko-forhold når den anvendes ifølge denne oppfinnelsen.

35

"I det vesentlige eliminerer" et symptom assosiert med revmatoid artritt som anvendt heri betyr reduksjon av forekomsten av det symptomet med minst 96 %.

5 "Behandle" som anvendt heri omfatter for eksempel å indusere inhibering, regresjon eller stase av en lidelse, eller redusere, undertrykke, inhibere, redusere alvorlighetsgraden, eliminere eller forbedre et symptom på lidelsen.

10 "Inhibering" av sykdomsprogresjon eller sykdomskomplikasjon hos et individ som anvendt heri betyr å forebygge eller redusere sykdomsprogresjonen og/eller sykdomskomplikasjonen hos individet.

15 Et "symptom" assosiert med revmatoid artritt som anvendt heri betyr hvilken som helst klinisk eller laboratorieobservert manifestasjon assosiert med revmatoid artritt og er ikke begrenset til hva individet kan føle eller observere. Inflammasjon er et symptom på revmatoid artritt.

20 En "bivirkning" eller "AE" som anvendt heri betyr hvilken som helst uheldig medisinsk forekomst hos et klinisk testindivid som har fått administrert et medisinsk produkt, og som ikke står i årsakssammenheng med behandlingen. En bivirkning kan derfor være ethvert ugunstig og utilsiktet tegn inkludert et unormalt laboratoriefunn, symptom eller sykdommer som tidsmessig var assosiert med anvendelsen av et prøvingspreparat, enten den ble ansett for å stå i sammenheng med prøvingspreparatet eller ikke.

25 "Farmasøytisk akseptabel bærer" som anvendt heri betyr en bærer eller eksipient som er egnet for anvendelse med mennesker og/eller dyr uten uønskede bivirkninger (slik som toksisitet, irritasjon og allergisk respons) sammenlignet med et fornuftig nytte/risiko-forhold. Det kan være et 30 farmasøytisk akseptabelt løsemiddel, suspensjonsmiddel eller vehikkel for administrering av de foreliggende forbindelsene til individet.

I sammenheng med dosering indikerer betegnelsen "BID" at dosen administreres to ganger daglig. Betegnelse "QD" indikerer at dosen administreres én gang 35 daglig.

Anvendelsen av lakinimod for revmatoid artritt er tidligere foreslått i for eksempel US-patentnr. 6,077,851. Oppfinnerne har imidlertid overraskende funnet at kombinasjonen av lakinimod og metotreksat (MTX) er vesentlig mer virkningsfull for behandling av revmatoid artritt enn hvert middel alene.

5

Et farmasøytisk akseptabelt salt av lakinimod som anvendt i denne patentsøknaden inkluderer litium, natrium, kalium, magnesium, kalsium, mangan, kobber, sink, aluminium og jern. Saltformuleringene av lakinimod og fremgangsmåten for å fremstille samme beskrives for eksempel i patentsøknadspublikasjonsnr. 2005/0192315 og PCT-søknadspublikasjonsnr. WO 2005/074899, hvortil det henvises, og som i sin helhet skal anses for opptatt heri.

10

15

En doseringsenhet kan omfatte en enkelt forbindelse eller blandinger av forbindelser derav. En doseringsenhet kan fremstilles for orale doseringsformer, slik som tabletter, kapsler, piller, pulvere og granulater.

20

25

30

35

Lakinimod kan administreres i blanding med egnede farmasøytiske fortynnere, forlengere, eksipienter eller bærere (sammen betegnet heri en farmasøytisk akseptabel bærer) som fordelaktig velges med hensyn til den tiltenkte formen for administrering, og som er forenlig med konvensjonell farmasøytisk praksis. Enheten er foretrukket i en form som er egnet til oral administrering. Lakinimod kan administreres alene, men er generelt blandet med en farmasøytisk akseptabel bærer, og administreres parallelt i form av en tablett eller kapsel, et liposom eller som et agglomerert pulver. Eksempel på egnede faste bærere inkluderer laktose, sukrose, gelatin og agar. Kapsler eller tabletter kan enkelt formuleres og kan enkelt fremstilles for å svelges eller tygges; andre faste former inkluderer granulater og bulkpulvere. Tabletter kan inneholde egnede bindemiddel, smøremiddel, sprengmiddel, fargemiddel, smakstilsetningsmiddel, strømningsinduksjonsmiddel og smeltemiddel. For oral administrasjon i doseringsenhetsform av en tablett eller kapsel kan den aktive legemiddelkomponenten for eksempel kombineres med en oral, ikke-toksisk, farmasøytisk akseptabel, inert bærer slik som laktose, gelatin, agar, stivelse, sukrose, glukose, metylcellulose, dikalsiumfosfat, kalsiumsulfat, mannitol, sorbitol, mikrokrySTALLinsk cellulose og lignende. Egnede bindemiddel inkluderer stivelse, gelatin, naturlige sukkerarter slik som glukose eller beta-laktose, kornstivelse, naturlige og syntetiske gummier slik som akasiagummi, tragant,

eller natriumalginat, povidon, karboksymetylcellulose, polyetylenglykol, voks, og lignende. Smøremiddel anvendt i disse doseringsformene inkluderer natriumoleat, natriumstearat, natriumbenzoat, natriumacetat, natriumklorid, stearinsyre, natriumstearyl fumarat, talkum og lignende. Desintegreringsmiddel inkluderer, uten begrensning, stivelse, metylcellulose, agar, bentonitt, xantangummi, krysskarmellosenatrium, natriumstivelseglykolat og lignende.

Spesifikke eksempel på teknikkene, farmasøytisk akseptable bærere og eksipienter som kan anvendes for å formulere orale doseringsformer ifølge den foreliggende oppfinnelsen, beskrives for eksempel i patentsøknadspublikasjonsnr. 2005/0192315, PCT-søknadspublikasjonsnr. WO 2005/074899, WO 2007/047863 og WO 2007/146248.

Generelle teknikker og sammensetninger for å fremstille doseringsformer som er nyttige i den foreliggende oppfinnelsen, beskrives i følgende referanser: 7 Modern Pharmaceutics, kapittel 9 og 10 (Banker & Rhodes, Editors, 1979); Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets (Lieberman et al., 1981); Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 2. utg. (1976); Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. utg. (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985); Advances in Pharmaceutical Sciences (David Ganderton, Trevor Jones, Eds., 1992); Advances in Pharmaceutical Sciences, bd 7. (David Ganderton, Trevor Jones, James McGinity, Eds., 1995); Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Series 36 (James McGinity, Ed., 1989); Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, bd. 61 (Alain Rolland, Ed., 1993); Drug Delivery to the Gastrointestinal Tract (Ellis Horwood Books in the Biological Sciences. Series in Pharmaceutical Technology; J. G. Hardy, S. S. Davis, Clive G. Wilson, Eds.); Modern Pharmaceutics Drugs and the Pharmaceutical Sciences, bd. 40 (Gilbert S. Banker, Christopher T. Rhodes, Eds.). Disse henvisningene skal i sin helhet anses som opptatt i denne søknaden.

Forsøksdetaljer

EKSEMPEL 1: Vurdering av effektene av antiflogistika administrert oralt (PO) og daglig (QD) ved halvetablert type II-kollagenindusert artritt hos DBA/10 lahsd-mus etter 35 dager (MTTC/TV-9)

Introduksjon

Mus (DBA/11acJ, 1J eller B10R111) utvikler pålitelig polyartritt når de blir immunisert mot bovin type II-kollagen (Trentham, 1977) ved anvendelse av en rekke metoder inkludert immuniseringer på dag 0, dag 15, 16 eller 21 med og uten parallell boosting med endotoksin eller rekombinant IL-1 (Bendele, 2001). Sykdommen som forekommer, er vanligvis ikke symmetrisk, og hvilken som helst kombinasjon av poter/ledd kan bli berørt. Siden passermåling av små museankler er utfordrende, anvendes ofte subjektive kliniske poengsystemer i kombinasjon med fremgangsmåter for histologisk scoring. Behandlinger kan være profylaktiske (starter generelt på dagene 16–21) eller terapeutiske (etter observasjon av lesjoner) og kan avhengig av anvendt immuniseringsprotokoll og ønsket grad av destruksjon gå fra 10 dager til flere uker. Lesjoner i berørte ledd ligner dem som forekommer i biologiske middel for artritt med kollagen hos rotter slik som Interleukin-1-reseptorantagonist (IL-1ra) og de løselige TNF-reseptorene (Wooley, 1993; Bakker, 1997; Joosten, 1994; Joosten, 1996; Geiger, 1993). Forbedring av sykdomsinsidens og alvorlighetsgrad er vist hos mus immunisert med type II-kollagen og parallelt gitte cytokiner slik som IL-1 (Hom, 1991; Hom, 1988).

Denne studien er utformet for å bestemme effekten av potensielle antiflogistika (lakinimod 0,2, 1 eller 5 mg/kg) administrert (po, qd) enten alene eller i kombinasjon med metotreksat (MTX) som potensielt antiflogistikum i inhiberingen av inflammasjon, bruskdestruksjon og benresorpsjon assosiert med halvetablert type II-kollagenindusert artritt hos mus. Type II-kollagenindusert artritt hos mus er en dyremodell kjent i teknikken for revmatoid artritt hos mennesker (Bendele, 2001).

Her ble DBA/101aHsd-hannmus med halvetablert type II-kollagenindusert artritt dosert oralt (PO) daglig (QD) på studiedagene 18–33 med vehikkel, lakinimod (0,2, 1 eller 5 mg/kg), metotreksat (0,5 mg/kg, MTX) eller lakinimod (0,2 eller 1 mg/kg) i kombinasjon med MTX (0,5 mg/kg). Mus ble avlivet på dag 34. Evaluerbar effekt basert på dyrenes kroppsvekt, daglige poengsummer for klinisk artritt, poengsummer for artritt uttrykt som område under kurven (AUC) og histopatologi (bare gruppene 1–3, 5 og 8) på forpotene, bakpotene og

knærne fra mus. Histopatologiske resultater ble uttrykt som 4 poter, bare knær eller 6 ledd (knær inkludert). Evaluering av serum-anti-type II-kollagen-antistoffnivåer ble også utført (bare gruppene 1–3, 6 og 8). Alle dyr overlevde til studieavslutning.

5 **Dyr**

74 DBA/101aHsd-hannmus (Harlan Inc.) som var 5–7 uker gamle ved ankomst og veide ca. 17–22 gram på studiedag 18, ble anskaffet. Musene var minst 6 uker ved første immunisering.

10

Materialer: Middel eller legemiddel i vehikkel, type II-kollagen (Elastin Products), Freund's komplette adjuvans (med supplerende M. tuberkulose, 4 mg/ml) (Difco).

15 **Generell studiemetode**

1. Dyr (10/gruppe for artritt, 4/gruppe for normal, huset 5/bur) ble akklimatisert i 8 dager etter ankomst da alle dyr var minst 7 uker gamle.

20

2. Mus ble bedøvet med isofluran og gitt 150 µl bovin type II-kollagen i injeksjoner med Freund's komplette adjuvans (Sigma) inneholdende bovin type II-kollagen (Elastin Products, Owensville, MO) (2 mg/ml) ved haleroten (DO og dag 21).

25

3. Mus ble randomisert ved kroppsvekt til behandlingsgrupper på studiedag 18.

4. MTX ble tilveiebrakt av Bolder BioPATH, Inc. som en 1 mg/ml stamløsning kjøpt fra MWI og ble fremstilt som en 0,05 mg/ml løsning i 1 % CMC for dosering ved 10 ml/kg.

5. Alle doseløsninger ble fremstilt for administrering ved 10 ml/kg (0,3 ml/30 g) mus.

30

6. Behandling initieres på studiedag 18 og fortsettes én gang per dag, hver dag (po, qd) ifølge tabell 1.

Tabell 1: Behandlingsdoseringsplan

Gruppe	N	Forbindelse	Vei	Regime	Dosenivå (Mg/kg)	Dosekonsentrasjon (mg/ml)
1	4	Naiv	–	–	0	0
2	10	vehikkelsykdomskontroll	–	–	0	0
3	10	MTX (0,5 mg/kg)	po	QD	0,5	0,05
4	10	Lakinimod	po	QD	0,2	0,02
5	10	Lakinimod	po	QD	1	0,1
6	10	Lakinimod	po	QD	5	0,5
7	10	Lakinimod og MTX (0,5 mg/kg)	po	QD	0,2	0,02
8	10	Lakinimod og MTX (0,5 mg/kg)	po	QD	1	0,1
*For alle testgruppene: n = 10, BW = 30 g, dosevol. = 10 ml/kg, dose i 17 dager						

7. Under behandlingsperioden ble kliniske resultater gitt for hver av potene (høyre foran, venstre foran, høyre bak, venstre bak) ifølge tabell 2.

5

Tabell 2: Kliniske poengkriterier for for- og bakpoter

Poengsum	Beskrivelse
0	normal
1	1 berørt bak- eller forpoteledd eller minimalt diffust erytem og hevelse
2	2 berørte bak- eller forpoteledd eller mildt diffust erytem og hevelse
3	3 berørt bak- eller forpoteledd eller moderat diffust erytem og hevelse
4	Markert diffust erytem og hevelse, eller =4 berørte fingerledd
5	Alvorlig diffust erytem og alvorlig hevelse i hele poten, ute av stand til å bøye fingre

8. På dagene 21–35 forekom artrittdebut. Mus ble veid på artrittdagene 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, og før vevsinnhenting på dag 34 (siste dag).

5 9. Ved nekropsi ble dyr fra alle gruppene tappet for blod via hjertepunktur for serum og avlivet via cervical dislokasjon. Forpoter, bakpoter og knær ble fjernet og plassert i 10 % NBF. Fullblod ble koagulert ved romtemperatur i ca. 2 timer før det ble rotet ved 13 000 o/min i 8 minutter.

10 10. Prosessering av ledd: Etter 1–2 dager i fiksativ og deretter 4–5 dager i kalkfjerningsmiddel ble leddene prosessert, integrert, snittet og farget med toluidinblå og H&E (2 plater per dyr). Bare for- og bakpoter og knær ble prosessert innledningsvis (6 ledd/mus).

15 11. Morfologiske patologifremgangsmåter: Histopatologi ble utført bare på gruppene 1–3, 5 og 8. Etter 1–2 dager i fiksativ og 4–5 dager i 5 % maursyre for kalkfjerning ble vev beskåret, prosessert for parafinintegrering, snittet ved 8 µm og farget med toluidinblå (T-blå). Bakpoter, forpoter og knær ble integrert og snittet i frontalplanet. Seks ledd fra hvert dyr ble prosessert for histopatologisk forhøyelse.

12. Vevsprosessering og -evaluering:

- a. plasser ledd i avkalkingsinnretning,
- b. beskjer ledd, vask, prosesser vev,
- 20 c. integrer ledd,
- d. snitt vev, farg vev,
- e. foreta histopatologisk evaluering og
- f. prosesser data, foreta QC, utarbeid diagrammer og rapport.

25 **Histopatologiske metoder for poengsummer for museledd med type II-kollagenindusert artritt**

30 Når poter eller ankler fra mus med lesjoner av type II-kollagenindusert artritt gis poeng, må endringenes alvorlighetsgrad samt antall individuelle berørte ledd tas med i betraktningen. Når bare 1–3 ledd av potene eller anklene av en mulighet for tallrike mellomhånds-/mellomfots-/finger- eller vrist- / legg- og vristledd ble berørt, ble en vilkårlig tilordning av et maksimalt resultat på 1, 2 eller 3 for parametere nedenfor (tabellene 3–6) gitt avhengig av endringenes alvorlighetsgrad. Hvis mer enn 3 ledd var involvert, ble kriteriene nedenfor

35 (tabellene 3–6) anvendt på de mest alvorlig berørte / flerheten av leddene.

Tabell 3: Inflammasjon

Poengsum	Beskrivelse
0	normal
1	Minimal infiltrering av inflammatoriske celler i synovium og periartikulært vev i berørte ledd
2	Mild infiltrering av inflammatoriske celler. Ved poter, generelt begrenset til berørte ledd (1–3 berørt)
3	Moderat infiltrering med moderat ødem. Ved poter, begrenset til berørte ledd, generelt 3–4 ledd + håndledd eller ankel
4	Markert infiltrering som berører de fleste områdene med markert ødem, 1 eller 2 uberørte ledd kan være til stede
5	Alvorlig diffus infiltrering med alvorlig ødem som berører alle ledd og periartikulært vev

Tabell 4: Pannus

Poengsum	Beskrivelse
0	normal
1	Minimal infiltrering av pannus i brusk og subkondralt ben, marginale soner
2	Mild infiltrering med marginal sonedestruksjon av hardvev i berørte ledd
3	Moderat infiltrering med moderat hardvevsdestruksjon i berørte ledd
4	Markert infiltrering med markert destruksjon av leddarkitektur, hvilket berører de fleste ledd
5	Alvorlig infiltrering assosiert med total eller nærmest total destruksjon av leddarkitektur berører alle ledd

Tabell 5: Bruskskade

Poengsum	Beskrivelse
0	normal
1	Minimal: generelt minimalt til mildt tap av toluidinblå farging med intet åpenbart kondrocyttap eller kollagendisrupsjon i berørte ledd
2	Mild: generelt mildt tap av toluidinblå farging med fokusområder på kondrocyttap og/eller kollagendisrupsjon i noen berørte ledd
3	Moderat: generelt moderat tap av toluidinblå farging med multifokalt kondrocyttap og/eller kollagendisrupsjon i berørte ledd, noe matrise forblir på hvilken som helst berørt overflate med områder av alvorlig matrisetap
4	Markert: markert tap av toluidinblå farging med multifokalt markert (dybde til dyp sone) kondrocyttap og/eller kollagendisrupsjon i de fleste ledd, hvis kne-en-overflate har totalt til nærmest totalt brusktap
5	Alvorlig: alvorlig diffust tap av toluidinblå farging med multifokalt alvorlig (dybde til strømningsmerke) kondrocyttap og/eller kollagendisrupsjon i alle ledd, hvis kne-2 eller flere overflater har totalt til nærmest totalt brusktap

Tabell 6: Benresorpsjon

Poengsum	Beskrivelse
0	normal
1	Minimal: små resorpsjonsområder, ikke uten videre åpenbare med lav forstørrelse, sjeldne osteoklaster i berørte ledd, begrenset til marginale soner
2	Mild: flere tallrike resorpsjonsområder, ikke uten videre åpenbare med lav forstørrelse, flere osteoklaster i berørte ledd, begrenset til marginale soner
3	Moderat: åpenbar resorpsjon av medullært, trabekulært og kortikalt ben uten fulltykkelsesdefekter i korteks, tap av noen medullære trabekler, lesjon åpenbar med lav forstørrelse, flere osteoklaster i berørte ledd

Poengsum	Beskrivelse
4	Markert: Fulltykkelsesdefekter i kortikalt ben, ofte med deformasjon av profil for gjenværende kortikale overflate, markert tap av medullært ben, tallrike osteoklaster, berører de fleste ledd
5	Alvorlig: Fulltykkelsesdefekter i kortikalt ben og destruksjon av leddarkitektur for alle ledd

5 For hvert dyr ble resultater for inflammasjon, pannus, bruskskade og benskade bestemt for hvert av de 6 forelagte leddene. En total (alle 6 ledd) dyrepoengsum og en gjennomsnittlig dyrepoengsum ble bestemt samt totaler og gjennomsnitt for hver av de individuelle parameterne. Data ble også uttrykt som gjennomsnitt for poter (4 ledd) eller knær (2 ledd). Parametere for de forskjellige gruppene sammenlignes deretter med sykdomskontrolldyr.

10 **Statistisk analyse**

15 Kliniske data for potepoeng (gjennomsnitt for dyr) ble analysert ved bestemmelse av området under doseringskurven (AUC) for studiedagene 18–34. For beregning av AUC ble de daglige gjennomsnittlige poengsummene for hver mus ført inn i Microsoft Excel, og området mellom behandlingsdagene etter sykdomsdebuten til siste dag ble beregnet. Gjennomsnitt for hver gruppe ble bestemt og den prosentvis inhiberingen fra artrittkontroller ble beregnet ved å sammenligne verdier for behandlede og normale dyr. Statistisk analyse av kliniske og histopatologiske data ble utført ved anvendelse av en students t-test med signifikans satt til $p \leq 0,05$.

Prosentvis inhibering av kliniske parametere og AUC beregnes ved anvendelse av følgende formel:

$$\% \text{ Inhibering} = B/A \times 100.$$

25

hvor

A = gjennomsnittlig sykdomskontroll - gjennomsnittlig normal

B = gjennomsnittlig behandlet - gjennomsnittlig normal

Resultater

Denne studien vurderer effektene av antiflogistika administrert po, qd i en dyremodell for human revmatoid artritt. Resultatene indikerer at effekten av kombinasjonen av lakinimod og metotreksat på symptomer på revmatoid artritt er vesentlig større enn den additive effekten av hvert middel alene.

Tap av kroppsvekt på grunn av artritt ble vesentlig inhibert ved behandling med 1 mg/kg lakinimod + MTX (62 % inhibering) sammenlignet med vehikkelbehandlede sykdomskontroller. Tap av kroppsvekt for denne gruppen ble også vesentlig (69 %) inhibert sammenlignet med MTX-behandlede mus. Tap av kroppsvekt for alle andre behandlingsgrupper var ikke vesentlig forskjellig fra vehikkelkontrollene.

Vehikkelbehandlede sykdomskontrollmus hadde 100 % sykdomsinsidens på studiedag 27. Mus behandlet med 0,2 mg/kg lakinimod hadde 100 % sykdomsinsidens på studiedag 28. Dyr behandlet med MTX, 1 mg/kg lakinimod eller 0,2 mg/kg lakinimod + MTX hadde redusert sykdomsinsidens med 90 % ved studieslutt. Redusert sykdomsinsidens ble også sett hos mus behandlet med 5 mg/kg lakinimod (70 % insidens) eller 1 mg/kg lakinimod + MTX (60 %).

Daglige poengsummer for klinisk artritt ble vesentlig redusert for mus behandlet med MTX (*de vesentlige dagene 27–34), 0,2 mg/kg lakinimod (*d28–34), 1 mg/kg lakinimod (*d25–34), 5 mg/kg lakinimod (*d24–34), 0,2 mg/kg lakinimod + MTX (*d24–34) eller 1 mg/kg lakinimod + MTX (*d24–34) sammenlignet med vehikkelkontroller. Daglige kliniske poengsummer ble også vesentlig redusert ved behandling med 0,2 mg/kg lakinimod + MTX (*d29–34) eller 1 mg/kg lakinimod + MTX (*d26–34) sammenlignet med mus behandlet bare med MTX. Før sykdomsforekomst i vehikkelkontrollgruppen ble daglige poengsummer for klinisk artritt vesentlig forhøyet hos mus behandlet med 0,2 mg/kg lakinimod (*d23), 1 mg/kg lakinimod (*d22–24) eller 5 mg/kg lakinimod (*d22–23). (Figur 3)

Poengsummer for klinisk artritt uttrykt som område under kurven (AUC) ble vesentlig redusert for mus behandlet med MTX (50 % reduksjon), 0,2 mg/kg

lakinimod (32 %), 1 mg/kg lakinimod (52 %), 5 mg/kg lakinimod (69 %), 0,2 mg/kg lakinimod + MTX (82 %) eller 1 mg/kg lakinimod + MTX (95 %) sammenlignet med vehikkelkontroller. Poengsummer for klinisk artritt AUC ble også vesentlig redusert ved behandling med 0,2 mg/kg lakinimod + MTX (65 %) eller 1 mg/kg lakinimod + MTX (90 %) sammenlignet med MTX-behandlede mus.

Serumanalyse for anti-TTC-nivåer ble utført på mus bare fra gruppene 1–3, 6 og 8. Serumanalyse viste at vehikkelkontrollmus hadde anti-TTC-nivåer på 27 062,50 enheter/ml. Serum-anti-TTC-nivå ble ikke vesentlig påvirket ved behandling med 5 mg/kg lakinimod, 1 mg/kg lakinimod + MTX eller MTX sammenlignet med vehikkelkontroller.

Sykdomskontrolldyr hadde histopatologiske endringer i samsvar med dem sett ved type II-kollagenindusert artritt, i de fleste ledd, med poengsummer som går fra minimale til alvorlige. Mikroskopisk endring inkludert infiltrering av synovium og periartikulært vev med nøytrofiler og mononukleære inflammatoriske celler (inflammasjon), pannus i marginal sone og benresorpsjon og bruskskade (proteoglykantap, kondrocyttddød og kollagenmatrisedestruksjon).

Alle potehistopatologiske parametere ble vesentlig redusert mot normalt for mus behandlet med 1 mg/kg lakinimod (61 % reduksjon av poengsummer), 1 mg/kg lakinimod + MTX (96 %) eller MTX (46 %) sammenlignet med vehikkelkontroller. Behandling med 1 mg/kg lakinimod + MTX reduserte også signifikant (93 %) alle potehistopatologiske parametere sammenlignet med MTX-behandlede mus.

Alle knehistopatologiske parametere ble vesentlig redusert mot normalt for mus behandlet med 1 mg/kg lakinimod + MTX (97 % reduksjon av poengsummer) sammenlignet med vehikkelkontroller. Behandling av denne gruppen reduserte også vesentlig (95 %) alle knehistopatologiske parametere sammenlignet med MTX-behandlede mus. Behandling med 1 mg/kg lakinimod reduserte vesentlig kneinflammasjon (51 % reduksjon), pannus (59 %), bruskskade (62 %) og knepoengsummer (57 %) sammenlignet med vehikkelkontroller.

Alle gjennomsnittlige histopatologiske parametere for de seks leddene ble vesentlig redusert mot normalt for mus behandlet med 1 mg/kg lakinimod (60 %

reduksjon av poengsummer), 1 mg/kg lakinimod + MTX (96 %) eller MTX (43 %) sammenlignet med vehikkelkontroller. Behandling med 1 mg/kg lakinimod + MTX reduserte også vesentlig (93 %) alle histopatologiske parametere for de seks leddene sammenlignet med MTX-behandlede mus. (Figurene 1 og 2)

Som vist i figur 1 og 2 reduserte administreringen av lakinimod i kombinasjon med metotreksat vesentlig alvorlighetsgraden av forskjellige symptomer assosiert med revmatoid artritt, inkludert inflammasjon, pannus, bruskskade og benresorpsjon på de seks leddene hos DBA/101aHsd-musene (fire poter og to knær) sammenlignet med kontrollgruppen, gruppen bare behandlet med metotreksat og gruppen bare behandlet med lakinimod.

Figur 1 viser at administreringen av lakinimod i kombinasjon med metotreksat i det vesentlige eliminerte pannus og benskade i testindividenes seks ledd, hvilket reduserte deres gjennomsnittlige poengsummer til nesten null. Figur 2 viser at administreringen av lakinimod i kombinasjon med metotreksat i det vesentlige eliminerte de samlede symptomene assosiert med revmatoid artritt hos testindividenes, hvilket reduserte deres kumulative poengsum med 96 %.

Disse resultatene viser således at administrering av lakinimod i kombinasjon med metotreksat er i det vesentlige mer virkningsfullt i behandlingen av et individ med aktiv revmatoid artritt enn når hvert middel administreres alene. Oppfinnerne har overraskende funnet at lakinimod og metotreksat arbeider i synergi i behandlingen av aktivt revmatoid artritt.

Referanser

1. "Rheumatoid Arthritis" (1999) The Merck Manual, 7. utgave, s. 416–423.
2. 0130282 99506202. A double blind, randomized, repeat-dose, dose escalation study of ABR-215062 versus placebo in healthy volunteers and patients with multiple sclerosis. Active Biotech Research AB, Sverige. Final Clinical Trial Report, januar 2002.
3. 03506207. An open safety study on laquinimod (ABR-215062) in patients with multiple sclerosis. Active Biotech Research AB, Sverige. Final Clinical Trial Report, april 2007.

4. 0430067 275-1061-01. Determination of the effects of ABR-212616, ABR-215050, ABR-215062 and ABR-215757 on the activities of CYP1A2 and CYP3A4 in cryopreserved human hepatocytes. In Vitro Technologies, USA. Final Report, februar 2004.
- 5 5. 0430518 275-1081-02. Determination of the effects of ABR-215062 on CYP1A2 and CYP3A4 in cryopreserved human hepatocytes. In Vitro Technologies, USA. Final Report, august 2004.
6. 9830089. PNU-215045, PNU-215062: Effects on cytochrome P450 enzymes in female Sprague Dawley rats. Lund Research Center AB, Active-Biotech Group, Sverige. Final Report, november 1998.
- 10 7. 9830133. PNU-215062: Effects on cytochrome P450 enzymes in female Sprague Dawley rats. Lund Research Center AB, Active Biotech Group, Sverige. Final Report, november 1998.
8. A two-period, open-label, one-sequence crossover study in healthy subjects to assess the potential interaction of fluconazole on laquinimod pharmacokinetics. PRACS Institute Cetero Research, ND, USA. Final Report, juni 2009.
- 15 9. Arnett F, Edworthy S, Bloch D, McShane D, Fries J, Cooper N, Healey L, Kaplan S, Liang M, Luthra H (1988) "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis". Arthritis Rheum. 31(3): 315–24.
- 20 10. Bakker, AC, Joosten LAB, Arntz OJ, Helsen MA, Bendele AM, van de Loo AJ, van den Berg WB. Gene therapy of murine collagen-induced arthritis: local expression of the human interleukin-1 receptor antagonist protein prevents onset. Arthritis Rheum. 1997; 40:893–900, 1997.
- 25 11. Bendele, A.M. (2001) "Animal Models of Rheumatoid Arthritis" J Musculoskel Neuron Interact, 1(4) :377–385.
12. Geiger T, Twobin H. Consenti-vargas A, Zingel O, Arnold J, Rordorf C, Glatt M, Vosbeck K. Neutralization of interleukin-1B activity in vivo with a monoclonal antibody alleviates collagen-induced arthritis in DBA/1 mice and prevents the associated acute phase response. Clin Exp Rheumatol. 1993; 11:515–522.
- 30 13. Hom J, Bendele AM, Carlsson D. In vivo administration with IL-1 accelerates the development of collagen-induced arthritis in mice. J Immunol. 9188; 141:834–841.

14. Hom J, Gliszcinski VL, Cole HW, Bendele AM. Interleukin-1 mediated acceleration of type II collagen-induced arthritis: Effects of anti-inflammatory or anti-arthritic drugs. *Agents Actions*. 1991; 33:300–309.
15. Joosten LAB, Helsen MMA, van de Loo FAJ and van den Berg WB. Amelioration of established type II collagen-induced arthritis (CIA) with anti-IL-1. *Agents Actions*. 1994; 41:C174–C176.
16. Joosten LAB, Helsen MMA, van de Loo FAJ and van den Berg WB. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Arthritis Rheum*. 1996; 39:797–809.
17. PCT-søknadspublikasjonsnr. WO 2007/047863, publisert 26. april, 2007, internasjonal inngivelsesdato 18. oktober, 2006.
18. PCT-søknadspublikasjonsnr. WO 2007/146248, publisert 21. desember 2007, internasjonal inngivelsesdato 12. juni 2007.
19. Polman, C. et al., (2005) "Treatment with laquinimod reduces development of active MRI lesions in relapsing MS", *Neurology*. 64:987–991.
20. Sandberg-Wollheim M, et al. (2005) "48-week open safety study with high-dose oral laquinimod in patients", *Mult Scler*. 11:S154 (Sammendrag).
21. TQT-LAQ-122. A Double-Blind, Randomized, Parallel Group, Thorough QT/QTc Trial in Healthy Men and Women to Assess the Effect of Laquinimod on Cardiac Repolarization Using a Clinical and a Supratherapeutic Dose Compared to Placebo, with Moxifloxacin as a Positive Control. PRACS Institute Cetero Research, ND, USA. Final Report, juni 2009.
22. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J Exp Med*. 1977; 146(3):857–868.
23. US-patentnr. 6,077,851, utgitt 20. juni 2000 til Bjork, et al.
24. Wooley PH, Whalen JD, Chapman DL, Berger AE, Richard KA, Aspar DG and Staite ND. The effect of an interleukin-1 receptor antagonist protein on type II collagen-induced arthritis and antigen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 1993; 36:1305–1314.

Patentkrav

1. Lakinimod eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse i kombinasjon med metotreksat i behandlingen av et individ med revmatoid artritt.

5

2. Farmasøytisk sammensetning omfattende en mengde av lakinimod eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav og en mengde av metotreksat for anvendelse i behandlingen av et individ med revmatoid artritt.

10

3. Lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet for anvendelse ifølge krav 1, hvori behandlingen omfatter periodisk å administrere til individet en mengde av lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet og en mengde av metotreksat, hvori mengdene samlet sett er virkningsfulle for å behandle individet.

15

4. Lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet for anvendelse ifølge krav 3, hvori mengden av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav og mengden av metotreksat samlet sett er mer virkningsfullt for å behandle individet enn når hvert middel administreres alene.

20

5. Lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet for anvendelse ifølge krav 3 eller 4, hvori mengden av lakinimod eller farmasøytisk akseptabelt salt derav og mengden av metotreksat samlet sett er virkningsfullt for å redusere et klinisk symptom på revmatoid artritt hos individet.

25

6. Lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet for anvendelse ifølge kravene 3–5, hvori det farmasøytisk akseptable saltet av lakinimod er lakinimodnatrium.

30

7. Lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 3–6, hvori den periodiske administreringen av lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet derav utføres oralt.

35

8. Lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 3–7, hvori den administrerte mengden av lakinimod er 0,0005–10 mg/kg/dag eller 0,1–2,0 mg/dag.

9. Lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 3–8, hvori den administrerte mengden av metotreksat er 0,02–1,0 mg/kg/dag eller 1–3 mg/dag.

5 **10.** Lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 3–9, hvori behandlingen ytterligere omfatter å administrere et ikke-steroidalt antiflogistikum (NSAID), et salisylat, et langsomtvirkende legemiddel, en gullforbindelse, et hydroksyklorokin, et sulfasalazin, en kombinasjon av langsomtvirkende legemiddel, et kortikosteroid, 10 et cytotoksikum, et immunsuppressivum og/eller et antistoff.

15 **11.** Lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 3–10, hvori den periodiske administreringen av lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet derav og metotreksat i det vesentlige eliminerer et symptom eller reduserer alvorlighetsgraden av et symptom assosiert med revmatoid artritt.

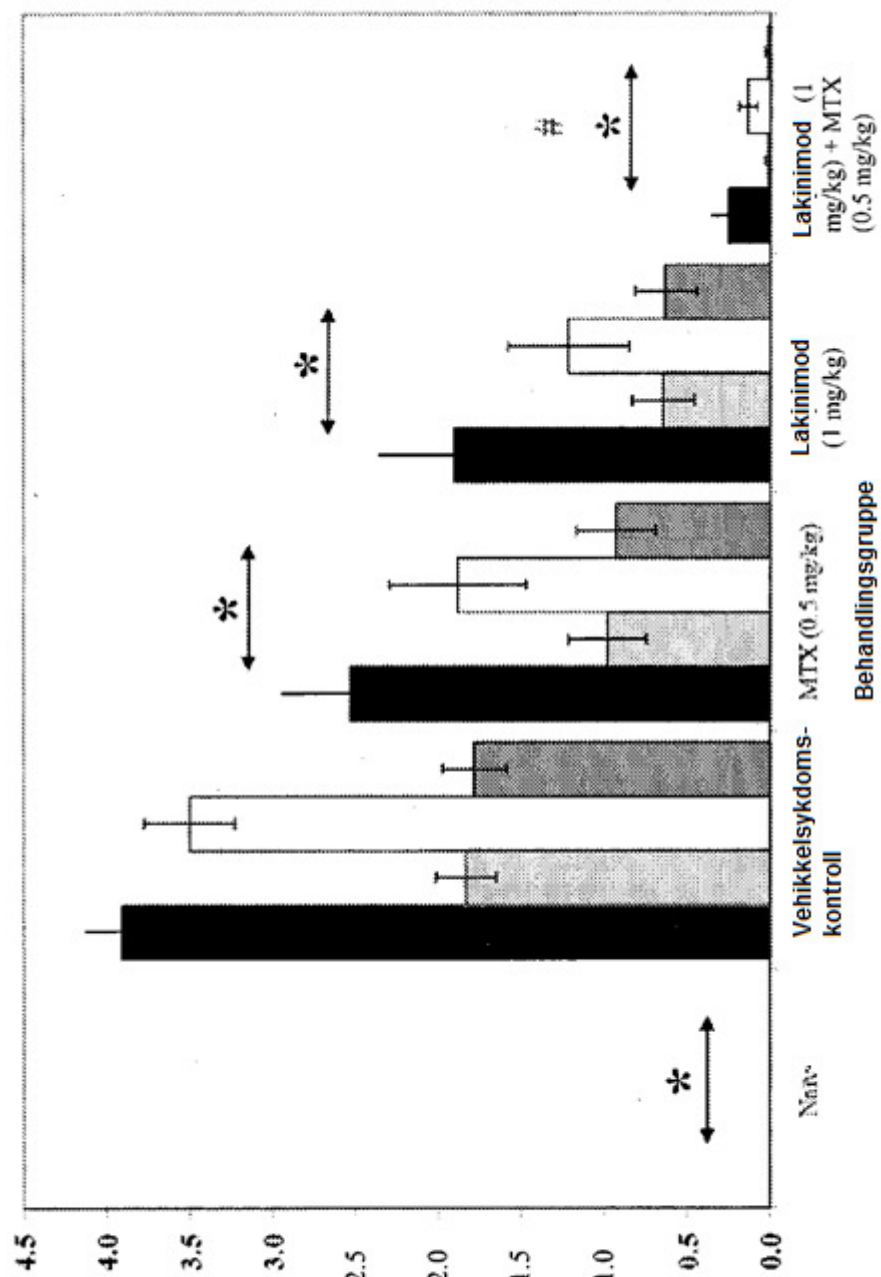
20 **12.** Lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 3–10, hvori den periodiske administreringen av lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet derav og metotreksat reduserer antallet ledd som berøres av et symptom assosiert med revmatoid artritt.

25 **13.** Lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 3–12, hvori den periodiske administreringen av lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet derav og metotreksat eliminerer urinsedimenter.

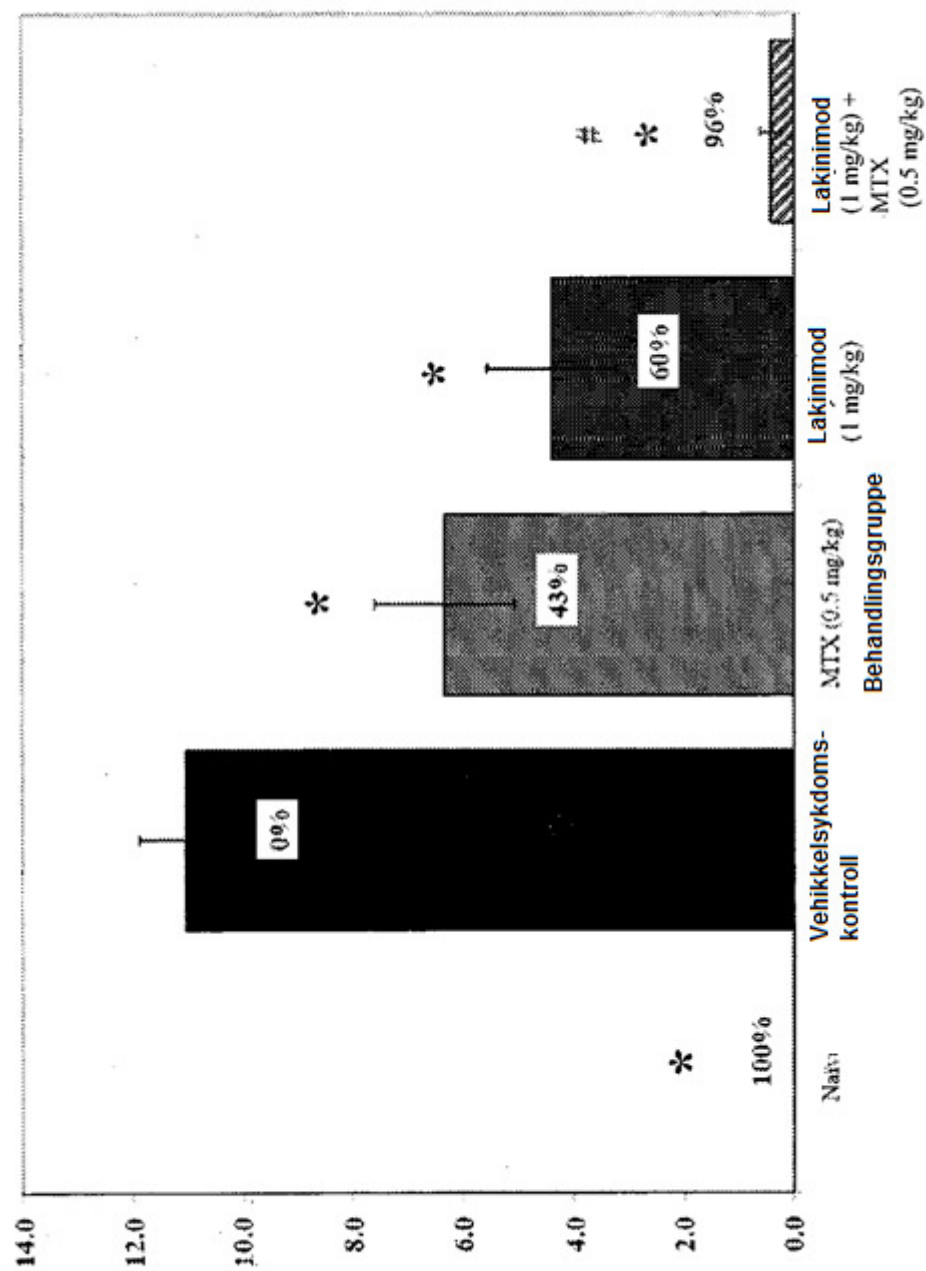
30 **14.** Lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 3–13, hvori hver av mengden av lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet derav når den tas alene, og mengden av metotreksat når den tas alene, er virkningsfullt for å behandle individet.

35 **15.** Lakinimod eller det farmasøytisk akseptable saltet for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 3–14, hvori individ mottar metotreksatterapi før initiering av lakinimodterapi.

FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3

