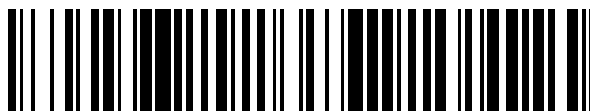


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 368**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4704 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2011 E 11751300 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2542079**

54 Título: **Tratamiento de la artritis reumatoide con una combinación de laquinimod y metotrexato**

30 Prioridad:

03.03.2010 US 339375 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.07.2014

73 Titular/es:

**TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD.
(100.0%)
5 Basel Street, P.O. Box 3190
Petah Tiqva 49131, IL**

72 Inventor/es:

**BLAUGRUND, ERAN;
TARCIC, NORA y
KAYE, JOEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 476 368 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de la artritis reumatoide con una combinación de laquinimod y metotrexato.

Antecedentes

Artritis reumatoide

- 5 La artritis reumatoide (AR) es un síndrome crónico caracterizado por inflamación no específica usualmente simétrica de las articulaciones periféricas, dando potencialmente lugar a la destrucción progresiva de estructuras articulares y periarticulares, con o sin manifestaciones generalizadas. Aunque su etiología precisa no ha sido aún determinada, se ha determinado su predisposición genética. Además, se piensa que los factores medioambientales juegan un papel (The Merck Manual, 7th Ed.).
- 10 Según el American College of Rheumatology (1987), al menos tienen que reunirse cuatro de los siguientes criterios antes de que una afección sea clasificada como artritis reumatoide (Arnett, 1988): 1) rigidez matutina de > 1 hora la mayor parte de las mañanas durante al menos 6 semanas; 2) artritis e hinchamiento de los tejidos blandos de > 3 de 14 articulaciones/grupos de articulaciones, presente durante al menos 6 semanas; 3) artritis de las articulaciones de las manos, presente durante al menos 6 semanas; 4) artritis simétrica, presente durante al menos 6 semanas; 5) nódulos subcutáneos en lugares específicos; 6) factor reumatoide a un nivel por encima del percentil 95; y 7) cambios radiológicos sugerentes de erosión de las articulaciones.

20 No existe ninguna cura conocida para la artritis reumatoide, pero están disponibles muchos tipos diferentes de tratamiento para aliviar los síntomas y/o modificar el proceso de la enfermedad. El tratamiento farmacológico de la AR incluye fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) y salicilatos, fármacos de acción lenta, compuestos de oro, hidroxicloroquina, sulfasalazina, combinaciones de fármacos de acción lenta, corticoesteroides, y fármacos citotóxicos o inmunosupresores. Otras formas de tratamiento incluyen descanso, nutrición, ejercicio, fisioterapia y cirugía (The Merck Manual, 7th Ed.)

Laquinimod

25 Laquinimod es un nuevo compuesto sintético con alta biodisponibilidad oral que ha sido sugerido como una formulación oral para el tratamiento de la esclerosis múltiple (MS) (Polman, 2005; Sandberg-Wollheim, 2005). Laquinimod y su sal de sodio están descritos, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. No. 6.077.851. Este documento se dirige al tratamiento de enfermedades procedentes de autoinmunidad e inflamación patológica, incluyendo la artritis reumatoide. No se ha informado de los efectos de laquinimod en combinación con metotrexato sobre la artritis reumatoide.

30 Metotrexato

El metotrexato (MTX) es un fármaco antimetabolitos usado en el tratamiento del cáncer y de enfermedades autoinmunes. Actúa inhibiendo el metabolismo del ácido fólico vía la inhibición de la dihidrofolato reductasa y bloquea la síntesis del DNA en células que proliferan rápidamente. Estas acciones inducen la inmunosupresión.

35 MTX se vende bajo las marcas Rheumatrex® y Trexall™. Rheumatrex® y Trexall™ están indicadas para tratar ciertas clases de cáncer, psoriasis y artritis reumatoide.

Visser, K. et al. (Ann. Rheum. Dis. 2009; 68:1094-1099) describe el uso de metotrexato en el tratamiento de la artritis reumatoide.

40 Los fármacos citotóxicos/inmunosupresores que incluyen MTX se usan crecientemente contra la AR activa grave. Estos fármacos pueden suprimir la inflamación y pueden permitir la reducción de las dosis de corticoesteroides (The Merck Manual, 7th Ed.).

45 La dosificación recomendada contra la artritis reumatoide grave en seres humanos (basada en el consenso) es: inicial 10 a 15 mg oralmente una vez semanalmente, aumentada a 5 mg/semana cada 2 a 3 semanas, hasta un máximo de 20 a 30 mg/semana. La dosificación recomendada por el fabricante contra la artritis reumatoide grave en seres humanos es: inicial 7,5 mg oralmente una vez semanalmente ó 3 dosis de 2,5 mg oralmente cada 12 horas una vez semanalmente, hasta un máximo de 20 mg/semana (Physicians' Desk Reference).

Terapia de combinación

50 La administración de dos fármacos para tratar una afección dada, tal como la artritis reumatoide, plantea varios problemas potenciales. Las interacciones *in vivo* entre dos fármacos son complejas. Los efectos de cualquier fármaco único están relacionados con su absorción, distribución, y eliminación. Cuando se introducen en el cuerpo dos fármacos, cada fármaco puede afectar a la absorción, distribución y eliminación del otro y, por lo tanto, alterar los efectos del otro. Por ejemplo, un fármaco puede inhibir, activar o inducir la producción de enzimas implicadas en una ruta metabólica de eliminación del otro fármaco (Guidance for Industry, 1999). Por tanto, cuando se administran

dos fármacos para tratar la misma afección, es impredecible si cada uno complementará, no tendrá ningún efecto sobre, o interferirá con, la actividad terapéutica del otro en un sujeto humano.

5 La interacción entre dos fármacos no solo puede afectar a la actividad terapéutica buscada de cada fármaco, sino que la interacción puede aumentar los niveles de metabolitos tóxicos (Guidance for Industry, 1999). La interacción también puede aumentar o disminuir los efectos secundarios de cada fármaco. Por tanto, tras la administración de dos fármacos para tratar una enfermedad, es impredecible qué cambio ocurrirá en el perfil secundario negativo de cada fármaco.

10 Adicionalmente, es difícil predecir exactamente cuándo los efectos de la interacción entre los dos fármacos llegarán a ser manifiestos. Por ejemplo, las interacciones metabólicas entre fármacos pueden llegar a ser evidentes tras la administración inicial del segundo fármaco, después de que los dos hayan alcanzado una concentración de estado estacionario o tras el cese de la administración de uno de los fármacos (Guidance for Industry, 1999).

Sumario de la invención

Esta invención proporciona laquinimod o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para usar en combinación con metotrexato en el tratamiento de un sujeto que padece artritis reumatoide.

15 Esta invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y una cantidad de metotrexato, para usar en el tratamiento de un sujeto que padece artritis reumatoide.

Breve descripción de los dibujos

20 **Figura 1:** La Figura 1 es un gráfico de Parámetros Histopatológicos Individuales (Seis Articulaciones): un gráfico de barras que muestra las puntuaciones medias (de las seis articulaciones) para cada parámetro histopatológico en los grupos testigo y de tratamiento. ("LAQ" indica Laquinimod, "MTX" indica metotrexato) ($*p \leq 0,05$ en el ensayo de la t de Student para el vehículo, $\#p \leq 0,05$ en el ensayo de la t de Student para el vehículo, $n = 10$ /grupo de tratamiento, $n = 4$ /testigo normal.) El eje y muestra la media \pm SE individual de los parámetros histopatológicos (seis articulaciones) (puntuación: 0 - normal, 1 = mínima, 2 = leve, 3 = moderada, 4 = acusada, y 5 = grave). La barra más a la izquierda en cada grupo de tratamiento (negro) representa inflamación. La segunda barra desde la izquierda en cada grupo de tratamiento (gris claro) representa pannus. La tercera barra desde la izquierda en cada grupo de tratamiento (blanco) representa daño al cartilago, y la cuarta barra desde la izquierda en cada grupo de tratamiento (gris oscuro) representa daño óseo.

30 **Figura 2:** La Figura 2 es un gráfico de Puntuación de Seis Articulaciones de Animales: un gráfico de barras que muestra la puntuación total (suma de puntuaciones de parámetros histopatológicos individuales de las seis articulaciones) en los grupos testigo y de tratamiento. ("LAQ" indica laquinimod, "MTX" indica metotrexato) ($*p \leq 0,05$ en el ensayo de la t de Student para el vehículo, $\#p \leq 0,05$ en el ensayo de la t de Student para el vehículo, $n = 10$ /grupo de tratamiento, $n = 4$ /testigo normal.) El eje y muestra la media \pm SE de la Puntuación de Seis Articulaciones de Animales (suma de parámetros individuales).

35 **Figura 3:** La Figura 3 muestra la progresión clínica de la puntuación de la artritis en cada brazo de tratamiento (puntuaciones 0-5). ($*p \leq 0,05$ en el ensayo de la t de Student para el vehículo, $\#p \leq 0,05$ en el ensayo de la t de Student para MTX, $n = 10$ /grupo de tratamiento, $n = 4$ /testigo normal). El eje y muestra la media \pm SE de la Puntuación Clínica de la Artritis (puntuada de 0 a 5).

Descripción detallada de la invención

40 Esta invención proporciona laquinimod o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para usar en combinación con metotrexato en el tratamiento de un sujeto que padece artritis reumatoide. Esta invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y una cantidad de metotrexato para usar en el tratamiento de un sujeto que padece artritis reumatoide.

45 En una realización, la cantidad de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y la cantidad de metotrexato cuando se toman conjuntamente es más efectiva para tratar al sujeto que cuando cada agente se administra solo.

50 En una realización, la cantidad de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y la cantidad de metotrexato cuando se toman conjuntamente es efectiva para reducir un síntoma clínico de artritis reumatoide en el sujeto. En otra realización, la sal farmacéuticamente aceptable de laquinimod es laquinimod de sodio.

En una realización, la administración periódica de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables se efectúa oralmente. En otra realización, la cantidad de laquinimod administrada es 0,0005 - 10 mg/kg/día. En aún otra realización, la cantidad de laquinimod administrada es 0,1-2,0 mg/día.

En una realización, la administración periódica de metotrexato se efectúa oralmente. En otra realización, la cantidad de metotrexato administrada es 0,02 - 1,0 mg/kg/día. En aún otra realización, la cantidad de metotrexato administrada es 1-3 mg/día.

5 En una realización, el tratamiento comprende además la administración de fármacos antiinflamatorios no esteroides (NSAIDs), salicilatos, fármacos de acción lenta, compuestos de oro, hidroxicloroquina, sulfasalazina, combinaciones de fármacos de acción lenta, corticoesteroides, fármacos citotóxicos, fármacos inmunosupresores y/o anticuerpos.

10 En una realización, la administración periódica de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y de metotrexato elimina sustancialmente un síntoma asociado con la artritis reumatoide. En otra realización, la administración periódica de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y metotrexato reduce la gravedad de un síntoma asociado con la artritis reumatoide. En aún otra realización, la administración periódica de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y de metotrexato reduce el número de articulaciones afectadas por un síntoma asociado con la artritis reumatoide.

En una realización, el síntoma es inflamación. En otra realización, el síntoma es la formación de tejido pannus. En otra realización, el síntoma es daño a los cartílagos. En otra realización, el síntoma es reabsorción ósea.

15 En una realización, la administración periódica de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y metotrexato reduce la proteinuria en el sujeto. En otra realización, la reducción de la proteinuria se mide mediante la concentración de proteína en la orina durante 24 horas, la relación de proteína a creatinina durante 24 horas, la relación de la intensidad de manchas de proteína a creatinina, la concentración de albúmina en orina durante 24 horas, la relación de albúmina a creatinina durante 24 horas, la relación de la intensidad de manchas de albúmina a creatinina, o mediante una tira reactiva urinaria. En aún otra realización, la administración periódica de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y de metotrexato elimina los sedimentos urinarios.

20 En una realización, cada una de las cantidades de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables cuando se toman solas, y la cantidad de metotrexato cuando se toma sola es efectiva para tratar al sujeto. En otra realización, la cantidad de laquinimod o la de una de sus sales farmacéuticamente aceptables cuando se toman solas, la cantidad de metotrexato cuando se toma sola, o cada una de tales cantidades cuando se toman solas no es efectiva para tratar el sujeto.

En una realización, el sujeto está recibiendo terapia con metotrexato antes de iniciar terapia con laquinimod. En otra realización, el sujeto inicia la administración periódica de metotrexato antes de iniciar la administración periódica de laquinimod.

30 En una realización, la administración de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables precede sustancialmente a la administración de metotrexato. En otra realización, la administración de metotrexato precede sustancialmente a la administración de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En una realización, el sujeto es un mamífero. En otra realización, el mamífero es un ser humano.

35 Para las realizaciones precedentes, cada realización descrita en la presente memoria se contempla como que es aplicable a cada de las otras realizaciones descritas.

Se entiende que, cuando se proporciona un intervalo de parámetros, también son proporcionados por la invención todos los números enteros dentro de ese intervalo y sus décimas. Por ejemplo, "0,2-5 mg/kg/día" incluye 0,2 mg/kg/día, 0,3 mg/kg/día, 0,4 mg/kg/día, 0,5 mg/kg/día, 0,6 mg/kg/día etc. hasta 5,0 mg/kg/día.

40 Se describe un método para tratar a un sujeto que padece artritis reumatoide usando laquinimod con metotrexato, el cual proporciona un tratamiento más eficaz que cada agente solo. Según el sujeto de la invención, la administración de laquinimod con metotrexato es particularmente efectiva en combinación para tratar a un sujeto que padece artritis reumatoide.

Términos y expresiones

45 Cuando se usa en la presente memoria, y a menos que se especifique otra cosa, cada uno de los siguientes términos y expresiones tendrán la definición puesta de manifiesto más adelante.

Cuando se usa en la presente memoria, "laquinimod" quiere decir laquinimod ácido o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Cuando se usa en la presente memoria, "un sujeto que padece artritis reumatoide" quiere decir un sujeto al que afirmativamente se le ha diagnosticado que tiene artritis reumatoide.

50 Cuando se usa en la presente memoria, una "cantidad" o "dosis" de laquinimod que se mide en miligramos se refiere a los miligramos de laquinimod ácido presentes en una preparación, independientemente de la forma de preparación.

Cuando se usa en la presente memoria, "efectiva", cuando se refiere a una cantidad de laquinimod y/o metotrexato, se refiere a la cantidad de laquinimod y/o metotrexato que es suficiente para dar una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica) conmensurada con una relación razonable beneficio/riesgo cuando se usa a la manera de esta invención.

- 5 Cuando se usa en la presente memoria, "elimina sustancialmente" un síntoma asociado con la artritis reumatoide quiere decir disminuir la aparición de ese síntoma en al menos 96%.

Cuando se usa en la presente memoria, "tratar" engloba, por ej., inducir inhibición, regresión, o estasis de un trastorno, o disminuir, suprimir, inhibir, reducir la gravedad de, eliminar, o mejorar un síntoma del trastorno.

- 10 Cuando se usa en la presente memoria, "inhibición" de la progresión de una enfermedad o de la complicación de una enfermedad en un sujeto quiere decir prevenir o reducir la progresión de una enfermedad o la complicación de una enfermedad en el sujeto.

Cuando se usa en la presente memoria, un "síntoma" asociado con la artritis reumatoide incluye cualquier manifestación clínica o de laboratorio asociada con la artritis reumatoide y no está limitada a lo que el sujeto pueda sentir u observar. La inflamación es un síntoma de artritis reumatoide.

- 15 Cuando se usa en la presente memoria, un "suceso adverso" o "AE" quiere decir cualquier aparición médica adversa en un sujeto al que en una prueba clínica se le administra un producto medicinal y que no tiene una relación causal con el tratamiento. Un suceso adverso puede, por lo tanto, ser cualquier signo desfavorable y no pretendido incluyendo un hallazgo anormal en el laboratorio, un síntoma, o enfermedades temporalmente asociadas con el uso de un producto medicinal en investigación, tanto si se considera relacionado con el producto medicinal en
20 investigación como si no.

- Cuando se usa en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o excipiente que es adecuado para usar con seres humanos y/o animales sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) conmensurado con una relación beneficio/riesgo razonable. Puede ser un disolvente, agente de suspensión o vehículo farmacéuticamente aceptable, para administrar los
25 compuestos presentes al sujeto.

Cuando se refiere a dosificación, la designación "BID" indica que la dosis se administra dos veces diariamente. La designación "QD" indica que la dosis se administra una vez diariamente.

- 30 El uso de laquinimod contra la artritis reumatoide ha sido previamente sugerido en, por ej., la Patente de EE.UU. No. 6.077.851. Sin embargo, los inventores han encontrado sorprendentemente que la combinación de laquinimod y metotrexato (MTX) es significativamente más efectiva para el tratamiento de la artritis reumatoide en comparación con cada agente solo.

- 35 Como se usa en esta solicitud, una sal farmacéuticamente aceptable de laquinimod incluye litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, manganeso, cobre, zinc, aluminio y hierro. Formulaciones de sales de laquinimod y el procedimiento para preparar el mismo se describen, por ej., en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2005/0192315 y en la Publicación de Solicitud Internacional PCT No. WO 2005/074899, las cuales se incorporan por la presente por referencia a esta solicitud.

Una unidad de dosificación puede comprender un único compuesto o mezclas de compuestos. Una unidad de dosificación puede prepararse para formas de dosificación oral, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, y gránulos.

- 40 El laquinimod puede administrarse en mezcla con diluyentes, agentes de extensión, excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados (colectivamente denominados en la presente memoria como un vehículo farmacéuticamente aceptable) adecuadamente seleccionados con respecto a la forma pretendida de administración y como consistente con prácticas farmacéuticas convencionales. La unidad está preferiblemente en una forma adecuada para la administración oral. El laquinimod puede administrarse solo pero en general se mezcla con un
45 vehículo farmacéuticamente aceptable, y se coadministra en forma de un comprimido o cápsula, liposoma, o como un polvo aglomerado. Ejemplos de vehículos sólidos adecuados incluyen lactosa, sacarosa, gelatina y agar. Las cápsulas o comprimidos pueden formularse fácilmente y pueden fabricarse para que sean fáciles de tragar o de masticar; otras formas sólidas incluyen gránulos, y polvos a granel. Los comprimidos pueden contener agentes ligantes, lubricantes, agentes desintegrantes, agentes colorantes, agentes saborizantes, agentes inductores del flujo,
50 y agentes de fusión adecuados. Por ejemplo, para la administración oral en la forma de unidad de dosificación de un comprimido o cápsula, el componente fármaco activo puede combinarse con un vehículo inerte oral no tóxico farmacéuticamente aceptable, tales como lactosa, gelatina, agar, almidón, sacarosa, glucosa, metil celulosa, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, manitol, sorbitol, celulosa microcristalina y similares. Agentes ligantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, almidón de maíz, gomas naturales
55 y sintéticas tales como acacia, tragacanto, o alginato de sodio, povidona, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras, y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, ácido esteárico, fumarato de sodio y estearilo, talco y

similares. Los agentes de desintegración incluyen, sin límite, almidón, metil celulosa, agar, bentonita, goma xantano, croscarmellosa de sodio, almidón glicolato de sodio y similares.

5 Ejemplos específicos de las técnicas, y de los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden usarse para formular formas de dosificación orales de la presente invención se describen, por ej., en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2005/0192315, y en las Publicaciones de Solicitud Internacional PCT Nos. WO 2005/074899, WO 2007/047863, y WO 2007/146248.

10 Las técnicas y composiciones generales para fabricar formas de dosificación útiles en la presente invención se describen en las siguientes referencias: 7 Modern Pharmaceutics, capítulo 9 y 10 (Banker & Rhodes, Editors, 1979); Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets (Lieberman et al., 1981); Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms 2nd Edition (1976); Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985); Advances in Pharmaceutical Sciences (David Ganderton, Trevor Jones, Eds., 1992); Advances in Pharmaceutical Sciences Vol 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, Vol 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, Vol. 40 (Gilbert S. Banker, Christopher T. Rhodes, Eds.). Estas referencias en su totalidad se incorporan por la presente por referencia a esta solicitud.

Detalles experimentales

20 Ejemplo 1: Evaluación de los efectos de agentes antiinflamatorios administrados oralmente (PO) y diariamente (QD) en ratón DBA/10lahsd de 35 días con artritis semiestablecida inducida por colágeno tipo II (MTTC/TV-9)

Introducción

25 Los ratones (DBA/11acJ, 1J o B10R111) desarrollan fiabemente poliartritis cuando se inmunizan contra el colágeno tipo II de bovino (Trentham, 1977) usando una variedad de metodologías que incluyen inmunizaciones el día 0, día 15, 16 ó 21 con o sin el impulso concurrente con endotoxina o recombinante IL-1 (Bendele, 2001). La enfermedad que se produce no es usualmente simétrica y puede ser afectada cualquier combinación de patas/articulaciones. Puesto que la medida con un calibre de los pequeños tobillos de los ratones es un reto, con frecuencia se usan sistemas clínicos de puntuación subjetivos junto con métodos de puntuación histológicos. Los tratamientos pueden ser profilácticos (comenzando en general los días 16-21) o terapéuticos (después de la observación de lesiones) y depender del protocolo de inmunización usado y de la extensión de la destrucción deseada, y pueden extenderse de 30 10 días a varias semanas. Las lesiones en las articulaciones afectadas recuerdan a las que producen en ratas los agentes biológicos causantes de la artritis inducida por el colágeno tales como el antagonista del receptor interleuquina-1 (IL-1ra) y los receptores TNF solubles (Wooley, 1993; Bakker, 1997; Joosten, 1994; Joosten, 1996; Geiger, 1993). El aumento de la incidencia y de la gravedad de la enfermedad ha sido demostrado en ratones 35 inmunizados con colágeno tipo II y a los que se les ha dado concurrentemente citoquinas tales como IL-1 (Hom, 1991; Hom, 1988).

Este estudio se diseña para determinar la eficacia de agentes antiinflamatorios potenciales (Laquinimod 0,2, 1 ó 5 mg/kg) administrados (po, qd) solos o en combinación con metotrexato (MTX) como agente antiinflamatorio potencial 40 en la inhibición de la inflamación, la destrucción de los cartílagos y la reabsorción ósea asociadas con la artritis semiestablecida inducida por colágeno tipo II en ratones. La artritis inducida por colágeno tipo II en ratón es un modelo animal reconocido en la técnica para la artritis reumatoide en seres humanos (Bendele, 2001).

En la presente memoria, a ratones DBA/101aHsd macho con artritis semiestablecida inducida por colágeno tipo II se les administró oralmente (PO) diariamente (QD) en un estudio de 18-33 días un vehículo, laquinimod (0,2, 1, ó 5 mg/kg), metotrexato (0,5 mg/kg, MTX), o laquinimod (0,2 ó 1 mg/kg) en combinación con MTX (0,5 mg/kg). Los 45 ratones fueron sacrificados el día 34. La eficacia evaluable se basó en los pesos corporales de los animales, en puntuaciones clínicas diarias de la artritis, con las puntuaciones de la artritis expresadas como área bajo la curva (AUC), e histopatología (grupos 1-3, 5 y 8 solamente) en las patas delanteras, patas traseras, y rodillas de los ratones. Los resultados histopatológicos se expresaron como 4 patas, rodillas sólo, ó 6 articulaciones (incluidas las rodillas). También se realizó la evaluación de las concentraciones de anticuerpos anti-colágeno tipo II en el suero 50 (grupos 1-3, 6 y 8 solamente). Todos los animales sobrevivieron a la terminación del estudio.

Animales

Se obtuvieron 74 ratones DBA/101aHsd (Harlan Inc.) macho que tenían 5-7 semanas de edad cuando llegaron y que pesaban aproximadamente 17-22 gramos el día 18 del estudio. Los ratones fueron de al menos 6 semanas en el momento de la primera inmunización.

55 Materiales: Agentes o fármacos en vehículo, colágeno tipo II (Elastin Products), coadyuvante completo de Freund (con suplemento de M. tuberculosis, 4 mg/mL) (Difco).

Diseño general del estudio

1. Los animales (10/grupo para la artritis, 4/grupo para normal, enjaulados 5/jaula), se aclimataron durante 8 días después de la llegada para que todos los animales fueran al menos de 7 semanas de edad.
2. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano y se les dio 150 mL de colágeno tipo II de bovino en inyecciones en la base de la cola (DO y día 21) de coadyuvante completo de Freund (Sigma) que contenían colágeno tipo II de bovino (Elastin Products, Owensville, MO) (2 mg/mL).
3. Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente por peso corporal en grupos de tratamiento el día 18 del estudio.
4. MTX fue suministrado por Bolder BioPATH, Inc. como una disolución madre 1 mg/mL adquirida a MWI y se preparó como una disolución 0,05 mg/mL en CMC al 1% para dosificar a razón de 10 mL/kg.
5. Todas las disoluciones dosis se prepararon para administrar a razón de 10 mL/kg (0,3 mL/30 g) de ratón.
6. El tratamiento se inició el día 18 del estudio y se continuó una vez diariamente, cada día (po, qd) según la tabla 1.

Tabla 1: Programación de la dosis de tratamiento

| Grupo | N | Compuesto | Ruta | Régimen | Nivel de la dosis (mg/kg) | Concentración de la dosis (mg/mL) |
|-------|----|---|------|---------|---------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 4 | No influyente | NA | NA | 0 | 0 |
| 2 | 10 | Testigo de la enfermedad tratado con vehículo | NA | NA | 0 | 0 |
| 3 | 10 | MTX (0,5 mg/kg) | po | QD | 0,5 | 0,05 |
| 4 | 10 | Laquinimod | po | QD | 0,2 | 0,02 |
| 5 | 10 | Laquinimod | po | QD | 1 | 0,1 |
| 6 | 10 | Laquinimod | po | QD | 5 | 0,5 |
| 7 | 10 | Laquinimod y MTX (0,5 mg/kg) | po | QD | 0,2 | 0,02 |
| 8 | 10 | Laquinimod y MTX (0,5 mg/kg) | po | QD | 1 | 0,1 |

* Para todos los grupos de ensayo: n = 10, Peso corporal = 30 g, Volumen de dosis = 10 mL/kg, dosis durante 17 días

7. Durante el periodo de tratamiento, se dieron puntuaciones clínicas a cada una de las patas (delantera derecha, delantera izquierda, trasera derecha, trasera izquierda) según la tabla 2.

Tabla 2: Criterios de puntuación clínica para las patas delanteras y traseras

| Puntuación | Descripción |
|------------|--|
| 0 | Normal |
| 1 | 1 articulación de las patas delanteras o traseras afectada o eritema difuso mínimo e hinchamiento |
| 2 | 2 articulaciones de las patas delanteras o traseras afectadas o eritema difuso leve e hinchamiento |
| 3 | 3 articulaciones de las patas delanteras o traseras afectadas o eritema difuso moderado e hinchamiento |
| 4 | Eritema difuso acusado e hinchamiento, o = 4 articulaciones de los dedos afectadas |
| 5 | Eritema difuso grave e hinchamiento grave de toda la pata, incapaz de flexionar los dedos |

8. Los días 21-35 se produjo el inicio de la artritis. Los ratones se pesaron los días 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, y el día 34 (día final) antes de la recogida de tejido.
9. En la necropsia, se extrajo sangre de los animales de todos los grupos vía punción cardiaca para obtener suero y los animales fueron sacrificados vía dislocación cervical. Se separaron las patas delanteras, las patas traseras y las rodillas y se colocaron en NBF al 10%. Se dejó que toda la sangre coagulara a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas antes de centrifugarse a 13.000 rpm durante 8 minutos.
10. Procesado de las articulaciones: Tras 1-2 días en un fijador y a continuación 4-5 días en un descalcificador, las articulaciones se procesaron, se embebieron, se seccionaron y se tñieron con azul de toluidina y H&E (2

portaobjetos por animal). Inicialmente sólo se procesaron las patas delanteras y traseras y las rodillas (6 articulaciones/ratón).

5 11. Métodos morfológicos para detectar patologías: Se realizó histopatología solamente en los grupos 1-3, 5 y 8. Después de 1-2 días en un fijador y 4-5 días en ácido fórmico al 5% para descalcificar, los tejidos fueron recortados, procesados para embeberlos en parafina, seccionados a 8 mm y teñidos con azul de toluidina (azul T). Las patas traseras, las patas delanteras, y las rodillas se embebieron y se seccionaron por el plano frontal. Para la evaluación histopatológica se procesaron seis articulaciones de cada animal.

12. Procesado y evaluación de tejidos:

- a. Se colocan las articulaciones en el descalcificador,
- 10 b. Se recortan las articulaciones, se lavan, se procesan los tejidos,
- c. Se embeben las articulaciones,
- d. Se seccionan los tejidos, se tiñen los tejidos,
- e. Se realiza la evaluación histopatológica, y
- f. Se procesan los datos, QC, se preparan gráficos y se escribe el informe.

15 **Métodos de puntuación histopatológicos para articulaciones de ratón con artritis inducida por colágeno tipo II**

20 Cuando se puntúan las patas o los tobillos de ratones con lesiones de artritis inducida por colágeno tipo II, tienen que considerarse la gravedad de los cambios así como varias articulaciones individuales afectadas. Cuando solo fueron afectadas 1-3 articulaciones de las patas o de los tobillos de una posibilidad de numerosas articulaciones metacarpianas/metatarsianas/de los dedos o tarsianas/tibiotarsianas, se dio una asignación arbitraria de una puntuación máxima de 1, 2 ó 3 para los parámetros dados posteriormente (tablas 3-6) dependiendo de la gravedad de los cambios. Si estuvieron implicadas más que 3 articulaciones, se aplicaron los criterios dados posteriormente (tablas 3-6) a las articulaciones más gravemente afectadas/a la mayoría de las articulaciones.

Tabla 3: Inflamación

| Puntuación | Descripción |
|------------|---|
| 0 | Normal |
| 1 | Infiltración mínima de células inflamatorias en la sinovia y en el tejido periarticular de las articulaciones afectadas |
| 2 | Infiltración leve de células inflamatorias. Si se refiere a patas, generalmente restringida a las articulaciones afectadas (1-3 afectadas) |
| 3 | Infiltración moderada con edema moderado. Si se refiere a patas, restringida a las articulaciones afectadas, en general 3-4 articulaciones + la muñeca o el tobillo |
| 4 | Infiltración acusada que afecta a la mayor parte de las áreas con edema acusado, pueden estar presentes 1 ó 2 articulaciones no afectadas |
| 5 | Infiltración difusa grave con edema grave que afecta a todas las articulaciones y a los tejidos periarticulares |

25 Tabla 4: Pannus

| Puntuación | Descripción |
|------------|---|
| 0 | Normal |
| 1 | Infiltración mínima de pannus en el cartílago y el hueso subcondrial, zonas marginales |
| 2 | Infiltración leve con destrucción de tejido duro en zona marginal en las articulaciones afectadas |
| 3 | Infiltración moderada con destrucción moderada de tejido duro en las articulaciones afectadas |
| 4 | Infiltración acusada con destrucción acusada de la arquitectura de las articulaciones, que afecta a la mayoría de las articulaciones |
| 5 | Infiltración grave asociada con la destrucción total o casi total de la arquitectura de las articulaciones, afecta a todas las articulaciones |

Tabla 5: Daño al cartílago

| Puntuación | Descripción |
|------------|--|
| 0 | Normal |
| 1 | Mínimo: pérdida en general de mínima a leve de la tinción con azul de toluidina sin ninguna pérdida obvia de condrocitos o desorganización obvia del colágeno en las articulaciones afectadas |
| 2 | Leve: pérdida en general leve de la tinción con azul de toluidina con área focalizadas de pérdida de condrocitos y/o desorganización del colágeno en algunas articulaciones afectadas |
| 3 | Moderado: pérdida en general moderada de la tinción con azul de toluidina con pérdida multifocalizada de condrocitos y/o desorganización del colágeno en las articulaciones afectadas, parte de la matriz permanece en alguna superficie afectada con áreas de pérdida grave de la matriz |
| 4 | Acusado: pérdida acusada de la tinción con azul de toluidina con pérdida multifocalizada acusada (profundidad en zona profunda) de condrocitos y/o desorganización del colágeno en la mayor parte de las articulaciones, si es en la rodilla – una superficie con pérdida total o casi total del cartílago |
| 5 | Grave: pérdida difusa grave de la tinción con azul de toluidina con pérdida multifocalizada acusada (profundidad en marca de marea) de condrocitos y/o desorganización del colágeno en todas las articulaciones, si es en la rodilla – 2 ó más superficies con pérdida total o casi total del cartílago |

Tabla 6: Reabsorción ósea

| Puntuación | Descripción |
|------------|--|
| 0 | Normal |
| 1 | Mínima: pequeñas áreas de reabsorción, no fácilmente evidentes con bajo aumento, osteoclastos escasos en las articulaciones afectadas, restringida a zonas marginales |
| 2 | Leve: áreas de reabsorción más numerosas, no fácilmente evidentes con bajo aumento, osteoclastos más numerosas en las articulaciones afectadas, restringida a zonas marginales |
| 3 | Moderada: reabsorción obvia de hueso cortical y trabecular medular sin defectos de espesor completos en el córtex, pérdida de algunos trabéculas medulares, lesión evidente con bajo aumento, osteoclastos más numerosas en las articulaciones afectadas |
| 4 | Acusada: defectos de espesor completos en el hueso cortical, con frecuencia con distorsión del perfil de la superficie cortical restante, acusada pérdida de hueso medular, numerosos osteoclastos, afecta a la mayoría de las articulaciones |
| 5 | Grave: defectos de espesor completos en el hueso cortical y destrucción de la arquitectura de las articulaciones de todas las articulaciones |

- 5 Para cada animal, se determinaron para cada una de las 6 articulaciones analizadas las puntuaciones de inflamación, pannus, daño de los cartílagos y daño óseo. Se determinaron la puntuación de la suma total (todas las 6 articulaciones) de los animales y la puntuación media de las seis articulaciones de los animales así como las sumas y las medias de cada uno de los parámetros individuales. Los datos también se expresaron como media de las patas (4 articulaciones) o rodillas (2 articulaciones). A continuación, se compararon los parámetros de los diversos grupos con animales testigo de la enfermedad.

Análisis estadístico

15 Los datos clínicos de las puntuaciones de las patas (media por animal) se analizaron para determinar el área bajo la curva de dosificación (AUC) para los días 18-34 del estudio. Para el cálculo de AUC, las puntuaciones medias diarias para cada ratón se introdujeron en el programa informático Microsoft Excel y se calculó el área entre los días de tratamiento después del inicio de la enfermedad y el día final. Se determinaron las medias de cada grupo y se calculó el porcentaje de inhibición a partir de los testigos de artritis comparando los valores de los animales tratados y normales. El análisis estadístico de los datos clínicos e histopatológicos se realizó usando el ensayo de la t de Student con un valor significativo fijado en $p \leq 0,05$.

El porcentaje de inhibición de parámetros clínicos y AUC se calcula usando la siguiente fórmula:

20
$$\text{Inhibición (\%)} = (B/A) \times 100$$

En la que:

A = Media de los testigos de la enfermedad – media de los normales

B = Media de los tratados – Media de los normales

Resultados

5 Este estudio evalúa los efectos de agentes antiinflamatorios administrados po, qd en un modelo animal de artritis reumatoide de ser humano. Los resultados indican que el efecto de la combinación de laquinimod y metotrexato sobre los síntomas de artritis reumatoide es significativamente mayor que el efecto aditivo de cada agente solo.

10 La pérdida de peso corporal debida a la artritis se inhibió significativamente mediante el tratamiento con 1 mg/kg de laquinimod + MTX (62% de inhibición) en comparación con los testigos de la enfermedad tratados con vehículo. La pérdida de peso corporal de este grupo también fue significativamente (69%) inhibida en comparación con ratones tratados con MTX. La pérdida de peso corporal para todos los otros grupos de tratamiento no difirió significativamente de los testigos tratados con vehículo.

15 Los ratones testigo de la enfermedad tratados con vehículo tuvieron una incidencia de la enfermedad del 100% antes del día 27 del estudio. Los ratones tratados con 0,2 mg/kg de laquinimod tuvieron una incidencia de la enfermedad del 100% antes del día 28 del estudio. Los animales tratados con MTX, 1 mg/kg de laquinimod, ó 0,2 mg/kg de laquinimod + MTX tuvieron una incidencia menor de la enfermedad del 90% a la terminación del estudio. Una incidencia menor de la enfermedad también se vio en ratones tratados con 5 mg/kg de laquinimod (70% de incidencia) ó 1 mg/kg de laquinimod + MTX (60%).

20 Las puntuaciones clínicas diarias de la artritis se redujeron significativamente en ratones tratados con MTX (*días significativos 27-34), 0,2 mg/kg de laquinimod (*d 28-34), 1 mg/kg de laquinimod (*d 25-34), 5 mg/kg de laquinimod (*d 24-34), 0,2 mg/kg de laquinimod + MTX (* d24-34) ó 1 mg/kg de laquinimod + MTX (*d 24-34) en comparación con los testigos tratados con vehículo. Las puntuaciones clínicas diarias también se redujeron significativamente por tratamiento con 0,2 mg/kg de laquinimod + MTX (*d 29-34) ó 1 mg/kg de laquinimod + MTX (*d 26-34) en comparación con ratones tratados solamente con MTX. Antes de la aparición de la enfermedad en el grupo testigo tratado con vehículo, las puntuaciones clínicas diarias de la artritis se elevaron significativamente en ratones tratados con 0,2 mg/kg de laquinimod (*d 23), 1 mg/kg de laquinimod (*d 22-24), ó 5 mg/kg de laquinimod (*d 22-23) (Figura 3).

30 Las puntuaciones clínicas de la artritis expresadas como área bajo la curva (AUC) fueron significativamente menores en ratones tratados con MTX (50% de reducción), 0,2 mg/kg de laquinimod (32%), 1 mg/kg de laquinimod (52%), 5 mg/kg de laquinimod (69%), 0,2 mg/kg de laquinimod + MTX (82%), ó 1 mg/kg de laquinimod + MTX (95%) en comparación con los testigos tratados con vehículo. Las puntuaciones clínicas de la artritis AUC también fueron significativamente reducidas mediante el tratamiento con 0,2 mg/kg de laquinimod + MTX (65%) ó 1 mg/kg de laquinimod + MTX (90%) en comparación con ratones tratados con MTX.

35 El análisis en suero de las concentraciones de anti-TTC se realizó solamente en ratones de los grupos 1-3, 6, y 8. El análisis del suero reveló que los ratones testigo tratados con vehículo tuvieron concentraciones de 27.062,50 unidades/mL. Las concentraciones de anti-TTC en el suero no fueron significativamente afectadas por tratamiento con 5 mg/kg de laquinimod, 1 mg/kg de laquinimod + MTX, o MTX en comparación con los testigos tratados con vehículo.

40 Los animales testigo de la enfermedad tuvieron cambios histopatológicos, consistentes con los vistos en la artritis inducida por el colágeno tipo II, en la mayoría de las articulaciones, con puntuaciones que variaron de mínima a grave. La alteración microscópica incluyó infiltración de la sinovia y del tejido periarticular con neutrófilos y células inflamatorias mononucleares (inflamación), pannus en zonas marginales y reabsorción ósea y daño de los cartílagos (pérdida de proteoglicanos, muerte de condrocitos y destrucción de la matriz de colágeno).

45 Todos los parámetros histopatológicos de las patas fueron significativamente reducidos hacia valores normales en ratones tratados con 1 mg/kg de laquinimod (61% de reducción de las puntuaciones sumadas), 1 mg/kg de laquinimod + MTX (96%), o MTX (46%) en comparación con los testigos tratados con vehículo. El tratamiento con 1 mg/kg de laquinimod + MTX también redujo significativamente (93%) todos los parámetros histopatológicos de las patas en comparación con ratones tratados con MTX.

50 Todos los parámetros histopatológicos de las rodillas fueron significativamente reducidos hacia valores normales en ratones tratados con 1 mg/kg de laquinimod + MTX (97% de reducción de las puntuaciones sumadas) en comparación con los testigos tratados con vehículo. El tratamiento de este grupo también redujo significativamente (95%) todos los parámetros histopatológicos de las rodillas en comparación con ratones tratados con MTX. El tratamiento con 1 mg/kg de laquinimod redujo significativamente la inflamación de las rodillas (51% de reducción), pannus (59%), daño de los cartílagos (62%), y las puntuaciones sumadas de las rodillas (57%) en comparación con los testigos tratados con vehículo.

55 Todos los parámetros histopatológicos medios de las seis articulaciones fueron significativamente reducidos hacia valores normales en ratones tratados con 1 mg/kg de laquinimod (60% de reducción de las puntuaciones sumadas),

1 mg/kg de laquinimod + MTX (96%), o MTX (43%) en comparación con los testigos tratados con vehículo. El tratamiento con 1 mg/kg de laquinimod + MTX también redujo significativamente (93%) en todos los parámetros histopatológicos de las seis articulaciones en comparación con ratones tratados con MTX (Figuras 1 y 2).

5 Como se muestra en las Figuras 1 y 2, la administración de laquinimod en combinación con metotrexato redujo significativamente la gravedad de varios síntomas asociados con la artritis reumatoide, que incluyen inflamación, pannus, daño de los cartílagos y reabsorción ósea en las seis articulaciones del ratón DBA/101aHsd (cuatro patas y dos rodillas) en comparación con el grupo testigo, el único grupo de tratamiento con metotrexato y el único grupo de tratamiento con laquinimod.

10 La Figura 1 muestra que la administración de laquinimod en combinación con metotrexato eliminó sustancialmente el pannus y el daño óseo en las seis articulaciones de los sujetos de ensayo, reduciendo sus puntuaciones medias hasta casi cero. La Figura 2 muestra que la administración de laquinimod en combinación con metotrexato eliminó sustancialmente los síntomas globales asociados con la artritis reumatoide en los sujetos de ensayo, reduciendo su puntuación acumulada en 96%.

15 Por tanto, estos resultados muestran que la administración de laquinimod en combinación con metotrexato es sustancialmente más eficaz en el tratamiento de un sujeto que padece artritis reumatoide activa que cada agente cuando se administra solo. Sorprendentemente, los inventores han encontrado que laquinimod y metotrexato trabajan sinérgicamente en el tratamiento de la artritis reumatoide activa.

Referencias

1. "Rheumatoid Arthritis" (1999) The Merck Manual, 7th Edition, pp 416-423.
- 20 2. 0130282 99506202. A double blind, randomized, repeat-dose, dose escalation study of ABR-215062 versus placebo in healthy volunteers and patients with sclerosis multiple. Active Biotech Research AB, Sweden. Final Clinical Trial Report, January 2002.
3. 03506207. An open safety study on laquinimod (ABR-215062) in patients with sclerosis multiple. Active Biotech Research AB, Sweden. Final Clinical Trial Report, April 2007.
- 25 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, February 2004.
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.
- 30 6. 9830089. PNU-215045, PNU-215062: Effects on cytochrome P450 enzymes in female Sprague Dawley rats. Lund Research Center AB, Active-Biotech Group, Sweden. Final Report, November 1998.
7. 9830133. PNU-215062: Effects on cytochrome P450 enzymes in female Sprague Dawley rats. Lund Research Center AB, Active Biotech Group, Sweden. Final Report, November 1998.
- 35 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, June 2009.
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.
- 40 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.
11. Bendele, A.M. (2001) "Animal Models of Rheumatoid Arthritis" *J Musculoskel Neuron Interact*, 1(4):377-385.
- 45 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.
13. Hom J, Bendele AM, Carlsson D. In vivo administration with IL-1 accelerates the development of collagen induced arthritis in mice. *J Immunol.* 1988; 141:834-841.
14. Hom J, Gliszcynski 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.
- 5 17. Publicación de Solicitud Internacional PCT No. WO 2007/047863, publicada el 26 de abril de 2007, fecha de registro internacional 18 de octubre de 2006.
18. Publicación de Solicitud Internacional PCT No. WO 2007/146248, publicada el 21 de diciembre de 2007, fecha de registro internacional 12 de junio de 2007.
- 10 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 (Abstract).
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, June 2009.
- 15 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. Patente de EE.UU. No. 6.077.851, expedida el 20 de junio de 2000 a Bjork, et al.
- 20 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.

REIVINDICACIONES

1. Laquinimod o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para usar en combinación con metotrexato en el tratamiento de un sujeto que padece artritis reumatoide.
- 5 2. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad de laquinimod o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y una cantidad de metotrexato para usar en el tratamiento de un sujeto que padece artritis reumatoide.
3. Laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según la reivindicación 1, donde el tratamiento comprende administrar periódicamente al sujeto una cantidad de laquinimod o de la sal farmacéuticamente aceptable y una cantidad de metotrexato, donde las cantidades cuando se toman conjuntamente son efectivas para tratar al sujeto.
- 10 4. Laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según la reivindicación 3, donde la cantidad de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y la cantidad de metotrexato cuando se toman conjuntamente son más efectivas para tratar al sujeto que cuando cada agente se administra solo.
- 15 5. Laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según la reivindicación 3 ó 4, donde la cantidad de laquinimod o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y la cantidad de metotrexato cuando se toman conjuntamente son efectivas para reducir un síntoma clínico de artritis reumatoide en el sujeto.
6. Laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según las reivindicaciones 3-5, donde la sal farmacéuticamente aceptable de laquinimod es laquinimod de sodio.
7. Laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, donde la administración periódica de laquinimod o de su sal farmacéuticamente aceptable se efectúa oralmente.
- 20 8. Laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, donde la cantidad de laquinimod administrada es 0,0005 - 10 mg/kg/día ó 0,1-2,0 mg/día.
9. Laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, donde la cantidad de metotrexato administrada es 0,02 - 1,0 mg/kg/día ó 1-3 mg/día.
- 25 10. Laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 3-9, donde además el tratamiento comprende administrar un fármaco antiinflamatorio no esteroide (NSAID), un salicilato, un fármaco de acción lenta, un compuesto de oro, una hidroxiclороquina, una sulfasalazina, una combinación de fármaco de acción lenta, un corticoesteroide, un fármaco citotóxico, un fármaco inmunosupresor y/o un anticuerpo.
- 30 11. Laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 3-10, donde la administración periódica de laquinimod o de su sal farmacéuticamente aceptable y metotrexato elimina sustancialmente un síntoma o reduce la gravedad de un síntoma asociado con la artritis reumatoide.
- 35 12. Laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 3-10, donde la administración periódica de laquinimod o de su sal farmacéuticamente aceptable y metotrexato reduce el número de articulaciones afectadas por un síntoma asociado con la artritis reumatoide.
- 40 13. Laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 3-12, donde la administración periódica de laquinimod o de su sal farmacéuticamente aceptable y metotrexato elimina los sedimentos urinarios.
14. Laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 3-13, donde cada una de las cantidades de laquinimod o de su sal farmacéuticamente aceptable cuando se toman solas, y la cantidad de metotrexato cuando se toma sola son efectivas para tratar al sujeto.
15. Laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 3-14, donde el sujeto está recibiendo terapia con metotrexato antes de iniciar la terapia con laquinimod.

FIGURA 1

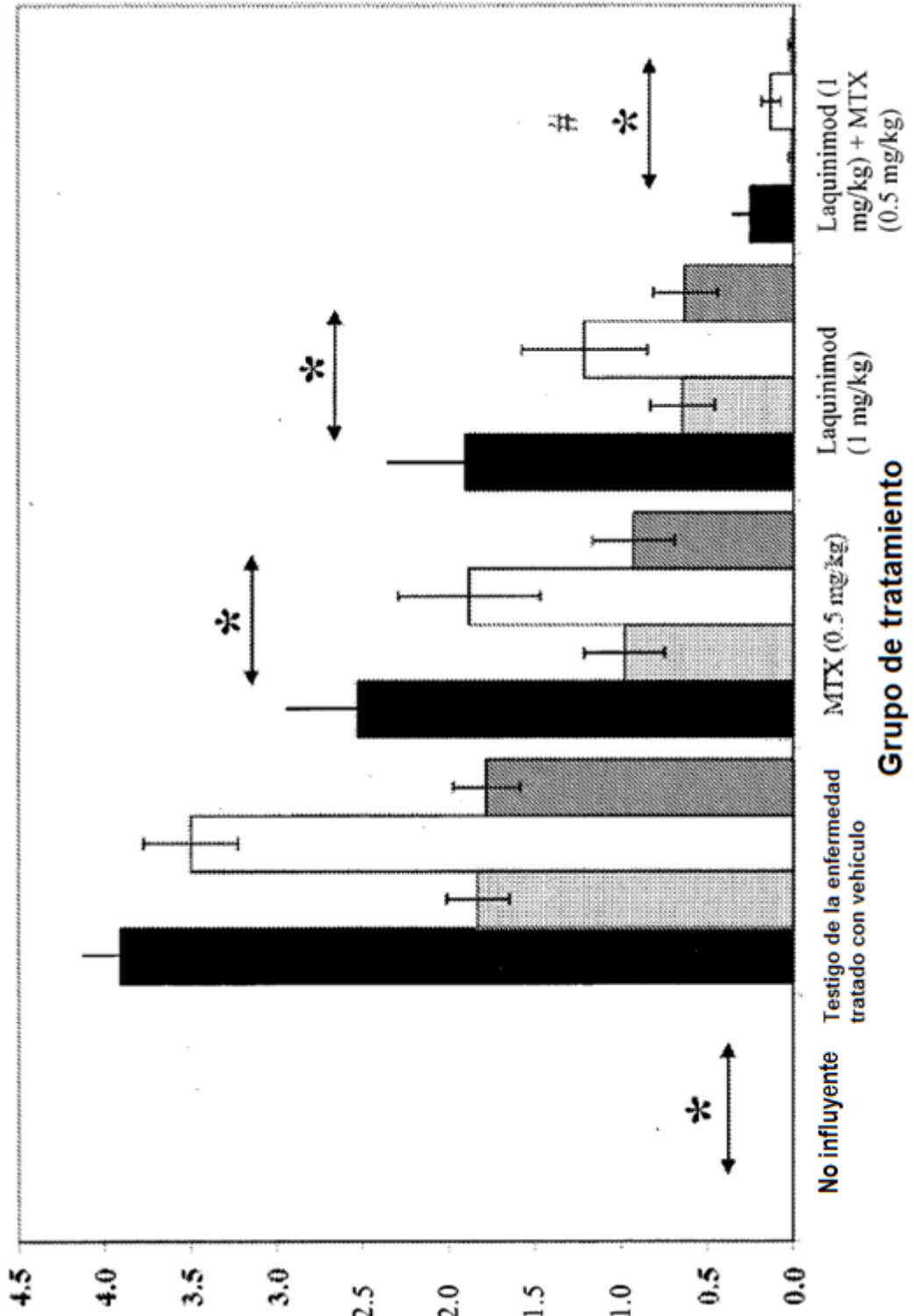


FIGURA 2

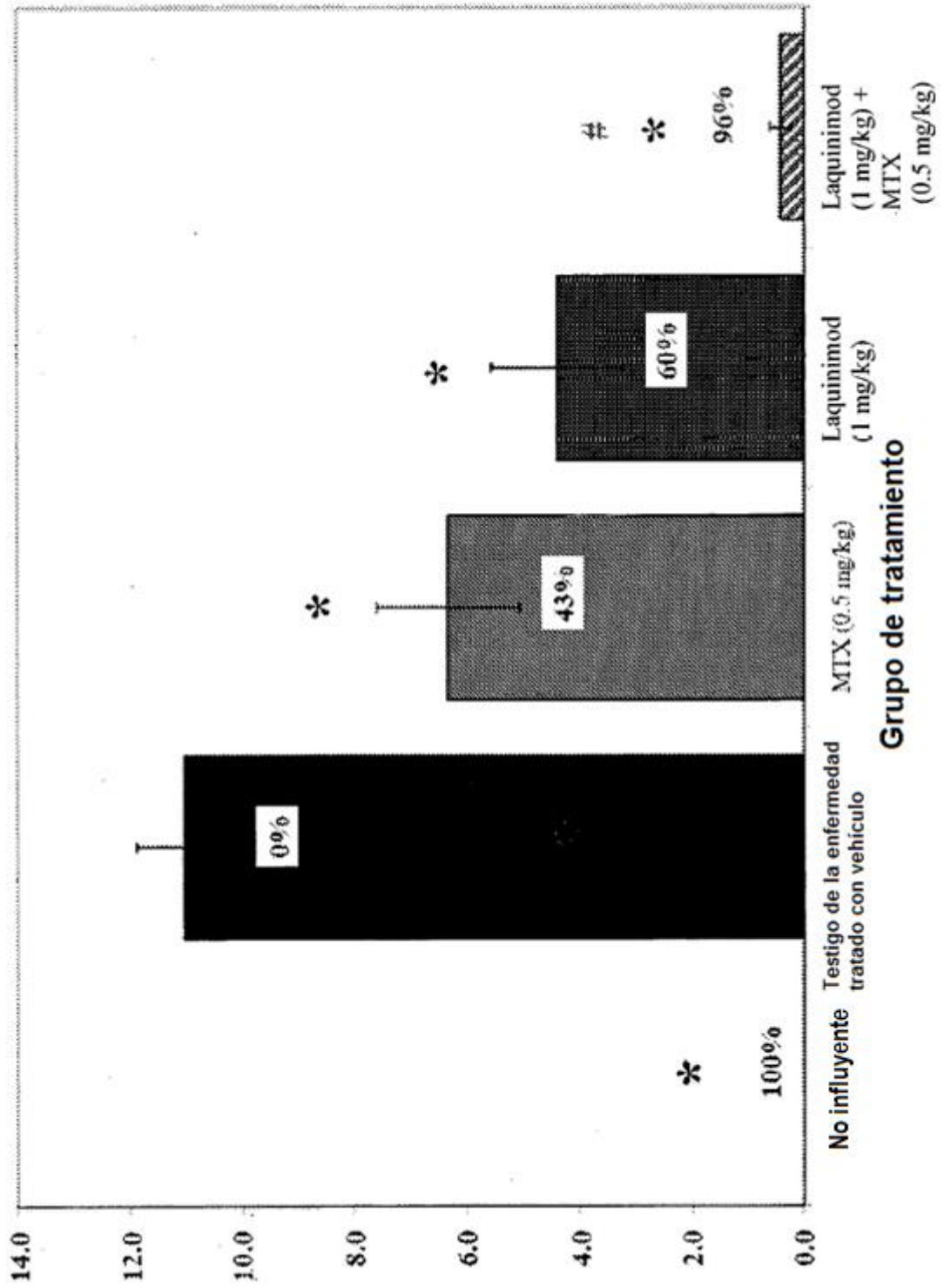


FIGURA 3

