



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 2 137 537 B1**(51) Int. Cl.  
G01N 33/68 (2006.01)(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI  
PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number:	E008327	(73) Patendiomanik:	
(11) Patendikirjelduse tõlke number:	EE-EP 2 137 537	Biogen Idec MA Inc. 14 Cambridge Center, Cambridge, Massachusetts 02142, US	
(30) Prioriteediandmed:	08.02.2007 US 888921 P	(72) Leiutise autorid:	
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev:	07.02.2008	LUKASHEV, Matvey, E. 3 Louis Road, Tewksbury, MA 01876, US	
(96) Euroopa patendi- taotluse number:	08725256.5	O'NEILL, Gilmore 17 Grove Street, Medford, MA 02155, US	
(97) Euroopa patendi väljaand- misest teatamise kuupäev:	29.05.2013	(74) Patendivolinik:	
(97) Euroopa patendi number:	EP 2 137 537	Lembit Mitt AAA Patendibüroo OÜ Tartu mnt 16, 10117 Tallinn, EE	
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev:	13.08.2013		
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev:	15.10.2013		

(54) Koostised ja kasutamine polüskleroosi ravimiseks

**[0001]** Käesolevas leiutises pakutakse teatavaid ühendeid neuroloogiliste haiguste, sealhulgas demüeliniseerivate neuroloogiliste haiguste, eelkõige polüskleroosi raviks.

- 5 **[0002]** Polüskleroos (*Sclerosis multiplex*) on autoimmuunhaigus, mille puhul on autoimmuunne tegevus suunatud kesknärvisüsteemi (*central nervous system*, CNS) antigeenide vastu. Haigust iseloomustab kesknärvisüsteemi osade põletik, mis toob kaasa närvijätkete ümber oleva müeliinkihi kaotuse (demüelinatsiooni), närvijätkete kaotuse ja lõpuks neuronite, oligodendrotsüütide ja gliaalrakkude hävinemise.
- 10 **[0003]** Maailmas kannatab polüskleroosi all hinnanguliselt 2,5 miljonit inimest. See on üks kõige enam levinud kesknärvisüsteemi haigusi noorte täiskasvanute hulgas. Polüskleroos on krooniline, progresseeruv ja invaliidistav haigus, mis tabab haigeid üldiselt mõne aja jooksul pärast täiskasvanuks saamist; haigus diagnoositakse üldiselt 20. kuni 40. eluaasta vahel, kuigi see võib puhkeda ka varem. Haigus ei ole otseselt pärilik,
- 15 kuigi geneetilisel eelsoodumusel on selle arengus teatav roll. Ägenemiste ja remissioonidega polüskleroos kulgeb fokaalse või multifokaalse neuroloogilise düsfunktsiooni korduvate hoogude vormis. Hood võivad näiliselt juhuslikult paljude aastate jooksul tekkida, vaibuda ja uuesti tekkida. Remissioon ei ole sageli täielik ning kui üks hoog järgneb teisele, järgneb sellele järk-järguline progresseerumine koos üha
- 20 raskemaks muutuva püsiva neuroloogilise puudega.

- [0004]** Kuigi erinevad immunoterapeutilised ravimid võivad polüskleroosi all kannatavatele patsientidele leevendust pakkuda, ei suuda ükski neist muuta haiguse kulgu ning osad võivad põhjustada raskeid kahjulikke kõrvalmõjusid. Enamiku praeguste
- 25 polüskleroosi ravimeetodite eesmärk on vähendada põletikku ning pärssida või moduleerida immuunsüsteemi. Alates 2006. aastast on saadaval olnud polüskleroosi ravimeetodid, mis vähendavad põletikku ja uute episoodide arvu, kuid mis ei avalda mingit mõju haiguse kulule. Mitmed kliinilised uuringud on näidanud, et kroonilise polüskleroosi puhul ei piira põletiku pärssimine kuigi märkimisväärselt pikaajalise haiguse
- 30 kulu tõttu süvenevat invaliidsust, viidates sellele, et närvisüsteemi kahjustus ja põletik on erinevad haigused. Kesknärvisüsteemi remüelineerimise soodustamine parandusmehhanismina ja närvijätkete kaotuse ja neuronite hävinemise ennetamine on mõned polüskleroosi ravimise olulised eesmärgid. Polüskleroosist ja selle praegustest

ravimeetoditest laiaulatusliku ülevaate saamiseks vt näiteks „McAlpine’s Multiple Sclerosis“, autorid Alastair Compston *et al.*, 4. trükk, Churchill Livingstone Elsevier, 2006.

5 **[0005]** „2. faasi ensüümid” toimivad imetajate rakkudes kaitsemehhanismina hapniku-/lämmastikuühendite (ROS/RNS), elektrofiilide ja ksenobiootikumide vastu. Neid ensüüme ei ekspresseerita tavaliselt maksimaalses tasemes; nende ekspressiooni saab esile kutsuda mitmete looduslike ja sünteetiliste ainetega. Nukleaarfaktoriga E2 seotud faktor 2 (Nrf2) on transkriptsioonifaktor, mis vastutab mitmete oluliste detoksifikatsiooni

10 põhjustavate ja antioksideerivate ensüümide esilekutsumise eest, mis koordineerivad rakkude kaitsereaktsiooni ainevahetusliku ja toksilise stressi suhtes.

**[0006]** ROS/RNS tekitavad kõige enam kahjustusi ajus ja närvikoes, kus nad ründavad postmitootilisi (st jagunematuid) rakke, nagu näiteks gliaarakke, oligodendrotsüüte ja

15 neuroneid, mis on vabade radikaalide suhtes eriti tundlikud. See protsess toob kaasa neuronaalse kahjustuse. Oksüdatiivset stressi on täheldatud mitmete neurodegeneratiivsete haiguste, sealhulgas ALS-i, Alzheimeri tõve (AD) ja Parkinsoni tõve (PD) patogeneesis. Ülevaate saamiseks vt näiteks van Muiswinkel *et al.*, *Curr. Drug Targets CNS--Neurol. Disord.*, 2005, 4:267-281. Hiljuti avaldati, et Nrf2 kontrollitav antioksideerivne ensüüm

20 NQO1 (NAD(P)H dehüdrogenaas, kinoon (1), on oluliselt suurendatud AD ja PD all kannatavate patsientide ajukudedes (Muiswinkel *et al.*, *Neurobiol. Aging*, 2004, 25: 1253). Sarnaselt avaldati NQO1 suurenenud ekspressiooni ALS-i all kannatavate patsientide seljaajus (Muiswinkel *et al.*, *Curr. Drug Targets--CNS. Neurol. Disord.*, 2005, 4:267-281) ning aktiivsetes ja kroonilistes põletikulistes lesioonides polüskleroosi all

25 kannatavate patsientide ajus (van Horssen *et al.*, *Free Radical Biol. & Med.*, 2006, 41: 311-311). Need tähelepanekud viitavad sellele, et Nrf2 rada võib neurodegeneratiivsete ja neuroinflammatoorsete haiguste puhul aktiveeruda endogeense kaitsemehhanismina. Üsna hiljuti avaldati, et Nrf2-sõltuvate geenide aktivatsiooni esilekutsumine teatavate tsüklopentanoonil baseeruvate ühenditega (NEPP) aitab võidelda ainevahetuse

30 inhibeerimise kahjulike mõjude ja ROS/RNS tootmise vastu ajus ning kaitseb neuroneid hävinemise eest *in vitro* ja *in vivo* (vt Satoh *et al.*, *PNAS*, 2006, 103(3):768-773).

[0007] Lisaks on paljudes publikatsioonides avaldatud taimset päritolu ühendites leiduvate ühendite (nn fütokemikaalid), sealhulgas  $\alpha$ -tokoferooli (E-vitamiin), lükopeeni (tomatid), resveratrooli (punased viinamarjad), sulforafaani (spargelkapsas), EGCG (roheline tee) jne neuroprotektiivseid toimeid. Ülevaate saamiseks vt Mattson ja Cheng, Trends in Neurosci., 2006, 29(11):632-639. Algselt omistati nende ühendite toime nende antioksideerivatele omadustele. Kuid kui suurem osa antioksidantidest on tõhusad üksnes suures kontsentratsioonis, siis vähemalt osa nendest ühenditest näivad avaldavat neuroprotektiivset toimet palju madalamates annustes. Esilekerkivad tõendid viitavad sellele, et need ühendid võivad avaldada neuroprotektiivseid toimeid rakkude stressireaktsiooni radade, sealhulgas Nrf2 raja aktiveerimisega, mille tulemuseks on neuroprotektiivsete geenide suurendamine. Kuid nende ühendite täpset toimemehhanismi ei tunta veel kuigi hästi.

[0008] Senini on tuvastatud rohkem kui kümme Nrf2 rada indutseerivat keemiliste ainete klassi, sealhulgas nende isotiotsüanaadid ja nende tioolilisandiga produktid, ditiokarbamaadid, samuti 1,2-ditiool-3-tioonid, trivalentsed arseeni derivaadid (näiteks fenüülarseenoksiid), raskemetallid, teatavad konjugeeritud tsükliilised ja atsükliilised polüeenid (sealhulgas porfüriinid, klorofülliinid ja klorofüll) ja lähedased dimerkaptaanid. Nendel indutseerijatel on mõned struktuurilised sarnasused. Enamasti on nad elektrofiilid ning nad kõik suudavad tioolirühmadega alküülimise, oksüdeerimise või redutseerimise teel keemiliselt reageerida, mis viitab sellele, et nende indutseerijate rakusisene sensor sisaldab tõenäoliselt ülimalt reaktiivseid (tsüsteiini) tioole. Indutseerijad võivad modifitseerida tioolrühmi erinevate mehhanismide kaudu, sealhulgas: aküülimine (Michaeli lisandiga aktseptorid, isotiotsüanaadid, kinoonid); oksüdeerimine (näiteks peroksiidid ja vesinikperoksiidid); ja otsene reageerimine tiool-/disulfiidsidemetega (näiteks lähedased ditioolid, nagu näiteks 1,2-dimerkaptopropanool, lipoiinhape). Need erinevad reaktsioonimehhanismid pakuvad rakureaktsioonidele erinevate elektrofiilsete ja oksüdeerivate stressitekitajate suhtes paindlikkust.

[0009] Trükises Kappos *et al.*, „BG00012, a novel oral fumarate is effective in patients with relapsing remitting multiple sclerosis“, SAGE JOURNALS: MULTIPLE SCLEROSIS, september 2006, 12. kd, lk 585, P325 avaldatakse 2b. faasi uuringu tulemused, mis viidi läbi kolme erineva BG00012 annuse efektiivsuse kindlaks

määramiseks: 120 mg/päevas, 360 mg/päevas ja 720 mg/päevas. Leiti, et BG00012 annuses 720 mg/päevas (240 mg tid) vähendas märkimisväärselt MRI-ga tuvastatava ajulesiooni aktiivsust RRMS patsientides.

5 **[0010]** Siin on kirjeldatud meetodeid, mis hõlmavad vähemalt ühte alljärgnevatest meetoditest:

- 1) sõelumismeetodid neuroloogilise haiguse ravimiseks vähemalt ühe uue kandidaatühendi leidmiseks;
- 2) neuroloogilise haiguse ravimiseks vähemalt ühe uue kandidaatühendi  
10 neuroprotektiivsete omaduste hindamise meetodid;
- 3) vähemalt kahe fumaarhappe derivaate sisaldava farmatseutilise koostise võrdlusmeetodid (näiteks bioekvivalentsuse võrdlemiseks);
- 4) meetodid neuroloogilise haiguse ravimiseks seda vajavale ravialusele vähemalt ühe sellise ühendi manustamise teel, mis on struktuuri poolest osaliselt sarnane DMF-i või  
15 MMF-iga; ja
- 5) meetodid neuroloogilise haiguse ravimiseks kombineeritud ravimeetodiga, mis hõlmab vähemalt ühe esimese, Nrf2 rada suurendava ühendi ja vähemalt ühe teise ühendi manustamist, mis ei suurenda Nrf2 rada.

20 **[0011]** Neuroloogiline haigus on neurodegeneratiivne haigus, nagu näiteks ALS, Parkinsoni tõbi, Alzheimeri tõbi või Huntingtoni tõbi. Käesolevas leiutises on neuroloogiline haigus polüskleroos.

**[0012]** Käesoleva leiutise meditsiiniline kasutusvaldkond hõlmab imetajale DMF-i või  
25 MMF-i suukaudset manustamist.

**[0013]** Ühes teostuses pakub käesolev leiutis polüskleroosi ravi kasutamiseks farmatseutilist koostist, kusjuures nimetatud koostis koosneb: (a) dimetüülfumaraadist (*dimethyl fumarate*, DMF) või monometüülfumaraadist (*monomethyl fumarate*, MMF) ja  
30 (b) ühest või mitmest farmatseutiliselt aktsepteeritavast abiainest, kus nimetatud koostist manustatakse polüskleroosi ravi vajavale ravialusele suukaudselt ning kus manustatava dimetüülfumaraadi või monometüülfumaraadi annus on 480 mg päevas.

**[0014]** Osades teostustes sisaldab koostis dimetüülfumaraati (DMF) ka ühte või mitut farmatseutiliselt aktsepteeritavat abiainet. Osades teostustes sisaldab koostis monometüülfumaraati (MMF) ja ühte või mitut farmatseutiliselt aktsepteeritavat abiainet. Osades teostustes manustatakse koostist tableti, suspensiooni või kapsli kujul. Osades teostustes manustatakse koostist ravialusele 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 või 200 nädalat või kauem. Osades teostustes manustatakse koostist ravialusele vähemalt 12 nädalat.

**[0015]** Veel üks käesoleva leiutise teostus pakub polüskleroosi ravis kasutamiseks dimetüülfumaraati (DMF) või monometüülfumaraati (MMF), kusjuures dimetüülfumaraat (DMF) või monometüülfumaraat (MMF) on ainuke manustatav neuroprotektiivne ühend ning kus dimetüülfumaraati (DMF) või monometüülfumaraati (MMF) manustatakse polüskleroosi ravi vajavale ravialusele annuses 480 mg päevas.

**[0016]** Osades teostustes on dimetüülfumaraat (DMF) ainuke manustatav neuroprotektiivne ühend. Osades teostustes on monometüülfumaraat (MMF) ainuke manustatav neuroprotektiivne ühend. Osades teostustes manustatakse dimetüülfumaraati (DMF) või monometüülfumaraati (MMF) tableti, suspensiooni või kapsli kujul. Osades teostustes manustatakse dimetüülfumaraati (DMF) või monometüülfumaraati (MMF) ravialusele 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 või 200 nädalat või kauem. Osades teostustes manustatakse dimetüülfumaraati (DMF) või monometüülfumaraati (MMF) ravialusele vähemalt 12 nädalat.

**[0017]** Käesoleva leiutise muid omadusi ja teostusi on kirjeldatud alljärgnevas kirjelduses ja nõudluspunktides.

### **JOONISTE LÜHIKIRJELDUS**

**[0018]** Joonisel FIG 1 on näidatud, et DMF ja MMF on kliinilise kokkupuute määradesse jäävate kontsentratsioonide juures (rakud kultuuris) Nrf2 aktiveerijad.

**[0019]** Joonisel FIG 2 on näidatud RNAi katsete tulemusi.

[0020] Joonisel FIG 3 on näidatud tõendeid Nrf2 aktiveerimise kohta DMF-i ja MMF-i poolt *in vivo*.

5 [0021] Joonisel FIG 4 on näidatud tõendeid Nrf2 aktiveerimise kohta DMF-i ja MMF-i poolt *in vivo*.

[0022] Fumaarhappe estreid, nagu näiteks DMF-i, on polüskleroosi ravimiseks välja pakutud (vt näiteks Schimrigk *et al.*, Eur. J. Neurol., 2006, 13(6):604-10; Drugs R&D, 2005, 6(4):229-30).

10

[0023] Siin on muu hulgas kirjeldatud vahendeid uue terapeutilise modaalsusega ühendite tuvastamiseks, mis on kasulikud vähemalt ühe polüneuroloogilise näidustuse puhul ja täiendavad valikuliselt muid neuroloogilise haiguse ravimiseks kasutatavaid ravimeid, sealhulgas mitmeid praegu kasutatavaid immunomodulaatoreid.

15

[0024] DMF kuulub suurde antioksideerivate molekulide rühma, mis on tuntud tsütoprotektiivsete ja põletikuvastaste omaduste poolest. Nende molekulide ühiseks omaduseks on ka Nrf2 raja aktiveerimine. Seega pakub leid, et DMF aktiveerib Nrf2 rada, koos DMF-i neuroprotektiivsete toimetega välja täiendava põhjenduse selgitada välja

20 struktuuriliselt ja/või toimemehhanismilt seotud molekule, mis võiksid eeldatavasti olla terapeutiliselt efektiivsed neuroloogiliste häirete, näiteks polüskleroosi ravis.

[0025] Teatavad mõisted määratletakse käesolevas osas; täiendavaid määratlusi esitatakse kogu kirjelduse ulatuses.

25

[0026] Mõisteid „aktiveerimine” ja „suurendamine” kasutatakse siin samatähenduslikult, kui neid kasutatakse Nrf2 rajale viitamisel.

[0027] Mõisteid „haigus” ja „häire” kasutatakse siin samatähenduslikult.

30

[0028] Mõiste „ravim neuroloogilise haiguse ravimiseks” osutab ühendile, millel on konkreetse neuroloogilise haiguse puhul terapeutiline eelis, mida on tõestatud vähemalt

ühes neuroloogilise haiguse loomamudelil või inimeste osalemisel tehtud kliinilistel uuringutel, mis on mõeldud neuroloogilise haiguse ravimiseks.

**[0029]** Mõiste „neuroproteksioon” ja selle sugulassõnad osutavad neuronaalse degeneratsiooni, sealhulgas näiteks demüelinatsiooni ja/või närvijätkete kaotuse, ja/või neuronite ja/või oligodendrotsüütide hävinemise ennetamisele või aeglustamisele. Neuroproteksioon võib toimuda mitmete mehhanismide kaudu, näiteks põletiku vähendamise, neurotroofsete faktorite, vabadest radikaalidest puhastamise kaudu jne. Siin kasutatuna käsitletakse ühendit neuroprotektiivseks, kui see (1) suurendab Nrf2 rada üle teatava künnise, ja (2) pakub neuroproteksiooni võimalikest muudest toimemehhanismidest olenemata.

**[0030]** Mõisted „ravi”, „ravimeetod”, „terapeutilised eelised” jms osutavad terapeutilistele ning profülaktilistele/ennetavatele meetmele. Ravi vajajate hulka võivad kuuluda juba konkreetse haiguse all kannatavad inimesed, aga ka inimesed, kellel on oht sellist haigust põdema hakata.

**[0031]** Mõisted „terapeutiliselt efektiivne annus” ja „terapeutiliselt efektiivne kogus” osutavad ühendi sellisele kogusele, mille tulemuseks on vähemalt ravialuse neuroloogilise häire sümptomite ennetamine või puhangu edasilükkamine või leevendamine, või soovitud bioloogilise tulemuse saavutamine, nagu näiteks neurodegeneratsiooni vähenemine (näiteks demüelinatsioon, närvijätkete kaotus ja neuronite hävinemine), või kesknärvisüsteemi rakkude põletiku vähendamine.

**[0032]** Siin on kirjeldatud testühendite neuroprotektiivsete omaduste hindamise meetodeid, sealhulgas alljärgnevat meetodeid:

- 1) sõelumismeetodid leidmaks uusi kandidaatühendeid, mis võivad olla kasulikud neuroloogilise haiguse ravimiseks;
- 2) selliste ravimite ja kandidaatide neuroprotektiivsete omaduste hindamise meetodid, mida kasutatakse või plaanitakse kasutada neuroloogilise haiguse ravimiseks;
- 3) kahe või enama fumaarhappe derivaate sisaldava farmatseutilise koostise võrdlusmeetodid (näiteks bioekvivalentsuse võrdlemiseks).



[0033] Siin kirjeldatuna võivad meetodid 1 kuni 2 hõlmata alljärgnevat:

a) raku kokkuviiimine testühendiga;

b) kindlaks määramine, kas Nrf2 rada on rakus suurendatud, ning osades teostustes viiakse täiendavalt läbi alljärgnev(ad) etapp (etapid):

5 c) kindlaks määramine, kas testühend aeglustab või ennetab demüelinatsiooni, närvijätkete kaotust ja/või neuronite hävinemist, ja/või

d) neuroloogilise haiguse puhul neurodegeneratsiooni ravimiseks kandidaadina testühendi välja valimine, kui 1) Nrf2 rada on suurendatud ja 2) demüelinatsioon, närvijätkete kaotus ja/või neuronite hävinemine on ennetatud või aeglustatud.

10

### Meetod 1

[0034] Sõelumismeetodid kandidaatühendi leidmiseks siin kirjeldatud neuroloogilise  
15 haiguse ravimiseks hõlmavad alljärgnevat:

a) raku kokkuviiimine mitme testühendiga;

b) kindlaks määramine, kas Nrf2 rada on rakus suurendatud; ja

c) mitme ühendi hulgast vähemalt ühe ühendi valimine, mis suurendab Nrf2 rada, kusjuures Nrf2 raja suurendamine vähemalt ühe valitud ühendi poolt näitab, et nimetatud  
20 vähemalt üks valitud ühend võib olla kasulik neuroloogilise haiguse ravimiseks. Näiteks võivad mitu ühendit olla esitatud kombinatoorse keemilise kogu poolt või sõelumismeetodit võib teostada kõrge võimsusega sõelumisega, nagu on kirjeldatud näiteks trükises „High-Throughput Screening in Drug Discover“y (Methods and Principles in Medicinal Chemistry), autor Jörg Hüser (toim), John Wiley & Sons (2006).

25

[0035] Ühendite kombinatoorseid kogusid on kirjeldatud näiteks ka trükises „Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries“ (Tetrahedron Organic Chemistry), autor Ian Salusbury (toim), Elsevier (1998); „Combinatorial Libraries: Synthesis, Screening and Application Potential“ (Library  
30 Binding), autor Riccardo Cortese (toim), Walter de Gruyter (1995). Ühendite kogud võivad olla näiteks kinooni kogud ja muud kogud, nagu on kirjeldatud trükises „Mittoo, Comb. Chem. & High Throughput Screen“, 2006, 9:421-423.

5 [0036] Vähemalt üks sõelutud ja/või välja valitud ühend või mitu ühendit sisaldavad vähemalt ühte ühendit, mis on valitud vähemalt ühest alljärgnevatest ühendite rühmadest: kergelt alküülivad toimeained, Michaeli lisandiga aktseptorid või ühendid, mis on metaboliseeritud Michaeli lisandiga aktseptoriteks, sealhulgas valemi I, II, III või IV kohased ühendid.

10 [0037] Vähemalt üks ühend on valitud fumaarhappe, selle soolade ja fumaarhappe derivaatide hulgast.

10

### Meetod 2

15 [0038] Samuti on siin kirjeldatud meetodeid vähemalt ühe ravimi või ravimikandidaadi neuroprotektiivsete omaduste hindamiseks vähemalt ühe neuroloogilise haiguse ravimise eesmärgil. Sellised meetodid hõlmavad alljärgnevat:

a) raku kokkuviiimine vähemalt ühe ravimi või ravimikandidaadiga, ja  
b) kindlaks määramine, kas Nrf2 rada on rakus suurendatud, kusjuures Nrf2 raja suurendamine vähemalt ühe ravimi või ravimikandidaadi poolt näitab, et nimetatud vähemalt üks ravim või ravimikandidaat on neuroloogilise haiguse all  
20 kannatava inimese ravimisel neuroprotektiivne.

[0039] Nrf2 raja suurendamine vähemalt ühe ravimi või ravimikandidaadi poolt võib näidata, et nimetatud vähemalt ühel ravimil või ravimikandidaadil on vähemalt üks toime järgnevate hulgast: demüelinatsiooni aeglustamine, närvijätkete kaotuse aeglustamine ja  
25 neuronite hävinemise kiiruse aeglustamine.

[0040] Vähemalt ühe ravimi või ravimikandidaadi hindamise meetod võib hõlmata täiendavat etappi:

30 c) demüelinatsiooni, närvijätkete kaotuse ja/või neuronite hävinemise hindamine.

[0041] Etappe a) ja c) võib teostada *in vivo* vähemalt ühes neuroloogilise haiguse mudelis, näiteks allpool kirjeldatud viisil.

[0042] Kirjeldatud meetodites, eelkõige nendes, kus neuroloogiline haigus on polüskleroos või muu demüeliniseeriv haigus, valitakse hinnatav vähemalt üks neuroloogilise haiguse ravimiseks mõeldud ravim või ravimikandidaat alljärgnevate hulgast: FTY720 (2-(4-oktüülfenüületüül)-2-aminopropaan-1,3-diool; Novartis); IL12 vastane antikeha (näiteks ABT-874; Abbott Laboratories); GSK683699 (GSK/Tanabe); NeuroVax (Immune Response Corp.; Darlington, Curr. Opin. Mol. Ther., 2005, 7(6):598-603); CCR2 vastane antikeha (näiteks MLN 1202; Millennium); interferoon  $\beta$ -1a (näiteks Avonex®; Biogen Idec);  $\alpha$ 4-integriini vastane antikeha (näiteks Tysabri®; Biogen Idec/Elan); CD20 vastane antikeha (näiteks Rituxan® (Biogen Idec/Genentech); TV 5010 (Teva); NBI-788 (Neurocrine); MBP8298 (BioMS (vt Warren *et al.*, Eur. J. Neurol., 2006, 13(8):887-95); Mylinax (suukaudne kladribiin; 2-klorodeoksüadenosiin; Serono/IVAX); teriflunomiid ((Z)-2-tsüano-N-(4-(trifluorometüül)fenüül)-3-hüdroksübut-2-enamiid; Sanofi-Aventis); temsiroliimus (Wyeth); lankvinimood (5-kloro-N-etüül-1,2-dihüdro-4-hüdroksü-1-metüül-2-oko-N-fenüülkinoliin-3-karboksamiid; Active Biotech/Teva); ja interferoon tau (Tauferon; Pepgen).

[0043] Vähemalt üks hinnatud ravim või ravimikandidaat sisaldab vähemalt ühte ühendit, mis on valitud vähemalt ühest klassist, mis on valitud kergelt alküülivate toimeainete, Michaeli lisandiga aktseptorite ja ühendite hulgast, mis on metaboliseeritud Michaeli lisandiga aktseptoriteks, sealhulgas valemi I, II, III või IV kohased ühendid.

[0044] Ühend võib olla fumaarhape, selle sool või fumaarhappe derivaat.

### 25 Meetod 3

[0045] Samuti on kirjeldatud vähemalt kahe farmatseutilise koostise võrdlusmeetodeid (näiteks bioekvivalentsuse võrdlemiseks). Sellised meetodid hõlmavad alljärgnevat:

- a) raku kokkuviiimine vähemalt ühe esimese koostisega, mis sisaldab testühendit;
- 30 b) rakus testühendi poolt suurendatud Nrf2 raja taseme võrdlemine vähemalt ühe teise koostisega („võrdluskoostis”), mis sisaldab DMF-i, MMF-i või mõlemat, töödeldud rakus Nrf2 raja suurendamise vastava tasemega.

**[0046]** Põhilised erinevused suurendamise tasemetes vähemalt ühe esimese ja vähemalt ühe teise koostise poolt võivad näidata, et nimetatud koostised ei ole bioekvivalentsed.

5 **[0047]** Testühend võib olla fumaarhape, selle sool, fumaarhappe derivaat või nende segu. Esimene koostis võib sisaldada vähemalt ühte DMF-i ja MMF-i hulgast või nii DMF-i kui ka MMF-i. Vähemalt ühe esimese koostise annus ja/või formulatsioon võib erineda vähemalt ühe teise koostise annusest ja/või formulatsioonist. Nimetatud vähemalt üks esimene koostis võib olla kontrollitud vabanemisega koostis, nagu näiteks koostised, mida on kirjeldatud dokumendis WO 2006/037342.

10

**[0048]** Meetod võib lisaks hõlmata täiendavat etappi:

c) vähemalt ühe esimese ja vähemalt ühe teise koostise vähemalt ühe farmakokineetilise parameetri võrdlemine.

15

**[0049]** Farmakokineetilised parameetrid ja meetodid nende hindamiseks on hästi tuntud ja neid on kirjeldatud näiteks trükises „Pharmacokinetics“, 2. trükk (Drugs and the Pharmaceutical Sciences), autorid Milo Gibaldi *et al.* (toim), Informa Healthcare (1982). Selliste farmakokineetiliste parameetrite hulka, mida saab hinnata, kuuluvad seerumi poolväärtusaeg, kliirens ja mahu jaotus.

20

**[0050]** Vähemalt ühe esimese ja vähemalt ühe teise koostise tunduvalt erinev farmakokineetiline parameeter võib / erinevad farmakokineetilised parameetrid võivad näidata, et nimetatud koostised ei ole bioekvivalentsed.

25

**[0051]** Hinnatav testühend võib olla kergelt alküüliv toimeaine ja konkreetsemalt Michaeli lisandiga aktseptor või ühend, mis on metaboliseeritud Michaeli lisandiga aktseptor.

30

**[0052]** Testühend võib olla fumaarhape või selle sool või fumaarhappe derivaat.

**[0053]** Samuti on kirjeldatud meetodeid imetaja ravimiseks, kellel on neuroloogiline haigus või kellel on soodumus selle arenemiseks, sealhulgas alljärgnevaid meetodeid:

1) meetodid neuroloogilise haiguse ravimiseks seda vajavale ravialusele vähemalt ühe sellise ühendi manustamisega, mis on struktuuri poolest osaliselt sarnane DMF-i või MMF-iga (sealhulgas ühendid, mis on valitud eespool kirjeldatud meetodeid 1 kuni 3 kasutades); ja

- 5 2) meetodid neuroloogilise häire ravimiseks kombineeritud ravimeetodiga, mis hõlmab ühe esimese ühendi manustamist, mis ei suurenda Nrf2 rada, ja teise ühendi manustamist, mis suurendab Nrf2 rada.

#### 10 **Meetod 4**

[0054] Samuti pakutakse kasutusvaldkonda polüskleroosi ravimiseks seda vajavale ravialusele DMF-i või MMF-i manustamise teel.

- 15 [0055] Kasutusvaldkond hõlmab DMF-i või MMF-i suukaudset manustamist annuses 480 mg päevas.

- [0056] Meditsiiniline kasutusvaldkond hõlmab neurodegeneratsiooni (konkreetsemalt näiteks demüelinatsiooni, närvijätkete kaotuse ja/või neuronite hävinemise) aeglustamist või ennetamist seda vajava ravialuse puhul, manustades DMF-i või MMF-i ajavahemiku jooksul, mis on piisav selleks, et vähemalt kas aeglustada või ennetada demüelinatsiooni, aeglustada või ennetada närvijätkete kaotust või aeglustada või ennetada neuronite hävinemist näiteks vähemalt 30%, 50%, 100% või rohkem üle kontrollühendi tulemuste ajavahemiku jooksul, mis on vähemalt 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 või 200 nädalat või
- 25 pikem.

#### **Meetod 5**

- 30 [0057] Samuti on kirjeldatud kasutusvaldkonda neuroloogilise haiguse all kannatava imetaja ravimiseks kombineeritud ravimeetodit kasutades. Selline kasutusvaldkond hõlmab alljärgnevat:

- a) imetajale vähemalt ühe esimese ühendi, mis suurendab Nrf2 rada, manustamist terapeutiliselt efektiivses koguses, ja
- b) vähemalt ühe teise ühendi, mis ei suurenda Nrf2 rada, manustamist terapeutiliselt efektiivses koguses.

5

**[0058]** Etapis (a) kasutatud vähemalt üks esimene ühend võib olla valemi I, II, III või IV kohane ühend, näiteks DMF või MMF; ja etapis (b) kasutatud vähemalt üks teine ühend võib olla immunosupressiivne või immunomodulaatorne ühend, mis ei suurenda Nrf2 rada (näiteks 30%, 50%, 100% võrra rohkem kui kontrollühend).

10

**[0059]** Siin kirjeldatud kasutusvaldkond hõlmab imetajale terapeutiliselt efektiivses koguses valemi I, II, III või IV kohase ühendi manustamist.

15

**[0060]** Siin kirjeldatud meetodis 5 võib vähemalt ühte esimest ühendit ja vähemalt ühte teist ühendit manustada korraga (eraldi koostistena või segatud koostisena) või järjestikuste kattuvate või mittekattuvate intervallide järel. Järjestikuse manustamise korral võib vähemalt ühte esimest ühendit ja vähemalt ühte teist ühendit manustada mistahes järjekorras. Kattuva intervalli pikkus on näiteks rohkem kui 2, 4, 6, 12, 24 või 48 nädalat.

20

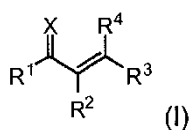
**[0061]** Michaeli lisandiga aktseptorid hõlmavad üldiselt olefiine või atsetüleene, mis on konjugeeritud elektrone loovutava rühma külge, milleks on näiteks karbonüüli sisaldavad rühmad, tiokarbonüüli sisaldavad rühmad, tsüano-, sulfonüül-, sulfoonamiid-, amiid-, formüül-, keto- ja nitrorühmad. Karbonüülrühmade näidete hulka kuuluvad karboksüülhappe estrid ja karboksüülhape.

25

**[0062]** Kirjeldatud meetodites valitakse vähemalt üks sõelutav, tuvastatav, hinnatav või neuroloogilise häire ravimiseks kasutatav ühend kergelt alküüliva toimeaine, Michaeli lisandiga aktseptori ja ühendi hulgast, mis on metaboliseeritud Michaeli lisandiga aktseptoriks.

30

**[0063]** Siin kirjeldatu kohaselt võib Michaeli lisandiga aktseptoril olla valemi I kohane struktuur:



või selle farmatseutiliselt aktsepteeritav sool, kus:

X on O; S; C(R)(C<sub>1-12</sub>)alküül-; või C(R)(C<sub>2-12</sub>)alkenüül-, kus R on H, (C<sub>1-12</sub>)alküül- või (C<sub>2-12</sub>)alkenüül-;

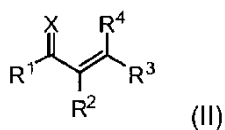
- 5 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> ja R<sup>4</sup> on üksteisest sõltumatult valitud alljärgnevate rühmade hulgast: H; OH; O<sup>-</sup>; CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub><sup>-</sup>; SH; S<sup>-</sup>; SO<sub>2</sub>H, SO<sub>2</sub><sup>-</sup>; (C<sub>1-24</sub>)alküül-; (C<sub>1-24</sub>)alkenüül-; (C<sub>6-50</sub>)arüül-, CO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alküül-; SO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alküül-; CO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alkenüül-; SO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alkenüül-; CO<sub>2</sub>Y, kus Y on psoraleen-9-üül-, retinüül-, alfa-tokoferüül-, kaltsiferüül-, kortikostreoid-21-üül- või monosahhariid-ω-üül-; (C<sub>1-24</sub>)alkoksü-; (C<sub>1-24</sub>)alkenüüloksü-; (C<sub>6-50</sub>)arüüloksü-;
- 10 (C<sub>1-24</sub>)alküültio-; (C<sub>1-24</sub>)alkenüültio-; (C<sub>6-50</sub>)arüültio-, amino-; amiid-; arüülalküül-; tsüano-; nitro-; sulfonüül-; sulfoksiid-; sulfoonamiid-; formüül-; keto-; ning D ja L on looduslikud või sünteetilised aminohapped; või kus ükskõik millised kaks X, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> ja R<sup>3</sup>-st, ja R<sup>4</sup> võivad olla ühendatud tsüklilise fragmendi moodustamiseks; ning kus alküül-, alkoskü-, alkenüül-, alkenüüloksü-, arüül- ja arüüloksürühmad võivad valikuliselt olla
- 15 asendatud vähemalt ühe rühmaga, mis on valitud halogeeni (F, Cl, Br või I), OH, (C<sub>1-4</sub>)alkoksü-, nitro- ja tsüanorühma hulgast.

**[0064]** Siin kirjeldatu kohaselt võib vähemalt ühel Michaeli lisandiga aktseptoril olla valemi I kohane struktuur alljärgnevatel tingimustel:

- 20 R<sup>1</sup> on valitud alljärgnevate rühmade hulgast: H; OH; O<sup>-</sup>; CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub><sup>-</sup>; SH; S<sup>-</sup>; SO<sub>2</sub>H, SO<sub>2</sub><sup>-</sup>; (C<sub>1-24</sub>)alküül-; (C<sub>1-24</sub>)alkenüül-; (C<sub>6-50</sub>)arüül-; CO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alküül-; SO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alküül-; CO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alkenüül-; SO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alkenüül-; CO<sub>2</sub>Y, kus Y on psoraleen-9-üül-, retinüül-, alfa-tokoferüül-, kaltsiferüül-, kortikostreoid-21-üül- või monosahhariid-ω-üül-; (C<sub>1-24</sub>)alkoksü-; (C<sub>1-24</sub>)alkenüüloksü-; (C<sub>6-50</sub>)arüüloksü-; (C<sub>1-24</sub>)alküültio-;
- 25 (C<sub>1-24</sub>)alkenüültio-; (C<sub>6-50</sub>)arüültio-; arüülalküül-; amino-; amiid-; tsüano-; nitro-; sulfonüül-; sulfoksiid-; sulfoonamiid-; formüül-; keto-; ning D või L on looduslikud või sünteetilised aminohapped; ning kus alküül-, alkoskü-, alkenüül-, alküleenoksü-, arüül- ja arüüloksürühmad võivad valikuliselt olla asendatud vähemalt ühe rühmaga, mis on valitud halogeeni (F, Cl, Br või I), OH, (C<sub>1-4</sub>)alkoksü-, nitro- ja tsüanorühma hulgast;
- 30 R<sup>2</sup> on valitud alljärgnevate rühmade hulgast: H; CO<sub>2</sub>H; CO<sub>2</sub><sup>-</sup>; SO<sub>2</sub>H; SO<sub>2</sub><sup>-</sup>; (C<sub>1-24</sub>)alküül-; (C<sub>1-24</sub>)alkenüül-; (C<sub>6-50</sub>)arüül-; CO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alküül-; SO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alküül-; CO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alkenüül-;

- SO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alkenüül-; CO<sub>2</sub>Y, kus Y on psoraleen-9-üül-, retinüül-, alfa-tokoferüül-, kaltsiferüül-, kortikostreoid-21-üül- või monosahhariid-ω-üül-; (C<sub>1-24</sub>)alkoksü-; (C<sub>1-24</sub>)alkenüüloksü-; (C<sub>6-50</sub>)arüüloksü-; (C<sub>1-24</sub>)alküültio-; (C<sub>1-24</sub>)alkenüültio-; (C<sub>6-50</sub>)arüültio-; amiid-; arüülalküül-; tsüano-; nitro-; sulfonüül-; sulfoksiid-; sulfoonamiid-; formüül-; keto-; ning D või L on looduslikud või sünteetilised aminohapped; kus alküül-, alkoskü-, alkenüül-, alküleenoksü-, arüül- ja arüüloksürühmad võivad valikuliselt olla asendatud vähemalt ühe rühmaga, mis on valitud halogeeni (F, Cl, Br või I), OH, (C<sub>1-4</sub>)alkoksü-, nitro- ja tsüanorühma hulgast; ja
- R<sup>3</sup> ja R<sup>4</sup> on üksteisest sõltumatult valitud alljärgnevate rühmade hulgast: H; CO<sub>2</sub>H; CO<sub>2</sub><sup>-</sup>; SO<sub>2</sub>H; SO<sub>2</sub><sup>-</sup>; (C<sub>1-24</sub>)alküül-; (C<sub>1-24</sub>)alkenüül-; (C<sub>6-50</sub>)arüül-; CO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alküül-; SO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alküül-; CO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alkenüül-; SO<sub>2</sub>(C<sub>1-24</sub>)alkenüül-; CO<sub>2</sub>Y, kus Y on psoraleen-9-üül-, retinüül-, alfa-tokoferüül-, kaltsiferüül-, kortikostreoid-21-üül- või monosahhariid-ω-üül-; (C<sub>1-24</sub>)alkoksü-; (C<sub>1-24</sub>)alkenüüloksü-; (C<sub>6-50</sub>)arüüloksü-; (C<sub>1-24</sub>)alküültio-; (C<sub>1-24</sub>)alkenüültio-; (C<sub>6-50</sub>)arüültio-; amiid-; arüülalküül-; tsüano-; nitro-; sulfonüül-; sulfoksiid-; sulfoonamiid-; formüül-; ja keto-; kus alküül-, alkoskü-, alkenüül-, alküleenoksü-, arüül- ja arüüloksürühmad võivad valikuliselt olla asendatud vähemalt ühe rühmaga, mis on valitud halogeeni (F, Cl, Br või I), OH, (C<sub>1-4</sub>)alkoksü-, nitro- ja tsüanorühma hulgast.

- 20 **[0065]** Siin kirjeldatu kohaselt võib vähemalt ühel Michaeli lisandiga aktseptoril olla valemi II kohane struktuur:



või selle farmatseutiliselt aktsepteeritav sool, kus:

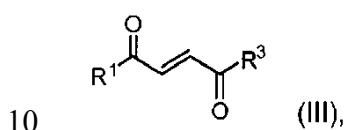
- X on valitud rühmast, kuhu kuuluvad O; S; C(R)(C<sub>1-12</sub>)alküül-; ja C(R)(C<sub>2-12</sub>)alkenüül-, kus R on valitud rühmast, kuhu kuuluvad H, (C<sub>1-12</sub>)alküül-; ja (C<sub>2-12</sub>)alkenüül-; ja R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> ja R<sup>4</sup> on üksteisest sõltumatult valitud alljärgnevate rühmade hulgast: H; OH; O<sup>-</sup>; CO<sub>2</sub>H; CO<sub>2</sub><sup>-</sup>; (C<sub>1-12</sub>)alküül-; (C<sub>1-12</sub>)alkenüül-; ja CO<sub>2</sub>(C<sub>1-12</sub>)alküül-; või mistahes kahte X, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> ja R<sup>3</sup> hulgast võib ühendada tsüklilise fragmendi moodustamiseks.



**[0066]** Siin kirjeldatud valemite I–IV kohastes ühendites võib farmatseutiliselt aktsepteeritav sool olla metalli (M) katiooni sool, kus M võib olla leelismetall, leelismuldmetall või siirdemetall, nagu näiteks Li, Na, K, Ca, Zn, Sr, Mg, Fe või Mn.

- 5 **[0067]** Kirjeldatud meetodites sisaldavad valemi I kohased ühendid fumaarhapet, selle soolasid ja fumaarhappe derivaate.

**[0068]** Siin kirjeldatu kohaselt võib vähemalt ühel valemi I kohasel ühendil olla valemi III kohane struktuur:

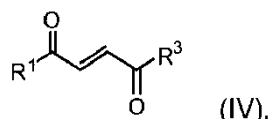


või selle farmatseutiliselt aktsepteeritav sool, kus:

- $R^1$  ja  $R^3$  on üksteisest sõltumatult valitud rühmade hulgast, kuhu kuuluvad OH; O<sup>-</sup>; (C<sub>1-24</sub>)alkoksü-; (C<sub>1-24</sub>)alkenüüloksü-; (C<sub>6-50</sub>)arüüloksü-; psoraleen-9-üüloksü-; retinüüloksü-; alfa-tokoferooloksü-; kaltsiferoooloksü-; kortikosteroid-21-üüloksü-; 15 monosahhariid- $\omega$ -üüloksü-; amino-; ja D või L on looduslik või sünteetiline aminohape; ja kus vähemalt üks (C<sub>1-24</sub>)alkoksü-; (C<sub>1-24</sub>)alkenüüloksü-; ja (C<sub>6-50</sub>)arüüloksürühmadest võib olla valikuliselt asendatud vähemalt ühe rühmaga, mis on valitud halogeeni (F, Cl, Br, või I), OH, (C<sub>1-4</sub>)alkoksü-, nitro- ja tsüanorühma hulgast.

- 20 **[0069]** Ühendeid, kus vähemalt üks  $R^1$  ja  $R^3$  hulgast on saadud looduslikust või sünteetilisest D- või L-aminohapest, on kirjeldatud USA patenditaotlustes seeria nr 10/433,295, punktid 10 kuni 11 ja 18-28, ja 11 /421 083.

- 25 **[0070]** Siin kirjeldatu kohaselt võib valemi (I) kohasel ühendil olla valemi IV kohane struktuur:



või selle farmatseutiliselt aktsepteeritav sool, kus:

- $R^1$  ja  $R^3$  on üksteisest sõltumatult valitud rühmade hulgast, kuhu kuuluvad OH; O<sup>-</sup>; (C<sub>1-24</sub>)alkoksü-; allüüloksü-; vinüüloksü-; (C<sub>6-50</sub>)arüüloksü-; psoraleen-9-üüloksü-; 30 retinüüloksü-; alfa-tokoferooloksü-; kaltsiferoooloksü-; kortikosteroid-21-üüloksü-;

monosahhariid- $\omega$ -üüloksü-; amino-; ja D või L on looduslik või sünteetiline aminohape; ja kus vähemalt üks (C<sub>1-24</sub>)alkoksü-; allüüloksü-; vinüüloksü-; ja (C<sub>6-50</sub>)arüüloksürühmadest võib olla valikuliselt asendatud vähemalt ühe rühmaga, mis on valitud Cl, F, I, Br, OH, (C<sub>1-4</sub>)alkoksü-, nitro- ja tsüanorühma hulgast.

5

**[0071]** Siin kirjeldatud „fumaarhappe derivaat” on valitud valemi III kohaste ühendite, valemi IV kohaste ühendite ja alljärgneva hulgast:

1) fumaarhappe amiidid, mis on saadud looduslikest või sünteetilistest D- või L-aminohapetest, nagu on kirjeldatud USA patenditaotlustes seeria nr 10/433,295, punktid 10 kuni 11 ja 18-28, ja 11/421 083.

2) karbotsükliline või oksatsükliline fumaarhappe oligomeer, nagu on kirjeldatud USA patenditaotluses seeria nr 10/511 564, punktid 15-44; ja

3) fumaarhappe derivaat glütserool või alkaandiool või polüool, nagu on kirjeldatud USA patentides nr 4 851 439, 5 149 695, 5 451 667, tulpades 2-4.

15

**[0072]** Käesolevas leiutises on „fumaarhappe derivaat” DMF või MMF.

**[0073]** Kirjeldatud meetodites ei ole vähemalt üks sõelutav, hinnatav, võrreldav või neuroloogilise häire ravimiseks kasutatav ühend fumaarhappe või selle sool või fumaarhappe derivaat (näiteks DMF või MMF).

20

**[0074]** Nrf2 (nukleaarfaktoriga E2 seotud faktor 2; Nrf2 järjestust vt juurdepääsunumbri AAB32188 alt) on transkriptsioonifaktor, mis oksüdatiivse stressi kaudu aktiveerimisel seondub antioksidatiivse vastuselemendiga (*antioxidant response element*, ARE) ja aktiveerib Nrf2-reguleeritud geenide transkriptsiooni. Seda rada on hästi iseloomustatud seoses selle rolliga heptaatilises detoksifikatsioonis ja kemopreventsioonis geeniekspressiooni 2. faasi aktiveerimise kaudu. ARE-reguleeritud geenid võivad samuti aidata kaasa redoks-homeostaasi säilitamisele, toimides endogeensete antioksideerivate süsteemidena. Praegu sisaldab Nrf2-reguleeritud geenide nimekiri üle 200 geeni, mis kodeerivad detoksifikatsiooni ja antioksidatiivse vastusega seotud valku ja ensüümi (Kwak *et al.*, J. Biol. Chem., 2003, 278:8135), nagu näiteks HO-1, ferritiin, glutatioon-peroksidaas, glutatioon-S-transferaasid (GST-d), NAD(P)H:kinooni oksidoreduktaasid, praegu tuntud nimetusega nikotiinamiidkinooni oksidoreduktaas 1 (NQO1; EC 1.6.99.2;

25  
30

samuti tuntud kui DT diaforaasi ja menadiooni reduktaas), NQO2, g-glutamüültsüsteiini süntaas (g-GCS), glükoronosüültransferaas, ferritiin, ja heemi oksagenaas-1 (HO-1), samuti mistahes dokumendi Chen & Kunsch, „Curr. Pharm. Designs“, 2004, 10:879-891; Lee *et al.*, J. Biol. Chem., 2003, 278(14):12029-38, ja Kwak, *supra*. tabelis 1 loetletud ensüümid ja valgud.

**[0075]** Vastavalt sellele võib siin kirjeldatud meetodites vähemalt üks Nrf2-reguleeritud geen, mida kasutatakse Nrf2 raja aktiveerimise hindamiseks, olla valitud detoksifikatsiooni 2. faasi ensüümi, antioksideeriva ensüümi, NADPH-d genereeriva süsteemi ensüümi ja Nrf2 enda hulgast. 2. faasi detoksifikatsiooni ensüümide näidete hulka kuuluvad NQO1, NQO2, GST-Ya, GST-pi, GST-teeta 2, GST-mu (1,2,3), mikrosomaalne GST 3, katalüütiline  $\gamma$ -GCS, reguleeriv GCS, mikrosomaalne epoksiidi hüdrolaas, UDP-glükuronosüültransferaas, transaldolaas, transketolaas ja ravimit metaboliseeriv ensüüm. Antioksideerivate ensüümide näidete hulka kuuluvad HO-1, ferritiin (L), glutatioonreduktaas, glutatioonperoksidaas, metallotioniin I, tioredoksiin, tioredoksiinreduktaas, peroksiredoksiin MSP23, Cu/Zn superoksiid-dismutaas ja katalaas. NADPH-d genereeriva süsteemi ensüümide näidete hulka kuuluvad malik-ensüüm, UDP-glükoosdehüdrogenaas, malaatoksidoreduktaas ja glükoos-6-fosfaatdehüdrogenaas.

**[0076]** Antioksideeriv vastuselement (ARE, ka elektrofiilne vastuselement (EpRE), GRE1, ARE4 ja StREb) on *cis*-toimiv DNA reguleeriv element nukleotiidide põhijärjestusega 5'-TGA(C/T/G)NNNGC-3' (SEQ ID NO:1) (Rushmore *et al.*, J. Biol. Chem., 1991, 266(18):11632-9; vt ka Nioi *et al.*, Mutation Res., 2004, 555:14-171).

**[0077]** Vastavalt sellele võib ARE DNA-järjestus, millega Nrf2 seondub (olenevalt sellest, kas esimene on endogeense geeni või kunstliku skeemi osa) sisaldada ARE põhijärjestust TGA(C/T/G)NNNGC (SEQ ID NO:2) või ARE kokkulepitud järjestust (G/A)TGA(C/T/G)NNNGC(A/G) (SEQ ID NO:3). ARE-järjestus võib sisaldada ükskõik millist tabelis 1 välja toodud „minimaalse parandaja” järjestust.

30

**[0078]** ARE-järjestus võib lisaks sisaldada vähemalt ühte vastavat 5'- ja 3'-USR järjestust, mis on välja toodud tabelis 1. Osades teostustes sisaldab ARE järjestust

GTGANNNNGCA (SEQ ID NO:4) või veelgi konkreetsemalt selle hiire (NNNN=gtcg) või inimese (NNNN=ctca) versioone.

Tabel 1

Liik	Geen	Element	5'-USR	Minimaalne parandaja	3'-USR	SEQ ID NO
hiir	nqo1	ARE	agTCaCa	GTGAgctcgGCA	aaatct	SEQ ID NO:5
rott	NQO1	ARE	agTCaCa	GTGACttgGCA	aaatct	SEQ ID NO:6
inimene	NQO1	ARE	agTCaCa	GTGACtcaGCA	gaatct	SEQ ID NO:7
hiir	gsta1	EpRE	gcTAAtg	GTGACaaaGCA	actttc	SEQ ID NO:8
rott	GSTA2	ARE	gcTAAtg	GTGACaaaGCA	actttc	SEQ ID NO:9
hiir	gsta3	ARE	ctcAggc	ATGACattGCA	tttttc	SEQ ID NO:10
rott	GSTP1	GPE1	agTCAct	ATGATtcaGCA	acaaaa	SEQ ID NO:11
inimene	GCLC	ARE4	ccTCccc	GTGACtcaGCG	ctttgt	SEQ ID NO:12
inimene	GCLM	EpRE	gaagAca	ATGACtaaGCA	gaaatc	SEQ ID NO:13
hiir	ho1	StREb	cccAAcc	ATGACacaGCA	taaaag	SEQ ID NO:14
ARE põhijärjestus			TGACnnnGC			SEQ ID NO:15
ARE kokkulepitud järjestus			<p> <u>TA</u>Ann <u>ATGAC</u>nnn<u>GCA</u> <u>aaa</u>            C G T G tttt         </p>			SED ID NO:16

5

[0079] Nrf2 praegune mudel toimib järgmiselt. Baastingimustel kelaaditakse Nrf2 tsütoplasmas aktiiniga seotud Kelchi-laadseks ECH-seotud valgus 1 (Keap1; juurdepääsunumber NP\_987096 inimese Keap1 puhul), Cullin3 ubikvitiini ligaasi adaptorvalgus. Konkreetsemalt arvatakse, et Nrf2 N-otsa domeen (Neh2 domeen) reageerib Keap1 Kelchi-laadse C-otsa domeeniga. Ksenobiootikumide või oksüdatiivse stressi reaktsioonina vabaneb Nrf2 Keap1/Nrf2 kompleksist, soodustades seeläbi Nrf2 nukleaarset translokatsiooni ja sellega kaasnevat ARE-vahendatud geeni transkriptsiooni aktiveerimist. Keap1 omakorda nõuab sidumist Cullin3-ga, mis on kinnitusvalk, mis paigutab Keap1 ja selle substraadi E3 ligaasi Rbx1 lähedusse, võimaldades substraadi

10

- (Nrf2) polü-ubikvinaatsiooni ja on seega suunatud degradatsioonile. Täpsest mehhanismist, kuidas Keap1/Nrf2 kompleks oksüdatiivset stressi tajub, ei ole täielikult aru saadud. Inimese Keap1 sisaldab 25 tsüsteiinijääki, mis oletatavasti toimivad oksüdatiivse stressi sensoritena; arvatakse, et 9 nendest on ülimalt reaktiivsed (Dinkova-Kostova *et al.*, PNAS, 2005, 102(12):4584-9). Oletatakse (kuid käesoleva leiutise eesmärkidel sellele ei toetuta), et tsüsteiinide alküülimine toob kaasa konformatsioonilise muutuse, mille tulemuseks on Nrf2 vabastamine Nrf2/Keap1/Cullin3 kompleksidest, millele järgneb vabastatud Nrf2 nukleaarne translokatsioon.
- 5
- 10 **[0080]** Siin kirjeldatud meetodid 1–3 hõlmavad raku ühendamist vähemalt ühe testühendiga ja kindlaks määramist, kas Nrf2 rada on rakus suurendatud. Sellistes meetodites näitab Nrf2 raja suurendamine üle künnise (näiteks vähemalt 30%, 50%, 100%, 200%, 500% üle kontrollühendi), et vähemalt ühel ühendil on teatavad bioloogilised omadused, mis on kasulikud neuroloogilise haiguse ravimisel (näiteks
- 15 neuroprotektiivsed omadused).
- [0081]** Ühendi suutlikkust aktiveerida Nrf2 rada saab kindlaks määrata ühe või mitme *in vitro* ja *in vivo* analüüsimeetodiga, näiteks allpool kirjeldatud analüüsimeetodeid järgides.
- 20 **[0082]** i) *Nrf2* ekspressiooni tasemed – Nrf2 geeni promootorpiirkonna järjestuse (-1065 kuni -35) on avaldanud näiteks Chan *et al.*, PNAS, 1996, 93:13943-13948. Kasutada võib kunstlikult koostatud ekspressiooniskeemi, mis sisaldab Nrf2 promootorelementi ja kunstlikku reportergeeni. Alternatiivselt võib Nrf2 mRNA ekspressiooni tasemete kindlaks määramiseks kasutada PCR-i või *Northern blot*-analüüsi või Nrf2 valgutasemete
- 25 kindlaks määramiseks *Western blot*-analüüsi. Nrf2 ekspressioonitasemete kindlaks määramise protseduuride näiteid on kirjeldanud Kwak *et al.*, Mol. Cell. Biol. 2002, 22(9):2883-2892 ja Kwak *et al.*, Mol. Med., 2001, 7:135-145. Nrf2 vastaseid antikehi saab valmistada valdkonnas tuntud meetoditega ja need on kaubanduslikult kättesaadavad, näiteks ettevõttest StressGen. Samuti on osades teostustes Nrf2 rada aktiveeritud selliselt,
- 30 et Nrf2 ekspressioonitasemed on mitteaktiveeritud olekuga võrreldes suurenenud näiteks vähemalt 30%, 50%, 100%, 200%, 500% või rohkem.

- 5 [0083] ii) *Nrf2* subtsellulaarne lokaliseerimine ja/või nukleaarne translokatsioon – selline analüüsimeetod hõlmab rakkude värvimist või tsütoplasma analüüsi nukleaarse raku ekstraktide suhtes. Näiteks saab valmistada Nrf2 rohelise fluorestsentsvalguga (*green fluorescence protein*, GFP) fusioonvalguga konstruktsiooni ja sisestada selle rakkudesse ning visualiseerida, nagu on kirjeldanud näiteks Kraft *et al.*, *J. Neurosci.*, 2004, 24, 1101-1112; ja Satoh *et al.*, *PNAS*, 2006, 103(3):768-773. Samuti on osades teostustes Nrf2 rada aktiveeritud selliselt, et tsütoplasma ja nukleaarse Nrf2 vaheline suhe on mitteaktiveeritud olekuga võrreldes suurenenud näiteks vähemalt 30%, 50%, 100%, 200%, 500% või rohkem.
- 10
- 15 [0084] iii) Ühe või mitme *Nrf2* kontrolli all oleva geeni ekspressioonitasemed ja/või aktiivsus – selliste Nrf2 kontrolli all olevate geenide hulka kuuluvad endogeensed või kunstlikult sisestatud reportergeenid rakkudesse sisestatud reporterkonstruktsioonides. Näiteks saab endogeenselt või eksogeenselt sisestatud NQO1 ekspressioonitasemeid määrata kindlaks näidetes kirjeldatud viisil. Alternatiivselt saab reportergeeni konstruktsiooni ühe või mitme reportergeeniga (näiteks lutsiferaas või GFP) toimivalt seotud ARE asukohaga teostada viisil, mida on kirjeldanud näiteks Satoh *et al.*, *PNAS*, 2006, 103(3):768-773. Nrf2 indutseeritud geeniproducti ekspressioonitasemeid saab mõõta valguga (näiteks *Western blot*-analüüsi või ensümaatilise aktiivsuse analüüsiga) või mRNA tasemel (näiteks PCR-iga). Meetodeid RT-PCT teostamiseks on kirjeldanud näiteks Calabrese *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, 2005, 79:509-521 HO-1 puhul, Wierinckx *et al.*, *J. Neuroimmunology*, 2005, 166:132-143 NQO1 puhul. Meetodites NQO1 ensümaatilise aktiivsuse mõõtmiseks kasutatakse substraadina näiteks menadiooni, nagu on kirjeldanud Dinkova-Kostova *et al.*, *PNAS*, 2001, 98:3404-09 või Prochaska *et al.*, *Anal. Biochem.*, 1988, 169:328-336. Meetodites GST aktiivsuse mõõtmiseks kasutatakse substraadina näiteks 1-kloro-2,4-dinitrobenseeni, nagu on kirjeldanud Ramos-Gomez *et al.*, *J. Neurosci.*, 2004, 24(5):1101-1112 ja Habig *et al.*, 1974, *J. Biol. Chem.*, 219, 7130-7139. Meetodeid HO-1 aktiivsuse mõõtmiseks on kirjeldanud näiteks Calabrese *et al.*, 2005, *J. Neurosci. Res.*, 79:509-521. Samuti saab Nrf2 rada aktiveerida selliselt, et valmistatud geeni ekspressioonitasemed ja/või aktiivsus suurenevad mitteaktiveeritud olekuga võrreldes näiteks vähemalt 30%, 50%, 100%, 200%, 500% või rohkem.
- 20
- 25
- 30

**[0085]** iv) *Nrf2 ARE-ga seondumise tasemed* – näiteks võib kasutada selliseid analüüse nagu elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüsid (EMSA) ja kromatiini immunosadestamise (ChIP) analüüsid, nagu on kirjeldanud näiteks Satoh *et al.*, PNAS, 2006, 103(3):768-773 ja Kwak *et al.*, Mol. Cell Biol., 2002, 22(9):2883-2892. Samuti saab  
5 Nrf2 rada aktiveerida selliselt, et ARE-ga seonduva Nrf2 tase suureneb mitteaktiveeritud olekuga võrreldes näiteks vähemalt 30%, 50%, 100%, 200%, 500% või rohkem.

**[0086]** v) *Nrf2/Keap1 komplekside stabiilsus* – selline analüüs võib hõlmata Nrf2 ja/või Keap1 või muu Nrf2/Keap1-seotud valkudega komplekside immunosadestamise analüüsi,  
10 mida on kirjeldanud näiteks Satoh *et al.*, PNAS, 2006, 103(3):768-773. Keap1 vastaseid antikehasid saab valmistada valdkonnas tuntud meetodeid kasutades ja need on kaubanduslikult kättesaadavad näiteks ettevõttest Santa Cruz Biotechnology. Samuti saab Nrf2 rada aktiveerida selliselt, et Nrf1/Keap1 komplekside stabiilsus suureneb mitteaktiveeritud olekuga võrreldes näiteks vähemalt 30%, 50%, 100%, 200%, 500% või  
15 rohkem.

**[0087]** vi) *Keap1 ja muude Nrf1/Keap1-seotud valkude modifitseerimine (näiteks alküülimise tasemete modifitseerimine)* – selliste analüüside hulka võib kuuluda immunosadestatud Keap1 mass-spektromeetriline analüüs, kus kasutatakse tehnikaid,  
20 mida on kirjeldanud näiteks Dinkova-Kostova *et al.*, PNAS, 2005, 102(12):4584-9 ja Gao *et al.*, J. Biol. Chem., (veebiväljaanne, käsikiri M607622200). Nrf2 rada saab aktiveerida selliselt, et Keap1 ja muude Nrf2/Keap1-seotud valkude tase suureneb mitteaktiveeritud olekuga võrreldes näiteks vähemalt 30%, 50%, 100%, 200%, 500% või rohkem.

25 **[0088]** Ühendi alküülimisvõimet saab hinnata rekombinantset Keap1 kasutades konkureeriva reaktsiooniga 5,5'-ditiobis(2-nitrobensoehappega) (DTNB), nagu on kirjeldanud näiteks Gao *et al.*, J. Biol. Chem., (veebiväljaanne, käsikiri M607622200).

**[0089]** Vähemalt ühe testühendiga ühendatud rakk võib olla neuron või neuronaalne  
30 rakuliin. Vähemalt ühe testühendiga ühendatud rakk võib olla valitud käärsoole kartsinoomi rakuliini (nt DLD1), neuroblastoomi rakuliini (näiteks SkNSH või IMR32) ja primaarse monotsüüdi hulgast. Rakud võivad olla külvatud (*in vitro*) või olla looma sees (*in vivo*).

**[0090]** Raku elujõulisust ja eelkõige neuroni elujõulisust saab hinnata *in vivo* või *in vitro*, kasutades mistahes sobivat meetodit, sealhulgas näidetes kirjeldatud meetodeid. Näiteks saab neuroni elujõulisuse hindamiseks pärast neuronaalsete rakukultuuride kokkuviiimist glutamaadi tsütotoksiliste tasemetega kasutada MTT-analüüsi, nagu on kirjeldanud näiteks  
5 Shih *et al.*, J. Neurosci., 2005, 25(44):10321-35. Lisaks saab raku elujõulisust hinnata ka analüüsidega, mille puhul kutsutakse raku hävinemine esile oksüdatiivse kahjustusega, näiteks glükoosoksüdaasi lisamisega astrotsüüdi rakukultuuridele, nagu on kirjeldanud näiteks Calabrese *et al.*, J. Neurosci. Res., 2005, 79:509-521. *In vivo* analüüse võib teostada viisil, mida on kirjeldanud näiteks Misgeld, Histochem. Cell Biol., 2005,  
10 124:189-196.

**[0091]** Ekspresseeritud reportergeeni koguse võib kindlaks määrata mistahes sobiva meetodiga. Ekspressioonitasemeid RNA või valgu tasandil saab kindlaks määrata rutiinsete meetoditega. Ekspressioonitasemeid kaalutakse ja/või normaliseeritakse tavaliselt RNA või valgu lõppkoguse kohta proovis ja/või kontrollproovis, milleks on tüüpiliselt nn koduhoidja-geenid, nagu näiteks aktiin või GAPDH. RNA-tasemed määratakse kindlaks kvantitatiivse PCR-analüüsiga (näiteks RT-PCR), *Northern blot-*analüüsiga või mistahes muu RNA-tasemete kindlaks määramiseks kasutatava meetodiga, mida on näiteks kirjeldatud trükises „Cloning: A Laboratory Manual“, autorid Sambrook  
20 *et al.* (toim), 2. trükk, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Lodie *et al.*, Tissue Eng., 2002, 8(5):739-751); või vastavalt näidetes kirjeldatule. Valgutasemete kindlaks määramiseks kasutatakse *Western blot-*analüüsi, ELISA, ensümaatilise aktiivsuse analüüse või mistahes muud valgutasemete kindlaks määramiseks kasutatavaid meetodeid, mida on kirjeldatud näiteks trükises „Current Protocols in Molecular Biology“, autorid Ausubel *et al.* (toim), John Wiley and Sons, 1998.  
25

**[0092]** Samuti võib ekspressioonitasemete kindlaks määramiseks kasutada reportergeeni analüüsimeetodeid raku/koe ekstraktis või koega või looma tervikkujutisega. Lisaks MRI-le saab koekujutist elusloomadel teostada fluorestsents-avastamisega (Hoffman Lancet  
30 Oncol., 2002 3:546-556; Tung *et al.*, Cancer Res., 2000, 60:4953-4958), bioluminestsents-avastamisega (Shi *et al.*, PNAS, 2001, 98:12754-12759; Luke *et al.*, J. Virol., 2002, 76:12149-12161; ja patendid US 5 650 135 ja US 6 217 847), positronemissioontomograafiaga (Liang *et al.*, Mol. Ther., 2002, 6:73-82, infrapuna



lähedase fluorestsentsiga (Tung *et al.*, *Cancer Res.*, 2000, 60:4953-4958), või röntgenpildiga (Hemminki *et al.*, *J. Nat. Cancer Inst.*, 2002, 94:741-749).

5 [0093] Siin kirjeldatud neuroloogiline haigus võib olla neurodegeneratiivne haigus, nagu näiteks ALS, Parkinsoni tõbi, Alzheimeri tõbi või Huntingtoni tõbi. Käesolevas leiutises on neuroloogiline haigus *sclerosis multiplex* (polüskleroos). Polüskleroosi vorm võib olla valitud ägenemiste ja remissioonidega polüskleroosi (*relapsing remitting MS*, RRMS), sekundaarse progresseerumisega polüskleroosi (*secondary progressive MS*, SPMS), primaarselt progresseeruva polüskleroosi (*primary progressive MS*, PPMS) ja 10 pahaloomulise polüskleroosi (Marburgi variant) hulgast.

[0094] Ravialune, keda ravitakse või kellele manustatakse ühendit vastavalt siin kirjeldatud kasutusvaldkondadele, on seda vajav imetaja, nagu näiteks ravialune, kes vajab neuroproteksiooni, sealhulgas ravialune, kellel on soodumus haigestuda 15 demüeliniseerivasse või muusse konkreetsesse neurodegeneratiivsesse haigusesse. Ravialune on imetaja ja võib olla näriline või muu laboriloom, näiteks primaat, kes ei ole inimene. Osades teostustes on ravialune inimene.

[0095] Neurodegeneratiivseid haiguseid on kirjeldatud näiteks trükises 20 „Neurodegenerative Diseases: Neurobiology, Pathogenesis and Therapeutics“, autorid M. Flint Beal, Anthony E. Lang, Albert C. Ludolph, Cambridge University Press (11. juuli 2005). Siin kirjeldatud meetodite kasutamiseks sobivate neuroloogiliste haiguste näidete hulka kuuluvad neurodegeneratiivsed haigused, nagu näiteks amüotroofne lateraalskleroos (ALS), Parkinsoni tõbi, Alzheimeri tõbi ja Huntingtoni tõbi. Muude näidete hulka kuuluvad 25 demüeliniseerivad neuroloogilised haigused, mille hulka kuuluvad lisaks polüskleroosile alljärgnevad haigused: äge hemorraagiline leukoentsefalomüeliit, Hursti tõbi, äge dissemineeritud entsefalomüeliit, nägemisnärvi põletik, Devici tõbi, seljaaju lesioonid, äge nekrotiseeriv müeliit, transversne müeliit, krooniline progresseeruv müelopaatia, progresseeruv multifokaalne leukoentsefalopaatia (PML), radiatsiooni põhjustatud 30 müelopaatia, HTLV-1-seotud müelopaatia, monofaasiline isoleeritud demüelinatsioon, tsentraalne ajusilla müelinoos ja leukodüstroofia (näiteks adrenaalne leukodüstroofia, metakromaatilise leukodüstroofia, Krabbe tõbi, Canavani tõbi, Alexandri tõbi, Pelizaeus-Merbacheri tõbi, valgeolluse degenerereerumine, okulodentodigitaalne sündroom,

Zellwegeri sündroom), krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia (CIDP), äge põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia (AIDP), Leberi optiline atroofia ja Charcot'-Marie'-Toothi sündroom.

- 5 [0096] Siin kirjeldatud meetodite kasutamises sobivate haiguste täiendavateks näideteks on polüneuriit ja demüelinatsiooniga mitokondrilised häired. Nende häiretega võivad kaasned ja neid võivad tõenäoliselt süvendada diabeet, sealhulgas insuliinsõltuv diabeet (*insulin-dependent diabetes mellitus*, IDDM; I tüüpi diabeet), või muud haigused.
- 10 [0097] Testühendit võib lisaks analüüsida polüskleroosi loomudelisel, mida teatakse nime all eksperimentaalne allergiline (autoimmuunne) entsefalomüeliit (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) (Tuohy *et al.*, J. Immunol., 1988, 141:1126-1130, Sobel *et al.* J. Immunol., 1984, 132:2393-2401 ja Traugott, Cell Immunol., 1989 119:114-129). Krooniline ägenemistega EAE pakub head eksperimentaalset mudelit, mille abil
- 15 katsetada toimeaineid, mis võivad olla kasulikud polüskleroosi ravimiseks. Hiire EAE on esile kutsutud demüeliniseeriv autoimmuunhaigus, millel on kliiniliste ilmingute poolest palju sarnasusi inimese polüskleroosiga. Nii EAE kui ka polüskleroos on kliinilised haigused, mis on seotud hematoentsefaalse barjääri (*blood-brain barrier*, BBB) düsfunktsiooniga, kesknärvisüsteemi (CNS) infiltreerimisega mononukleaarsete rakkude
- 20 poolt (peamiselt makrofaagid ja T-lümfotsüüdid ning seerumi produktid) ning demüelinatsiooniga (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).
- 25 [0098] Polüskleroosi kliinilised ilmingud ja demüeliniseerimise patoloogia EAE-s tulenevad immuniseerimisest CNS-i müeliini valkude või peptiididega (näiteks MBP, PLP ja MOG) Th1 tingimustes (otsese immuniseerimise mudel) või CNS-i antigeenspetsiifiliste Th1 rakkude adoptiivsest ülekandest (adoptiivse ülekande mudel) (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). Näiteks EAE SJL hiire mudelis on CNS-i peptiidiga PLP 139-151 immuniseerimise või PLP-spetsiifiliste Th1 rakkude adoptiivse ülekande
- 30 tulemuseks haiguskulg, mis hõlmab ägedat faasi koos saba värvi kaotusega 10. kuni 12.

- päeval, millele järgneb tagajäseme halvatus ja CNS-i mononukleaarse raku infiltratsioon (Tuohy *et al.*, J. Immunol., 1988, 141:1126-1130, Sobel *et al.*, J. Immunol., 1984, 132:2393-2401 ja Traugott, Cell Immunol., 1989, 119:114-129). Kliiniliste ilmingute taandumine ja taastumine toimub 20. kuni 25. päeval ning loomadel esineb veel mitmeid ägenemisi, mis ei ole nii tõsised kui algfaasis. EAE-d on kasutatud T-rakkude vahendatud autoimmuunhaigusi käsitlevate uute terapeutiliste lähenemisviiside hindamiseks, kuna sellel on kliinilised ja histopatoloogilised sarnasused inimese demüeliniseeriva polüskleroosiga.
- 5
- 10 **[0099]** Ühendi suutlikkust aeglustada või ennetada neurodegeneratsiooni (sealhulgas demüelinatsiooni ja neuronite hävinemist) saab hinnata EAE mudelis või muus loomses mudelis, sealhulgas näiteks Thieleri näriliste entsefalomüeliidi viiruse (TMEV) põhjustatud demüeliniseeriv haigus, näriliste hepatiidiviirus (MHV), Semliki metsaviirus või Sindbisi viirus, nagu on kirjeldanud Ercoli *et al.*, J. immunol., 2006, 175:3293-3298.
- 15
- [0100]** Ühendit võib valikuliselt katsetada vähemalt ühes täiendavas loomudelis (vt üldiselt „Immunologic Defects in Laboratory Animals“, toim Gershwin *et al.*, Plenum Press, 1981) nagu näiteks alljärgnevates mudelites: SWR X NZB (SNF1) hiire mudel (Uner *et al.*, J. Autoimmune Disease, 1998, 11 (3):233-240), KRN transgeense hiire (K/BxN) mudelis (Ji *et al.*, Immunol. Rev., 1999, 69:139); NZB X NZW (B/W) hiirte mudel SLE jaoks (Riemekasten *et al.*, Arthritis Rheum., 2001, 44(10):2435-2445); NOD hiire diabeedimudel (Baxter *et al.*, Autoimmunity, 1991, 9(1):61-67), jne); või hiire polüskleroosi mudel (vt näiteks Linker *et al.*, Eur. J. Immunol., 2002, 8(6):620-624, ja Eugster *et al.*, Nat. Med., 1999, 29:626-632; ja Gold *et al.*, Brain, 2006, 129:1953-1971).
- 20
- 25
- [0101]** Esialsged annused määratakse kindlaks näiteks loomkatsetes ning inimesele manustamiseks arvutatakse annused ümber vastavalt valdkonnas aktsepteeritud tavadele. Toksilisuse ja terapeutilise efektiivsuse saab kindlaks määrata standardsete farmatseutiliste protseduuridega rakukultuurides või katseloomades, näiteks LD<sub>50</sub> (50% elanikkonna jaoks surmava annuse) ja ED<sub>50</sub> (50% elanikkonna puhul terapeutiliselt efektiivse annuse) kindlaks määramiseks. Toksiliste ja terapeutiliselt efektiivsete annuste suhe on terapeutiline indeks ja seda väljendatakse LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub> suhtena. Osades teostustes kasutatakse koostisi, mis näitavad suuri terapeutilisi indekseid.
- 30

[0102] Terapeutiliselt efektiivset annust saab esialgselt hinnata rakukultuuri analüüsiga. Annus võib olla formuleeritud loomudelites, et saavutada tsirkuleeriva plasma kontsentratsiooni vahemik, mis hõlmab  $IC_{50}$  (st terapeutilise ühendi kontsentratsioon, mis saavutab sümptomite maksimaalsest inhibeerimisest poole), nagu on kindlaks määratud rakukultuuri analüüsidest või loomudelites. Plasmas sisalduvaid tasemeid võib mõõta näiteks ELISA või HPLC analüüsiga. Mistahes konkreetse annuse toimeid saab jälgida sobiva bioanalüüsiga. Annuste näited on: ligikaudu  $0,1 \times IC_{50}$ , ligikaudu  $0,5 \times IC_{50}$ , ligikaudu  $1 \times IC_{50}$ , ligikaudu  $5 \times IC_{50}$ ,  $10 \times IC_{50}$ , ligikaudu  $50 \times IC_{50}$  ja ligikaudu  $100 \times IC_{50}$ .

10

[0103] *In vitro* analüüsides või loomkatsetest saadud andmeid saab kasutada inimese puhul kasutamiseks mõeldud annusevahemiku formuleerimiseks. Ühes loomudelisel saavutatud terapeutiliselt efektiivseid annuseid saab teisendada kasutamiseks muude loomade, sealhulgas inimese puhul, kasutades valdkonnas tuntud teisendusfaktoreid (vt näiteks Freireich *et al.*, Cancer Chemother. Reports, 1966, 50(4):219-244 ja tabelit 2 pindala ekvivalentse annuse faktorite kohta).

15

Tabel 2

Kellele:	Häär (20 g)	Rott (150 g)	Ahv (3.5 kg)	Koer (8 kg)	Inimene (60 kg)
Kellelt:					
Häär	1	1/2	1/4	1/6	1/12
Rott	2	1	1/2	1/4	1/7
Ahv	4	2	1	3/5	1/3
Koer	6	4	3/5	1	1/2
Inimene	12	7	3	2	1

[0104] Selliste ühendite annused võivad jääda tsirkulatsiooni kontsentratsioonide vahemikku, mis hõlmab vähese toksilisuse või ilma toksilisuseta  $ED_{50}$ . Selles vahemikus võib annus rakendatud annustamisvormist ja manustamisviisist olenevalt varieeruda. Üldiselt võib terapeutiliselt efektiivne annus varieeruda ravialuse vanusest, seisundist, soost ja haigusseisundi raskusest olenevalt. Siin kirjeldatud ühendite farmatseutiliselt aktsepteeritavate annuste näited jäävad ühenditest, sümptomite raskusest ja haiguse

20

25

kulgemisest olenevalt vahemikku 1 µg/kg kuni 25 mg/kg. Sobivad terapeutiliselt efektiivsed annused võib valida raviarst ja need jäävad ligikaudu vahemikku 1 µg/kg kuni 20 mg/kg, 1 µg/kg kuni 10 mg/kg, 1 µg/kg kuni 1 mg/kg, 10 µg/kg kuni 1 mg/kg, 10 µg/kg kuni 100 µg/kg, 100 µg kuni 1 mg/kg. Lisaks on teatavad konkreetsed annused  
5 välja toodud näidetes.

**[0105]** DMF-i või MMF-i puhul võib efektiivne kogus jääda vahemikku 1 mg/kg kuni 50 mg/kg (näiteks 2,5 mg/kg kuni 20 mg/kg või 2,5 mg/kg kuni 15 mg/kg). Nagu valdkonna asjatundjatele teada, varieeruvad efektiivsed annused ka olenevalt  
10 manustamisviisist, abiaine kasutamisest ja muude terapeutiliste ravimeetoditega, sealhulgas muude terapeutiliste toimeainetega koos kasutamise võimalusest. Eelkõige on ravialusele suukaudselt manustatava DMF-i või MMF-i efektiivne kogus 480 mg päevas. Vastavalt siin kirjeldatule võib 2, 3, 4, või 6 võrdse annuse eraldi manustamisel manustada 720 mg päevas.

15

**[0106]** Annuse võib kindlaks määrata raviarst ja seda võib vajadusel kohandada ravi puhul täheldatud toimetele sobivaks. Koostisi võib anda boolusena, et maksimeerida ringlustasemed võimalikult pikaks ajaks pärast annuse manustamist. Pärast booluse manustamist võib kasutada pidevat infusiooni.

20

**[0107]** Siin kirjeldatud meetodites kasutatud koostised sisaldavad lisaks farmatseutiliselt aktsepteeritavat abiainet. Siin kasutatuna osutab fraas „farmatseutiliselt aktsepteeritav abiaine” mistahes ja kõigile lahustitele, dispersiooni vahendajatele, katteainetele, antibakteriaalsetele ja antifungaalsetele ainetele, isotoonilistele ja imendumist edasilükkavatele ainetele, mis sobivad ravimi manustamise viisiga. Selliste vahendajate ja  
25 ainete kasutamine farmatseutiliste toimeainete puhul on tehnika tasemest hästi tuntud. Koostised võivad sisaldada ka muid toimeaineid, mis pakuvad täiendavaid või paremaid terapeutilise funktsioone. Farmatseutilised koostised võivad olla pakendatud mahutisse, pakki või dispenserisse koos manustamisjuhistega.

30

**[0108]** Farmatseutiline koostis on formuleeritud selliselt, et see oleks kooskõlas kavandatava manustamisviisiga. Manustamismeetodid on tehnika tasemest tuntud. „Manustamine” ei ole piiratud mistahes konkreetse sisestamissüsteemiga ning võib

hõlmata mittepiiravalt parenteraalsed (sealhulgas subkutaanset, intravenoosset, intramedullaarseid, intraartikulaarseid, intramuskulaarseid või intraperitoneaalseid) süstimist, rektaalseid, topikaalseid, transdermaalseid või suukaudset manustamist (näiteks kapslite (näiteks pulbrite, graanulite, mikrotablettide, mikropelletite jms), suspensioonide või tablettide kujul). Osade DMF-i ja/või MMF-i sisaldavate formulatsioonide näited on esitatud näiteks patentides US 6 509 376 ja US 6 436 992.

**[0109]** Üksikisikule võib ravimit manustada ühe annusena või korduvate manustamistena ning mistahes füsioloogiliselt aktsepteeritavate soolavormides ja/või farmatseutiliselt aktsepteeritava kandeainega ja/või lisaainega, mis on farmatseutilise koostise osa. Füsioloogiliselt aktsepteeritavad soolavormid ja ravimi valmistamise standardtehnikad ja lisaained on valdkonna asjatundjatele hästi tuntud.

**[0110]** Alljärgnevad näited on esitatud ainult illustratiivsel eesmärgil ning need ei piira nõudluspunktides esitatud leiutiste ulatust.

## **NÄITED**

### **Näide 1**

**[0111]** Inimese käärsoole kartsinoomi DLD1 rakke töödeldi DMF-i või MMF-iga kindlaksmääratud kontsentratsioonides (5, 15 või 50  $\mu\text{M}$ ) 16 tundi, loputati PBS-iga, ja külvati redutseerivasse SDS proovipuhvrise. Lüsaatide suhtes teostati SDS PAGE ja eraldatud valgud kanti Western blot-analüüsi tegemiseks elektroforeetiliselt üle nitrotselluloosi membraanidele. Nrf2 ja NQO1 tuvastamiseks inkubeeriti membraane vastavate primaarsete antikehadega üleöö 4 °C juures ning pesti ja inkubeeriti peroksidaas-konjugeeritud sekundaarsete antikehadega, millele järgnes kemoluminestsents-peroksiidi substraat. Sihtmärgiks oleva valgu võotme luminesentsi tuvastamiseks ja pildi saamiseks kasutati CCD-ga varustatud fotoseadet Kodak2000R. Joonisel FIG 1 kujutatud tulemused näitavad, et DMF ja MMF on kliinilise kokkupuute määradesse jäävate kontsentratsioonide juures Nrf2 võimsad aktiveerijad.

**Näide 2**

**[0112]** DLD1 rakke kasvatati MEM-is, kuhu lisati 10% veise loote seerumit. Rakke transfekteriti kindlaksmääratud siRNA-ga, kasutades vastavalt tootja juhistele lipofektamiini reagenti (Invitrogen) ja 30 tundi hiljem stimuleeriti neid 40 tunni jooksul 30 µM DMF-iga. Rakud külvati ja neid töödeldi *Western blot*-analüüsi jaoks Nrf2 ja NQO1 tasemete mõõtmiseks vastavalt näites 1 kirjeldatule. Näidetes 1 ja 2 kasutatud reagentide allikad ja olemus on välja toodud tabelis 3.

	<b>Sihtmärk</b>	<b>Reagent</b>	<b>Allikas/järjestus</b>	<b>Müüja</b>
<b>Primaarne antikeha</b>	Nrf2	Nrf2 (T-19)	kitse polükloonaalne antikeha	Santa Cruz Biotechnology
	Keap1	Keap1 (E-20)	kitse polükloonaalne antikeha	Santa Cruz Biotechnology
	NQO1	NQO1 (A180)	hiire monokloonaalne antikeha	Santa Cruz Biotechnology
	GAPDH	Anti-GAPDH	hiire monokloonaalne antikeha	Ambion
<b>Sekundaarne antikeha</b>	hiire antikeha	HRP-hiire IgG	lammas	Amersham Biosciences
	küüliku antikeha	HRP-küüliku IgG	eesel	Amersham Biosciences
	kitse antikeha	HRP-kitse IgG	veis	Santa Cruz Biotechnology
<b>siRNA</b>	Nrf2	Nrf2-2	UCAUUGAACUGC UCUUUGGUU	Dharmacon
			(antisenss)	
			(SEQ ID NO:17)	

	<b>Sihimärk</b>	<b>Reagent</b>	<b>Allikas/järjestus</b>	<b>Müüja</b>
	Keap1	Keap1-1	GAAUUAAGGCGG UUUGUCCUU	Dharmacon
			(antisenss)	
			(SEQ ID NO:18)	

**[0113]** Tulemusi on kujutatud joonisel FIG 2 (esitamise lihtsustamiseks on *Western blot*-analüüsi kujutis pööratud tagurpidi). Tulemused näitavad, et DMF-i põhjustatud NQO1 suurendamine nõuab Nrf2 ja seda saab järele teha Nrf2 aktiveerimisega Keap1 mahasurumise kaudu. Seega toimib DMF Nrf2 agonistina, põhjustades Nrf2 ladestumist rakkudesse ja Nrf2 sihtmärk-geeni ekspressiooni.

### Näide 3

10

**[0114]** EAE esile kutsumiseks said hiired subkutaanseid süste külge ja sabasse, kusjuures süstid sisaldasid 50 µg MOG 35-55 peptiidi PBS-is, mis oli emulgeeritud *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Detroit MI, USA) sisaldavas täielikus Freundi adjuvandis (CFA) lõppkontsentratsiooniga 0,5 mg/ml. 0. ja 2. päeval tehti kaks pertussise toksiooni süsti (List Biological Laboratories Inc., California, USA; 200 ng hiire kohta intraperitoneaalselt).

**[0115]** DMF ja MMF lahjendati 200 µl 0.08% Methocel/H<sub>2</sub>O segus vehiikulina ning manustati pärast immuniseerimist suukaudse kunstliku toitmisega alates 3. päevast kuni lõpuni. Iga ravirühm koosnes kaheksast loomast: vehiikul üksi negatiivse kontrollina, 5 mg DMF-i kehakaalu kilogrammi kohta kaks korda päevas, 15 mg DMF-i kehakaalu kilogrammi kohta kaks korda päevas, 15 mg MMF-i kehakaalu kilogrammi kohta kaks korda päevas. Kõik ühendid saadi ettevõtte Fumaphram AG kaudu. Suukaudset sundtoitmist kasutati selleks, et tagada täpne annustamine ja vältida ühendi degradatsiooni.

25



**[0116]** Seljaaju koed fikseeriti 4% paraformaldehüüdis ja kinnitati parafiiniga. Slaidid vabastati parafiinist ja rehüdreeriti astmestatud alkoholilahustes. Antigeeni taastamiseks kasteti slide 20 minutit survekeetlis 120 °C juures 10 mM tsitraadi sisse (pH 6,0) (Pascal, Dako Cytomation).

5

**[0117]** Immunohistokeemia teostamiseks kasutati värvimisseadet Dako Autostainer alljärgneval viisil. Endogeenne peroksidaas kustutati 10-minutilise inkubatsiooniga 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ja metanooli segus. Küüliku Nrf2 vastane antikeha C-20 (sc-722, Santa Cruz Biotechnology) lisati vahekorras 1:250 lahjendatult Dako lahjendiga koos tausta mõju vähendavate komponentidega (Dako nr S3022). C-20 antikeha kindlaks tegemiseks kasutati Envisioni jänesevastase antikeha suhtes märgistatud polümeeri HRP (Dako nr K4003) ja DAB-i (Vector Labs nr SK-4100) kasutati kromogeense substraadina. Nrf2 immunovärvimise morfomeerse analüüsi teostamiseks kasutati ImageJ tarkvara ettevõttelt NIH.

15

**[0118]** Joonistel FIG 3 ja FIG 4 kujutatud tulemused näitavad MMF-i ja DMF-i Nrf2 aktiveerimist *in vivo*.

20

**Patendinõudlus**

1. Farmatseutiline koostis polüskleroosi ravis kasutamiseks, kusjuures nimetatud koostis koosneb:
- 5 (a) dimetüülfumaraadist või monometüülfumaraadist, ja  
(b) ühest või mitmest farmatseutiliselt aktsepteeritavast abiaainest,  
kusjuures nimetatud koostist manustatakse polüskleroosi ravi vajavale ravialusele suukaudselt ning manustatava dimetüülfumaraadi või monometüülfumaraadi annus on 480 mg päevas.
- 10
2. Farmatseutiline koostis kasutamiseks vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures koostis koosneb dimetüülfumaraadist ja ühest või mitmest farmatseutiliselt aktsepteeritavast abiaainest.
- 15
3. Farmatseutiline koostis kasutamiseks vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures koostis koosneb monometüülfumaraadist ja ühest või mitmest farmatseutiliselt aktsepteeritavast abiaainest.
- 20
4. Farmatseutiline koostis kasutamiseks vastavalt mistahes nõudluspunktile 1 kuni 3, kusjuures koostist manustatakse tableti, suspensiooni või kapsli kujul.
- 25
5. Farmatseutiline koostis kasutamiseks vastavalt mistahes nõudluspunktile 1 kuni 4, kusjuures koostist manustatakse ravialusele 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 või 200 nädalat või kauem.
- 30
6. Farmatseutiline koostis kasutamiseks vastavalt mistahes nõudluspunktile 1 kuni 5, kusjuures koostist manustatakse ravialusele vähemalt 12 nädalat.
7. Dimetüülfumaraat või monometüülfumaraat polüskleroosi ravis kasutamiseks, kusjuures dimetüülfumaraat või monometüülfumaraat on ainuke manustatav neuroprotektiivne ühend, ning dimetüülfumaraati või monometüülfumaraati manustatakse polüskleroosi ravi vajavale ravialusele annuses 480 mg päevas.

8. Dimetüülfumaraat kasutamiseks vastavalt nõudluspunktile 7, kusjuures dimetüülfumaraat on ainuke manustatav neuroprotektiivne ühend.
9. Monometüülfumaraat kasutamiseks vastavalt nõudluspunktile 7, kusjuures  
5 monometüülfumaraat on ainuke manustatav neuroprotektiivne ühend.
10. Dimetüülfumaraat või monometüülfumaraat kasutamiseks vastavalt mistahes nõudluspunktile 7 kuni 9, kusjuures dimetüülfumaraati või monometüülfumaraati manustatakse tableti, suspensiooni või kapsli kujul.  
10
11. Dimetüülfumaraat või monometüülfumaraat kasutamiseks vastavalt mistahes nõudluspunktile 7 kuni 10, kusjuures dimetüülfumaraati või monometüülfumaraati manustatakse ravialusele 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 või 200 nädalat või kauem.
- 15 12. Dimetüülfumaraat või monometüülfumaraat kasutamiseks vastavalt mistahes nõudluspunktile 7 kuni 11, kusjuures dimetüülfumaraati või monometüülfumaraati manustatakse ravialusele vähemalt 12 nädalat.

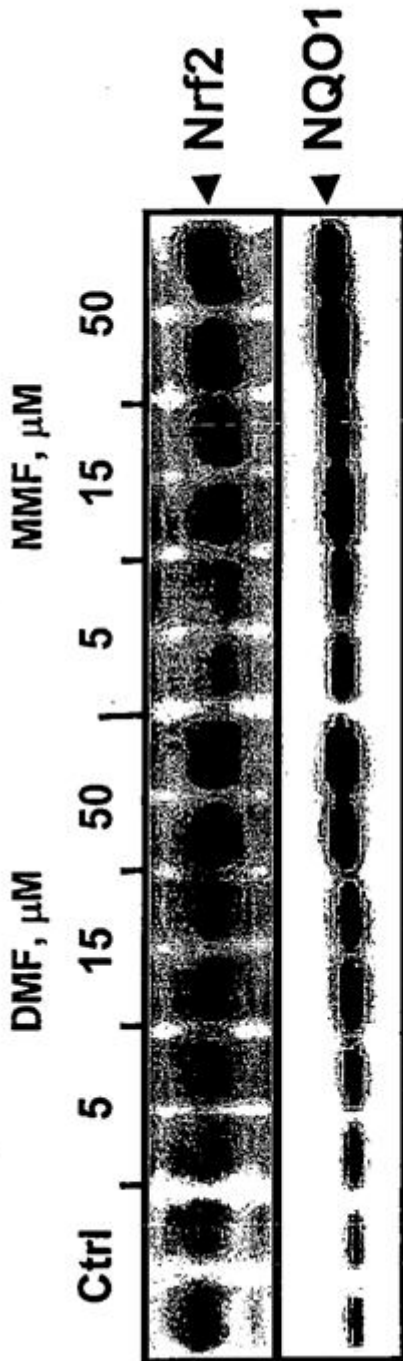


FIG 1

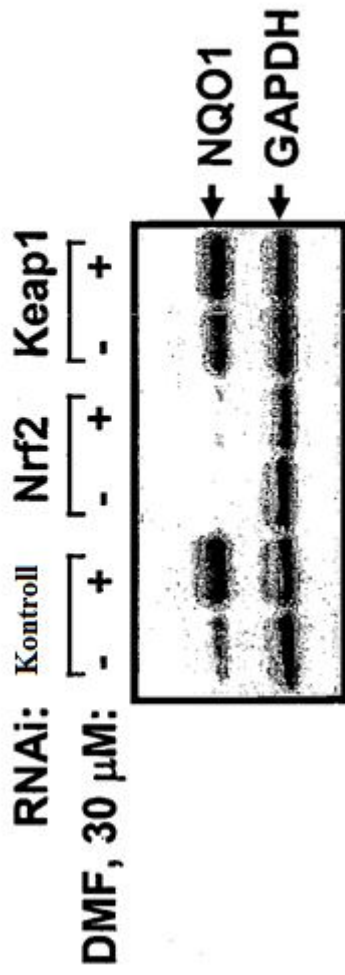


FIG 2

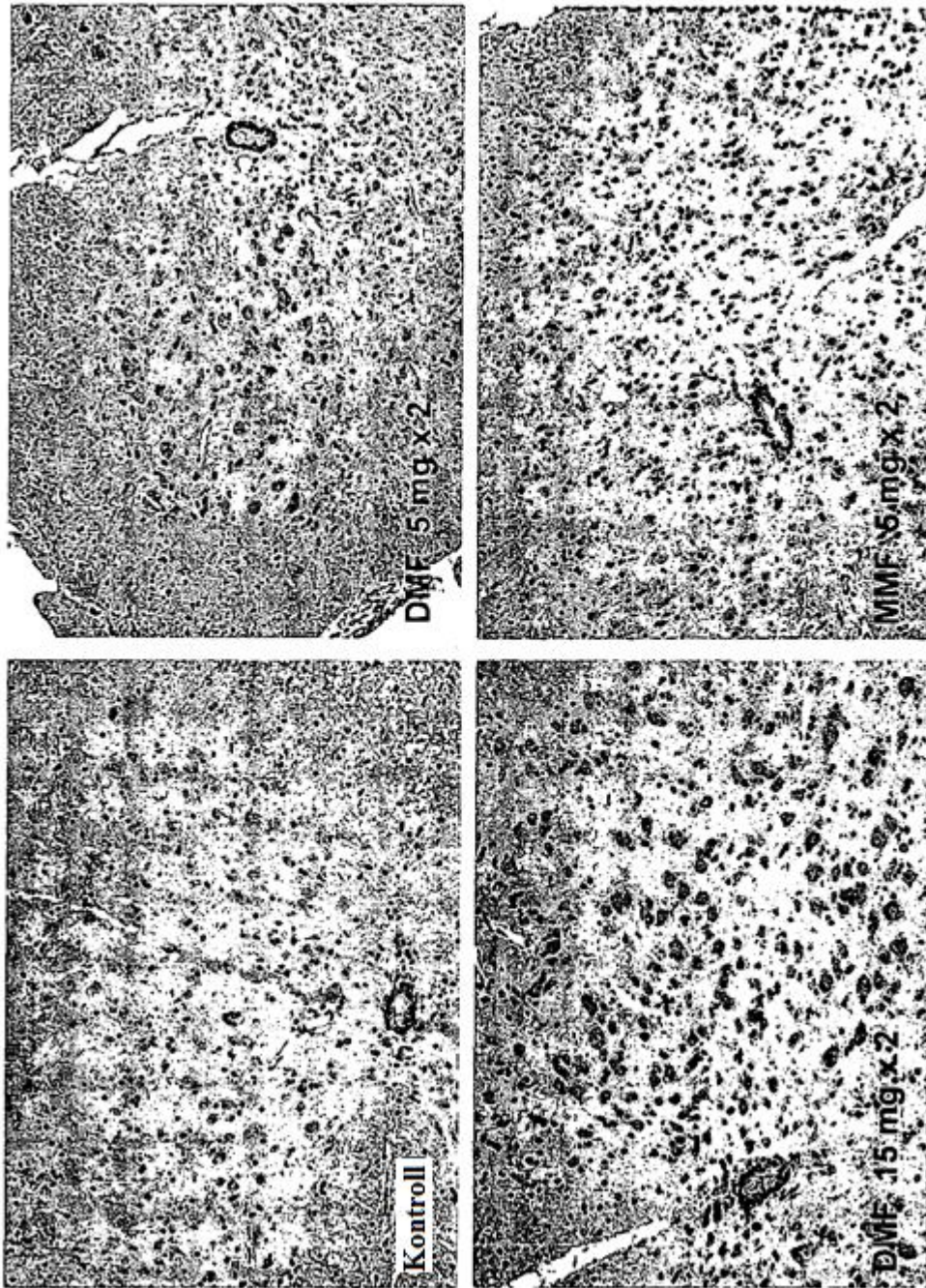


FIG 3

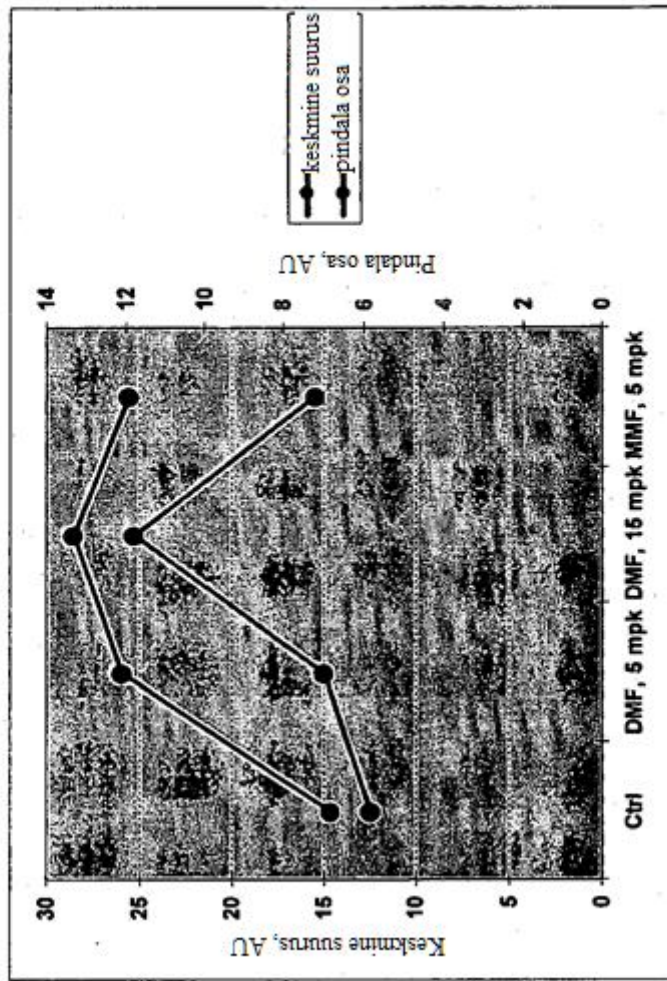


FIG 4