

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 504**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2010** **E 10716450 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014** **EP 2425250**

54 Título: **Procedimientos de supervisión de la eficacia de anticuerpos anti-IL-2R en pacientes con esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

27.04.2009 US 173138 P

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

22.04.2014

73 Titular/es:

ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC. (100.0%)
1500 Seaport Boulevard
Redwood City, CA 94063 , US

72 Inventor/es:

SHERIDAN III, JAMES PETER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 456 504 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

Procedimientos de supervisión de la eficacia de anticuerpos anti-IL-2R en pacientes con esclerosis múltiple

3. Antecedentes

5 El objetivo del tratamiento de la esclerosis múltiple (EM) es prevenir discapacidades permanentes y retardar la progresión de la enfermedad. Un objetivo terapéutico a plazo más corto se centra en reducir la tasa de recidiva. El IFN-beta es el agente de mantenimiento crónico más habitualmente usado para tratar la EM. Los inconvenientes del tratamiento con IFN-beta incluyen respuesta inadecuada en el menos el 30% de los pacientes después del inicio de la terapia con IFN-beta (Bertolotto, y col., 2002, J Neurosurg Psychiatry, 73(2):148-153; y Durelli, 2004, J Neurol., 251 Supl. 4:IV13-IV24), y la inducción de anticuerpos anti-interferón en el 7% al 42% de los pacientes (Sorensen, 10 2003 Lancet, 362:1184-91). Aunque se usan otros agentes para tratar la EM, incluyendo corticosteroides, acetato de glatiramer, mitoxantrona, y natalizumab, estos agentes son eficaces sólo parcialmente en el tratamiento de las recidivas clínicas, y algunos portan significativos riesgos de seguridad.

15 Como los agentes que se están usando actualmente para tratar la EM no son completamente eficaces en el tratamiento de la enfermedad, es deseable identificar y validar clínicamente marcadores que puedan usarse para controlar la respuesta clínica en un individuo diagnosticado con EM a un agente terapéutico como medio para optimizar y/o cambiar el régimen de tratamiento de ese individuo.

4. Sumario

20 Un agente que se ha mostrado prometedor para tratar la EM en ensayos clínicos es daclizumab. Daclizumab se evaluó como tratamiento para EM en un estudio de rango de dosis, multicéntrico, controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado, en fase 2 (el estudio CHOICE). Al final del periodo de dosificación de 24 semanas, en comparación con el placebo de IFN-beta, hubo una reducción del 25% en lesiones que potencian el contraste con gadolinio (Gd-CEL) nuevas o aumentadas detectadas por imágenes de resonancia magnética (RM) en el grupo de 1 mg/kg de daclizumab y una reducción del 72% en el grupo de 2 mg/kg de daclizumab (FIG. 1). Ambos regímenes de daclizumab se asociaron con una reducción aproximada del 35% en la tasa de recidiva anualizada a las 24 semanas (Montalban, X. y col., Multiple Sclerosis, 13: S 18-S 18 Supl. 2 OCT 2007; y, Kaufman, M.D., y col., Neurology, 70 25 (11): A220-A220 Supl. 1 MAR 11 2008).

30 Se recogieron muestras de sangre de los pacientes durante todo el estudio CHOICE y se analizaron para determinar los niveles de subconjuntos de células inmunes y los marcadores de activación asociados antes de, durante, y después del tratamiento con daclizumab. Se observaron reducciones reversibles y rápidas en linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺, un subconjunto de linfocitos T, durante la fase de tratamiento con daclizumab para los grupos de dosificación de 1 mg/kg y 2 mg/kg. Las reducciones dependientes de la exposición en las cantidades de linfocitos T activados fueron coherentes con las reducciones dependientes de la exposición en Gd-CEL nuevas o aumentadas y las reducciones de la tasa de recidiva anualizada.

35 Estos resultados indican que pueden usarse los cambios en los recuentos de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ como un biomarcador de la respuesta clínica a daclizumab en un paciente diagnosticado con EM. Por consiguiente, los procedimientos descritos en el presente documento desvelan el uso de recuentos de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ para controlar la eficacia de daclizumab en un paciente diagnosticado con EM. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende determinar el nivel de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en un paciente diagnosticado con EM después de exposición a daclizumab, en el que una disminución en el nivel de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ indica que el daclizumab es eficaz en mejorar al menos un síntoma de EM en el paciente tratado. Pueden recogerse muestras biológicas del paciente tratado una o más veces antes de, durante, y/o después del tratamiento con daclizumab.

45 Los síntomas de EM que pueden estabilizarse o mejorarse usando los procedimientos descritos en el presente documento incluyen, aunque sin limitación, reducir la tasa de recidiva, establecer o reducir la tasa de progresión de discapacidad medida por valores convencionales tales como el valor de la Escala Expandida del Nivel de Discapacidad (EEND), disminuir la cantidad de Gd-CEL nuevas o aumentadas, y/o disminuir la cantidad de lesiones IRM T2 nuevas o aumentadas. El sujeto que se está tratado puede tener formas recidivantes de EM, incluyendo EM recidivante/remitente, EM progresiva secundaria, EM recidivante progresiva, o EM recidivante agravada. Además de daclizumab, pueden usarse otros anticuerpos contra IL-2R, tales como anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, o anticuerpos completamente humanos que se unen específicamente a la cadena alfa o p55 (Tac) del receptor de IL-2 en los procedimientos descritos en el presente documento.

50 Debe apreciarse que tanto la anterior descripción general como la siguiente descripción detallada son ejemplares y explicativas únicamente y no son restrictivas de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento. En la presente solicitud, el uso del singular incluye el plural salvo que se indique específicamente lo contrario. Además, el uso de "o" significa "y/o" salvo que se indique lo contrario. Asimismo, "comprenden", "comprende", "que comprende", "incluyen," "incluye" y "que incluye" no pretenden ser limitantes.

5. Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es un gráfico de barras que representa los datos que demuestran la reducción en las lesiones que potencian el contraste con gadolinio al final de un periodo de dosificación de 24 semanas con daclizumab;

5 La FIG. 2 es un gráfico de líneas que representa los datos que demuestran reducciones rápidas y reversibles en los linfocitos T activados HLA-DR⁺CD4⁺ durante la fase de tratamiento con daclizumab; y

La FIG. 3 es un gráfico de líneas que representa los datos que demuestran la relación entre el área del régimen estable con daclizumab bajo la curva (AUC) y las disminuciones en los recuentos de linfocitos T activados HLA-DR⁺CD4⁺ en el que una reducción en las células HLA-DR⁺CD4⁺ está representada como un número positivo en el eje y.

10 6. Descripción detallada

6.1 Definiciones

Como se usa en el presente documento, los siguientes términos están concebidos para tener los siguientes significados:

15 El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactiva con, un antígeno particular, e incluye formas de anticuerpos policlonales, monoclonales, modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, rIgG) y modificadas de otra manera, incluyendo aunque sin limitación anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos heteroconjugados (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, incluyendo por ejemplo, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, y scFv y formas multiméricas de fragmentos de unión a antígeno, incluyendo por ejemplo, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Además, salvo que se indique de otro modo, se entiende que la expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) incluye tanto moléculas intactas, así como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que son capaces de unirse específicamente a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación del animal o planta, y pueden tener menos unión no específica a tejido que un anticuerpo intacto (Wahl y col., 1983, J. Nucl. Med. 24:316).

25 El término "scFv" se refiere a un anticuerpo Fv de cadena sencilla en que los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo tradicional se han unido para formar una cadena.

Referencias a "VH" se refieren a una región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena pesada de un Fv, scFv, o Fab. Referencias a "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo la cadena ligera de un Fv, scFv, dsFv o Fab. Los anticuerpos (Ab) e inmunoglobulinas (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Aunque los anticuerpos muestran especificidad de unión por una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas tipo anticuerpo que carecen de especificidad de diana. Los anticuerpos e inmunoglobulinas nativas son habitualmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo.

40 Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) también se conocen como regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones flanqueantes (FR). Como se sabe en la técnica, la posición/límite de aminoácidos que delinea una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y las diversas definiciones conocidas en la técnica. Algunas posiciones dentro de un dominio variable pueden verse como posiciones hipervariables híbridas en que estas posiciones pueden considerarse dentro de una región hipervariable bajo una serie de criterios mientras que se consideran fuera de una región hipervariable bajo una serie diferente de criterios. Una o más de estas posiciones también pueden encontrarse en regiones hipervariables ampliadas. La divulgación proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada una cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β, conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en cercana proximidad mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a diana de los anticuerpos (véase Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987)). Como se usa en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácido de inmunoglobulina se hace de acuerdo con el sistema de numeración de restos de aminoácido de inmunoglobulina de Kabat y col., salvo que se indique de otro modo.

55 La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a diana o variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. Un fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y

unión a diana. Esta región consta de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una estrecha asociación no covalente (dímero VH-VL). Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a diana sobre la superficie del dímero VH-VL. De forma colectiva, las seis CDR confieren especificidad de unión a la diana al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para una diana) tiene la capacidad de reconocer y unirse a la diana, aunque a una afinidad menor que el sitio completo de unión. Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión a la diana.

El fragmento Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos Fab' se producen mediante escisión del enlace disulfuro en las cisteínas bisagra del producto de digestión con pepsina de F(ab')₂. Los especialistas en la técnica conocen acoplamiento químicos adicionales de fragmentos de anticuerpo.

"Epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al cual se une un anticuerpo. Los epítopos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden en tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los procedimientos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

La determinación de si dos anticuerpos se unen sustancialmente al mismo epítipo se consigue usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como un ensayo de competición. En la realización de un estudio de competición de anticuerpos entre un anticuerpo de control (por ejemplo, daclizumab) y cualquier anticuerpo de ensayo, primero se puede marcar el anticuerpo de control con un marcador detectable, tal como biotina, una enzima, marcador radiactivo, o marcador fluorescente para posibilitar la posterior identificación. En dicho ensayo, se mide la intensidad del marcador unido en una muestra que contiene el anticuerpo de control marcado y se mide la intensidad de marcador unido en la muestra que contiene el anticuerpo de control y el anticuerpo de ensayo no marcado. Si el anticuerpo de ensayo no marcado compite con el anticuerpo marcado uniéndose a un epítipo solapante, la intensidad del marcador detectado aumentará relativa a la unión en la muestra que contiene solamente el anticuerpo de control marcado. Se conocen en la técnica otros procedimientos para determinar la unión.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se obtiene de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota, o fago, y no al procedimiento por el cual se produce. Pueden prepararse anticuerpos inmunológicamente reactivos con un antígeno particular usando una amplia diversidad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes, y de presentación en fagos, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en la técnica y mostradas, por ejemplo, en Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1988); Hammerling y col., en: "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas," Elsevier, N.Y. (1981), pág. 563 681 (ambos cuales se incorporan en el presente documento por referencia en sus totalidades).

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de inmunoglobulina en que (a) la región constante, o una parte de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión a antígeno (región variable) esté ligado a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una parte de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada. Cualquiera de los anticuerpos anti-IL-2R descritos en el presente documento puede ser quimérico.

La expresión "anticuerpo humanizado" o "inmunoglobulina humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región flanqueante humana, al menos una y preferentemente todas las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano, y en que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente el 85%, al menos el 90%, y al menos el 95% idéntica. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativa. A menudo, los restos flanqueantes en las regiones flanqueantes humanas se sustituirán con los restos correspondientes del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones en la región flanqueante se identifican por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de los restos de CDR y

de la región flanqueante para identificar restos flanqueantes importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencia para identificar restos flanqueantes inusuales en posiciones particulares. Véase, por ejemplo, Queen y col., patentes de Estados Unidos N°: 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 6.180.370 (cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad). Los anticuerpos pueden humanizarse usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; patentes de Estados Unidos N° 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), revestimiento o recubrimiento (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Mol. Immunol., 28:489-498 (1991); Studnicka y col., Prot. Eng. 7:805-814 (1994); Roguska y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:969-973 (1994), y redistribución de cadenas (patente de Estados Unidos N° 5.565.332), todas las cuales se incorporan por la presente por referencia en sus totalidades. Los anticuerpos anti-IL-2R descritos en el presente documento incluyen anticuerpos humanizados, tales como anticuerpo de ratón humanizados, anticuerpos completamente humanos, y anticuerpos de ratón.

Un "anticuerpo anti-IL-2R" es un anticuerpo que se une específicamente a un receptor de IL-2. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-IL-2R se une al receptor IL-2 de alta afinidad ($K_d \sim 10$ pM). Este receptor es un complejo receptor de membrana que consta de dos subunidades: IL-2R-alfa (también conocida como antígeno de activación de linfocitos T (Tac), CD25, o p55) e IL-2R-beta (también conocida como p75 o CD122). En otras realizaciones, un anticuerpo anti-IL-2R se une al receptor de IL-2 de afinidad intermedia ($K_d = 100$ pM), que consta de la subunidad p75 y una cadena gamma. En otras realizaciones, un anticuerpo anti-IL-2R se une al receptor de baja afinidad ($K_d = 10$ nM), que está formado solamente por p55.

Los anticuerpos anti-IL-2R adecuados para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, o anticuerpos completamente humanos. Ejemplos de anticuerpos anti-IL-2R capaces de unirse a Tac (p55) incluyen, aunque sin limitación, Zenapax®, el anticuerpo quimérico basiliximab (Simulect®), BT563 (véase Baan y col., Transplant. Proc. 33:224-2246, 2001), y 7G8, y HuMax-TAC en desarrollo por Genmab. El anticuerpo mik-beta1 se une específicamente a la cadena beta de IL-2R humano. Se conocen en la técnica anticuerpos adicionales que se unen específicamente al receptor de IL-2. Por ejemplo, véase la patente de Estados Unidos N° 5.011.684; la patente de Estados Unidos N° 5.152.980; la patente de Estados Unidos N° 5.336.489; la patente de Estados Unidos N° 5.510.105; la patente de Estados Unidos N° 5.571.507; la patente de Estados Unidos N° 5.587.162; la patente de Estados Unidos N° 5.607.675; la patente de Estados Unidos N° 5.674.494; la patente de Estados Unidos N° 5.916.559.

6.2 Descripción detallada

La EM es una enfermedad inflamatoria/desmielinizante del SNC que es una de las causas principales de discapacidad neurológica en adultos jóvenes (Bielekova, B. y Martin, R., 1999, Curr Treat Options Neurol. 1:201-219). La patogénesis observada en pacientes de EM es, al menos en parte, atribuible a activación aberrante de linfocitos T. Daclizumab es un anticuerpo humanizado que se une a la cadena alfa de IL-2R (también conocida como antígeno de activación de linfocitos T (TAC), CD25 o p55). CD25 está presente a bajos niveles en linfocitos T humanos en reposo, pero está significativamente regulada positivamente en linfocitos T activados, permitiéndoles recibir una señal de IL-2 de alta afinidad (Waldmann, y col., 1998, Int Rev Immunol, 16:205-226). Se ha propuesto que la unión selectiva de CD25 por daclizumab inhibe los eventos de transducción de señales de IL-2R (Goebel, J., y col., 2000, Transplant Immunol, 8:153-159, Tkaczuk, J., 2001, Transplant Proc, 33:212-213) y bloquea la activación de linfocitos T (Queen, C., y col., 1989, Proc Natl Acad Sci USA, 86:10029-10033).

Los procedimientos descritos en el presente documento se basan en el descubrimiento de que se observan reducciones rápidas en linfocitos T activados HLA-DR⁺CD4⁺ en pacientes de EM tratados con daclizumab (véase la FIG. 2). Las reducciones rápidas en las cantidades de linfocitos T activados son coherentes con las reducciones en las Gd-CEL observadas en pacientes de EM tratados con daclizumab (Montalban, X. y col., Multiple Sclerosis, 13: S18-S18 Supl. 2 OCT 2007; y, Kaufman, M.D., y col., Neurology, 70 (11): A220-A220 Supl. 1 MAR 11 2008). Estas observaciones sugieren que cambios en el nivel de linfocitos T activados HLA-DR⁺CD4⁺ serían una herramienta útil para controlar la respuesta clínica en pacientes de EM a daclizumab o un anticuerpo anti-IL-2R capaz de inhibir los eventos de transducción de señales de IL-2R.

Varios estudios han investigado la expresión de HLA-DR⁺ en muestras sanguíneas obtenidas de pacientes con enfermedades autoinmunes, incluyendo EM, para determinar si la expresión de HLA-DR⁺ podría usarse para controlar la progresión de la enfermedad durante la terapia con fármaco. Ninguno de estos estudios ha demostrado que la expresión de HLA-DR⁺ pudiera usarse para controlar la progresión de la enfermedad en respuesta a terapia con fármaco. Por ejemplo, Ferrarini y col., controlaron la expresión de HLA-DR y CD25 en linfocitos T, así como células CD3⁺HLA-DR⁺ y CD4⁺CD25⁺ en circulación en pacientes con esclerosis múltiple recidivante-remitente durante terapia con interferón beta 1b y determinaron que la expresión de HLA-DR no podía usarse para controlar la actividad de EM durante terapia con IFN beta 1b (Ferrarini y col., 1998, Multiple Sclerosis, 4:174-177). Otros estudios también han intentado establecer un vínculo entre la expresión de marcadores de activación de linfocitos T incluyendo HLA-DR y la actividad de la enfermedad y/o la terapia con fármaco en EM (véase, por ejemplo, Tang, M. T., y col., 2008, Multiple Sclerosis, 14:S181-S181 Supl. 1; Aristimuno, C., y col., 2008, Journal Neuroimmunology, 204:131-135; Heinrich, A., y col., 2006, Acta Neurol Scand, 113:248-255; Sanchez-Ramon, S., y col., 2005, Immunology Letters, 96:195-201; Gelati, M., y col., 1999, J Neurol, 246:569-573; Genc, K., y col., 1997, J Clin Invest,

1:2664-2671; y Bever, C., y col., 1991, Int J Immunopharmac, 13:613-618).

Bielekova y col., informaron de que en pacientes de EM tratados con daclizumab había una disminución gradual en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en circulación y una expansión significativa de linfocitos citolíticos naturales (NK) CD56^{brillante} in vivo y este efecto estaba muy correlacionado con la respuesta a daclizumab (Bielekova, B., y col., 2006, Proc Natl Acad Sci USA, 103:5941-5946). Se propuso que las correlaciones positivas entre la expansión de células NK CD56^{brillante} y la contracción de las cantidades de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ apoyan la existencia de una vía inmunorreguladora en la que las células NK CD56^{brillante} activadas inhiben la supervivencia de linfocitos T (Bielekova, B., y col., 2006, Proc Natl Acad Sci USA, 103:5941-5946).

Aunque Bielekova y col. (Bielekova, B., y col., 2006, Proc Natl Acad Sci USA, 103:5941-5946) informaron de reducciones estadísticamente significativas desde la medida inicial en los recuentos totales de linfocitos T CD4⁺ (media = -11,2%, p = 0,009) cuando se trataban pacientes de EM (n = 22) con daclizumab en combinación con terapia con IFN beta, no se reprodujo la observación de niveles reducidos de recuentos de linfocitos T CD4⁺ asociados con tratamiento con daclizumab durante el estudio CHOICE ciego, controlado con placebo. Durante el estudio CHOICE se obtuvieron recuentos de linfocitos T CD4⁺ tan a menudo como en 10 momentos puntuales para cada sujeto durante un transcurso de 44 semanas de estudio, de aproximadamente 65 sujetos, y los porcentajes de cambio estadísticamente significativos desde la medida inicial (análisis paramétrico dentro de los grupos de tratamiento) (p<0,05) se limitaron a una reducción (media = 18,2%) en el grupo de tratamiento con placebo en la semana 2 (n = 16), y una reducción (media = 19,1%) en el grupo de tratamiento con elevada dosis de daclizumab en la semana 12 (n = 19); no hubo cambios significativos para el grupo de tratamiento con baja dosis de daclizumab.

Como se muestra en la Tabla 1, las reducciones observadas en los recuentos de linfocitos T CD4⁺ fueron fortuitas y no mostraron tendencia relacionada con el tratamiento. Los valores P mostrados en la Tabla 1 se obtuvieron de una comparación ANOVA con los recuentos celulares absolutos del grupo de IFN-beta + placebo en la semana 22 de la fase de tratamiento, y por tanto los cambios a partir de los niveles basales en los recuentos de linfocitos T CD4⁺ observados en los dos grupos de tratamiento con daclizumab del estudio CHOICE no fueron estadísticamente significativos en comparación con el grupo de placebo y se consideraron fortuitos. Se muestra en paréntesis (n) la cantidad de pacientes muestreados dentro de cada grupo de tratamiento.

Tabla 1. Cambios asociados a daclizumab en recuentos de linfocitos T CD4⁺

Subconjunto inmune	Tratamiento	Media de células basales/mm ³	Media de células en la semana 22/mm ³	Media de porcentaje de cambio en la semana 22	Valor P en la semana 22 (n)
linfocitos T CD4 ⁺	IFN-beta + placebo	735	606	-5,2	(13)
	IFN-beta + DAC 1 mg/kg	789	697	-16,8	0,74 (18)
	IFN-beta + DAC 2 mg/kg	652	546	-20,9	0,82 (19)
CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	IFN-beta + placebo	31,2	32,2	-7,3	(13)
	IFN-beta + DAC 1 mg/kg	31,1	20,2	-45,7	0,006(18)
	IFN-beta + DAC 2 mg/kg	27,6	20,3	-32,7	0,009(17)

Además, el subconjunto de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ típicamente representa un pequeño porcentaje de todos los linfocitos T CD4⁺ presentes tanto en sujetos humanos sanos como en sujetos humanos enfermos. El intervalo de porcentaje medio de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ para sujetos con placebo en todos los momentos puntuales controlados durante el estudio CHOICE fue del 5,5% al 6,3% de todos los linfocitos T CD4⁺. Las reducciones medias máximas desde la medida inicial en recuentos de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ determinadas durante el estudio CHOICE, la reducción media máxima en el grupo de baja dosis de daclizumab = -38,9%, la reducción media máxima en el grupo de alta dosis de daclizumab = -48,4%, fueron mucho mayores que el cambio del -11,2% en los linfocitos T CD4⁺ totales presentados por Bielekova y col. (Bielekova, B., y col., 2006, Proc Natl Acad Sci USA, 103:5941-5946). La magnitud del cambio observado en los recuentos de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en respuesta al tratamiento con daclizumab en el estudio CHOICE, apoya el uso de recuentos de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ como un marcador sensible para controlar la eficacia de la terapia con anticuerpo anti-IL-2R en pacientes de EM.

En el presente documento se describen procedimientos para el uso de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ como marcador para la actividad de anticuerpos anti-IL2R en pacientes de EM. Típicamente, se analizan muestras de sangre de pacientes con EM para los marcadores de superficie celular usando citometría de flujo (véase, por ejemplo, Bielekova, B., y col., 2006, Proc Natl Acad Sci USA, 103:5941-5946). Por ejemplo, la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ puede analizarse usando anticuerpos disponibles en el mercado que se unen preferentemente a la proteína HLA-DR⁺, y en combinación con clasificación celular activada fluorescente (FACS), determinarse los niveles de células que expresan HLA-DR⁺. El porcentaje de cambio en la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en respuesta al tratamiento puede usarse para controlar la eficacia de un anticuerpo anti-IL-2R.

En algunas realizaciones, se observa una reducción en la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en respuesta al tratamiento con un anticuerpo contra IL-2R. La cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ puede determinarse mediante recuento celular absoluto, es decir, la cantidad de células por mm³ o mm², o como un porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ totales. Dependiendo del paciente individual y la forma recidivante de EM, la reducción global en la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ puede variar del 25% al 100%. Por ejemplo en algunas realizaciones, la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ puede reducirse en al menos un 25%, en la menos un 30%, en al menos un 35%, en al menos un 40%, en al menos un 45%, en al menos un 50%, en al menos un 55%, en al menos un 60%, en al menos un 65%, en al menos un 70%, en al menos un 75%, en al menos un 80%, en al menos un 85%, en al menos un 90%, en al menos un 95%, o en al menos un 100%.

En algunas realizaciones, pueden controlarse marcadores de superficie celular adicionales para proporcionar información adicional respecto a la respuesta clínica en pacientes de EM tratados con un anticuerpo anti-IL-2R. Los marcadores de superficie celular adicionales incluyen, aunque sin limitación, CD3, células NK CD56^{brillante}, CD4, CD25, CD16, CD122, y CD8. Se han descrito ensayos para la determinación de estos marcadores, véase, por ejemplo, Bielekova, B., y col., 2006, Proc Natl Acad Sci USA, 103:5941-5946. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ y la cantidad de células NK CD56^{brillante} pueden analizarse y usarse para controlar la eficacia de un anticuerpo anti-IL-2R.

La determinación de la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ generalmente requiere tomar más de una muestra de un paciente en momentos seleccionados. La determinación del momento de muestreo no es crítica para los procedimientos descritos en el presente documento y puede seleccionarlo un médico en base, en parte, en la cantidad de tiempo que un paciente se ha tratado con un anticuerpo anti-IL-2R. Otros factores que pueden afectar al momento de muestro incluyen, aunque sin limitación, la cantidad de tiempo que se ha tratado al paciente para EM, la terapia o terapias que el paciente ha recibido antes del tratamiento con un anticuerpo anti-IL-2R, y si el paciente está mostrando uno o más de los siguientes síntomas: tasa de recidiva aumentada, un aumento en el valor de la Escala Expandida del Nivel de Discapacidad (EEND), una cantidad aumentada de Gd-CEL nuevas o aumentadas, y un aumento en lesiones IRM T2 nuevas o aumentadas. Véase, por ejemplo, Perini y col., 2004, J Neurology, 251:305-309; Sorensen, y col., 2003 Lancet, 362:184-191; Pachner, 2003, Neurology, 61 (Supl. 5):S2-S5; Perini y col., 2004, J Neurology, 251:305-309; y Farrell, y col., 2008, Multiple Sclerosis, 14:212-218.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, los cambios en la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ pueden controlarse antes, durante y después del inicio del tratamiento con un anticuerpo anti-IL-2R.

A modo de otro ejemplo, los cambios en la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ pueden controlarse antes del inicio del tratamiento con un anticuerpo anti-IL-2R y a intervalos seleccionados después de ello (por ejemplo, semanalmente, mensualmente, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses).

A modo de otro ejemplo, los cambios en la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ pueden controlarse después del inicio del tratamiento (por ejemplo, en una semana, en un mes, en dos meses, en tres meses, en seis meses) con un anticuerpo anti-IL-2R y a intervalos seleccionados después de ello (por ejemplo, semanalmente, mensualmente, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses).

Típicamente, un 25% de reducción o mayor en la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ es coherente con la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-2R. Como se usa en el presente documento, una "dosis terapéuticamente eficaz" es una dosis suficiente para prevenir el avance, disminuir la tasa de recidiva, o reducir uno o más de los síntomas asociados con la progresión de la enfermedad en esclerosis múltiple.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-2R a un paciente de EM disminuye la cantidad de recidivas en al menos uno que suceden en un periodo de tiempo dado, tal como 1 año, en el paciente tratado. Las recidivas típicamente se evalúan mediante el historial y la exploración física definidas como la aparición de un nuevo síntoma o el empeoramiento de un antiguo síntoma atribuible a esclerosis múltiple, acompañado por una nueva anomalía neurológica apropiada o disfunción neurológica focal que dura al menos 24 horas en ausencia de fiebre, y precedido por estabilidad o mejora durante al menos 30 días (véase, por ejemplo, Sorensen, y col., 2003 Lancet, 362: 1184-1191).

En otras realizaciones, la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-2R a un paciente de EM disminuye la cantidad de lesiones detectadas en el cerebro del paciente. Las imágenes por resonancia magnética (IRM) del cerebro son una herramienta importante para comprender la patología dinámica de

la esclerosis múltiple. La IRM de cerebro T₂-ponderada define lesiones con elevada sensibilidad en esclerosis múltiple y se usa como una medida de la carga de la enfermedad. Sin embargo, dicha elevada sensibilidad sucede a expensas de la especificidad, ya que los cambios en la señal T₂ pueden reflejar áreas de edema, desmielinización, gliosis y pérdida axonal. Se cree que las áreas de Gd-CEL demostradas en IRM de cerebro T₁-ponderada reflejan alteración subyacente de la barrera hemato-encefálica a partir de inflamación perivascular activa. Dichas áreas de potenciación son transitorias, durando típicamente <1 mes. La IRM de cerebro por Gd-CEL por lo tanto se usa para evaluar la actividad de la enfermedad. La mayoría de las lesiones T₂-ponderadas (T2) en la materia blanca central de sujetos con esclerosis múltiple comienza con un periodo variable de Gd-CEL. Las lesiones Gd-CEL y T2 representan fases de un único proceso patológico. La IRM de cerebro es una técnica convencional para evaluar las lesiones Gd-CEL y T2 y se usa de forma rutinaria para evaluar la progresión de la enfermedad en EM (por ejemplo, véase Lee y col., Brain 122 (Pt 7):1211-2, 1999).

Como se muestra en la FIG. 1, el tratamiento de pacientes de EM con daclizumab reducía la cantidad media de Gd-CEL nuevas y aumentadas en un 25% o más. Por consiguiente, en algunas realizaciones una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-2R para un paciente de EM disminuye la cantidad de Gd-CEL detectadas en el cerebro del paciente en aproximadamente el 25% al 80%. En algunas realizaciones, la cantidad de Gd-CEL detectadas en el cerebro del paciente está disminuida en al menos un 25%, en al menos un 30%, en al menos un 35%, en al menos un 40%, en al menos un 45%, en al menos un 50%, en al menos un 55%, en al menos un 60%, en al menos un 65%, en al menos un 70%, en al menos un 75%, en al menos un 80%, en al menos un 85%, en al menos un 90%, en al menos un 95%, y en al menos un 100%.

En otras realizaciones, la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-2R a un paciente de EM disminuye la cantidad lesiones IRM T2 detectadas en el cerebro del paciente.

En otras realizaciones, la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-2R a un paciente de EM estabiliza la progresión de una discapacidad del paciente determinada por la "Escala Expandida del Nivel de Discapacidad (EEND)" que puede usarse para clasificar la alteración neurológica en pacientes de EM (Kurtzke, 1983, Neurology, 33-1444-52). La EEND comprende 20 grados de 0 (normal) a 10 (muerte debida a EM), que progresan en una etapa de un único punto de 0 a 1 y en etapas de 0,5 puntos ascendentes. Los valores se basan en una combinación de valores funcionales del sistema, el grado de movilidad del paciente, la necesidad de asistencia para caminar, o la ayuda en las actividades de la vida diaria. Los valores funcionales del sistema miden la función dentro de sistemas neurológicos individuales incluyendo función visual, piramidal, cerebelar, del tronco cerebral, sensorial, intestinal y de la vejiga, cerebral y otras funciones.

En otras realizaciones, la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-2R a un paciente de EM NAb IFN-beta positivo reduce un valor de discapacidad del paciente en un 10% a un 75%. Por ejemplo en algunas realizaciones, un valor de discapacidad del paciente puede reducirse en al menos un 10%, en al menos un 15%, en al menos un 20%, en al menos un 25%, en al menos un 30%, en al menos un 35%, en al menos un 40%, en al menos un 45%, en al menos un 50%, en al menos un 55%, en al menos un 60%, en al menos un 65%, en al menos un 70%, o en al menos un 75%.

En algunas realizaciones, no se observarán cambios o un aumento en la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ después de tratamiento de un paciente de EM con un anticuerpo anti-IL-2R. En estas realizaciones, los pacientes pueden evaluarse para determinar si están respondiendo mal o no están logrando responder al tratamiento con un anticuerpo anti-IL-2R. Los pacientes de EM que están respondiendo mal a la terapia generalmente tienen una mayor tasa media de recidiva, un mayor riesgo de experimentar una segunda recidiva, un mayor riesgo de tener una progresión sostenida de > 1 sobre la EEND, y una menor probabilidad de estar libres de recidiva (Malucchi, y col., 2004, Neurology, 62: 2031-2037). Por consiguiente, pueden usarse varios criterios de valoración clínicos para determinar si un paciente está respondiendo al tratamiento con un anticuerpo anti-IL-2R incluyendo la frecuencia y tasa de recidiva, un aumento de 1 punto o más en el valor de la Escala Expandida del Nivel de Discapacidad (EEND), un aumento en la cantidad de Gd-CEL, y/o un aumento en la cantidad de lesiones IRM T2.

Los datos requeridos para determinar los criterios de valoración clínicos pueden recogerse al inicio del tratamiento anti-IL-2R y/o durante las visitas de seguimiento. En algunas realizaciones, los pacientes de EM que están respondiendo mal a un anticuerpo anti-IL-2R pueden tratarse con agentes adicionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede administrarse uno o más anticuerpos anti-IL-2R a un paciente de EM. En otras realizaciones, puede administrarse un anticuerpo anti-IL-2R en combinación con otra terapia contra EM, tal como un producto IFN-beta. Ejemplos de productos IFN-beta adecuados incluyen, aunque sin limitación, uno de los tres productos IFN-beta que se han aprobado: IFN-beta-1b (Betaferon®, Schering AG, Berlín, Alemania), IFN-beta-1a (Avonex®, Biogen Idec, Cambridge MA), e IFN-beta-1a (Rebif®, Ares-Serono, Ginebra, Suiza). Ejemplos no limitantes de otros fármacos comercializados que pueden usarse en combinación con un tratamiento anti-IL-2R incluyen acetato de glatiramer (por ejemplo, Copaxone®, Teva Pharmaceutical Industries, Ltd., Israel), corticosteroides, riluzol, azatioprina, ciclofosfamida, metotrexato, y mitoxantrona.

Los pacientes de EM adecuados para el tratamiento con un anticuerpo anti-IL-2R típicamente se han diagnosticado con una forma recidivante de esclerosis múltiple incluyendo esclerosis múltiple recidivante-remitente, esclerosis múltiple progresiva secundaria, esclerosis múltiple recidivante progresiva y esclerosis múltiple recidivante agravada.

Por "esclerosis múltiple recidivante-remite" en el presente documento se entiende un transcurso clínico de EM que está caracterizado por ataques agudos claramente definidos con recuperación completa o parcial y sin progresión de la enfermedad entre ataques. Por "esclerosis múltiple progresiva secundaria" en el presente documento se entiende un transcurso clínico de EM que inicialmente es recidivante-remite, y después se convierte en progresivo a una tasa variable, posiblemente con una recidiva ocasional y remisión minoritaria. Por "esclerosis múltiple recidivante progresiva" en el presente documento se entiende un transcurso clínico de EM que es progresivo desde la aparición, alternado por recidivas. Existe una recuperación significativa inmediatamente después de una recidiva, pero entre recidivas existe un empeoramiento gradual de la progresión de la enfermedad. Por "esclerosis múltiple recidivante agravada" en el presente documento se entiende un transcurso clínico de EM con recidivas impredecibles de síntomas, de los cuales las personas no vuelven a la normalidad y no se recuperan completamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-receptor de IL-2 es daclizumab. Los genes recombinantes que codifican daclizumab son un compuesto de secuencias de anticuerpo humano (aproximadamente el 90%) y murino (aproximadamente el 10%). El anticuerpo murino anti-Tac donante es un anticuerpo monoclonal IgG2a que se une específicamente a la proteína Tac de IL-2R e inhibe las respuestas biológicas mediadas por IL-2 de las células linfoides. El anticuerpo murino anti-Tac se "humanizó" combinando las regiones determinantes de complementariedad y otros restos seleccionados del anticuerpo murino anti-TAC con las regiones flanqueantes y constantes del anticuerpo humano IgG1. El anticuerpo humanizado anti-Tac daclizumab está descrito y su secuencia se expone en la patente de Estados Unidos N° 5.530.101, véanse la SEC ID N° 5 y la SEC ID N° 7 para las regiones variables de cadena pesada y ligera respectivamente. Las SEC ID N° 5 y 7 de la patente de Estados Unidos N° 5.530.101 se desvelan como las SEC ID N° 1 y 2 respectivamente en el listado de secuencias presentado con la misma. La patente de Estados Unidos N° 5.530.101 y Queen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:1029-1033, 1989 se incorporan ambos por referencia en el presente documento en su totalidad.

Daclizumab se ha aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) estadounidense para la profilaxis del rechazo agudo de órganos en sujetos que reciben transplantes renales, como parte de un régimen inmunosupresor que incluye ciclosporina y corticosteroides y está comercializado por Roche como ZENAPAX®. Daclizumab también ha demostrado ser activo en el tratamiento de mielopatía/paraparesia espástica tropical asociada al virus linfotrófico de linfocitos T humanos de tipo 1 (HAM/TSP, véase Lehky y col., Ann. Neuro., 44:942-947, 1998). También se ha descrito el uso de daclizumab para tratar la uveítis posterior (véase Nussenblatt y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 96:7462-7466, 1999).

Pueden usarse anticuerpos que se unen al mismo epítipo (o solapante) que daclizumab en los procedimientos desvelados en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo tendrá al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad de secuencia con daclizumab. El anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, incluyendo aunque sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es basiliximab, comercializado como Simulect® por Novartis Pharma AG. Basiliximab es un anticuerpo quimérico (murino/humano), producido por tecnología de ADN recombinante que funciona como agente inmunosupresor, uniéndose específicamente a y bloqueando la cadena alfa del IL-2R en la superficie de linfocitos T activados.

Los anticuerpos anti-IL-2R pueden administrarse por vía parenteral, es decir, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intranasal, transdérmica, o mediante un dispositivo de inyección sin aguja. Las composiciones para administración parenteral habitualmente incluirán una solución de un anticuerpo anti-IL-2R en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables se definen como vehículos habitualmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración a animales o seres humanos. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A.R. Gennaro, 20ª Edición, 2001, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, para una descripción de composiciones y formulaciones adecuadas para suministro farmacéutico de los anticuerpos anti-IL-2R desvelados en el presente documento. Véanse las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2003/0138417 y 2006/0029599 para una descripción de formulaciones líquidas y liofilizadas adecuadas para el suministro farmacéutico de daclizumab.

Los procedimientos para preparar composiciones farmacéuticas son conocidos para los especialistas en la técnica (véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, *supra*). Además, la composición o formulación farmacéutica puede incluir otros vehículos, adyuvantes, o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos y no inmunogénicos y similares. Las cantidades eficaces de dicho diluyente o vehículos serán aquellas cantidades que son eficaces para obtener una formulación farmacéuticamente aceptable en términos de solubilidad de componentes, o actividad biológica.

La concentración de anticuerpo en las formulaciones puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente el 0,5%, habitualmente al o al menos aproximadamente al 1% hasta como mucho el 15 o el 20% en peso o de 1 mg/ml a 100 mg/ml. La concentración se selecciona principalmente en base a volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

Generalmente, una dosis terapéutica adecuada de daclizumab es de aproximadamente 0,5 miligramos por kilogramo (mg/kg) a aproximadamente 5 mg/kg, tal como una dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, de aproximadamente 1

5 mg/kg, de aproximadamente 1,5 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg, de aproximadamente 2,5 mg/kg, de aproximadamente 3,0 mg/kg, de aproximadamente 3,5 mg/kg, de aproximadamente 4,0 mg/kg, de aproximadamente 4,5 mg/kg, o de aproximadamente 5,0 mg/kg administrada por vía intravenosa o subcutánea. También son posibles formas unitarias de dosificación, por ejemplo 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, o hasta 500 mg por dosis.

10 Pueden usarse otras dosificaciones para obtener niveles séricos de 2 a 5 µg/ml que son necesarios para la saturación de la subunidad Tac del receptor de IL-2 para bloquear las respuestas de linfocitos T activados. Pueden ser necesarios niveles mayores tales como aproximadamente 5 a 40 µg/ml, para eficacia clínica. Un especialista en la técnica será capaz de construir un régimen de administración para mantener niveles séricos dentro del intervalo de 2 a 40 µg/ml.

Las dosis de basiliximab probablemente tengan que ser menores, por ejemplo de 0,25 mg/kg a 1 mg/kg, por ejemplo, 0,5 mg/kg, o dosis unitarias de 10, 20, 40, 50 ó 100 mg, debido a la mayor afinidad de basiliximab por la diana IL-2R. El principio general para mantener el receptor de IL-2 saturado puede usarse para guiar la elección de niveles de dosis de otros anticuerpos contra IL-2R.

15 Pueden realizarse administraciones únicas o múltiples de anticuerpos anti-IL-2R con dosificaciones y frecuencias de administración seleccionadas por el médico. Generalmente, se administran múltiples dosis. Por ejemplo, puede utilizarse administración múltiple de daclizumab u otros anticuerpos anti-IL-2R, tal como administración mensual, bimensual, cada 6 semanas, en semanas alternas, semanal o dos veces por semana.

7. Ejemplos

20 Ejemplo 1: Estudio CHOICE

25 El estudio CHOICE fue un estudio multicéntrico, controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado, en fase 2 de daclizumab subcutáneo (SC) añadido a interferón (IFN)-beta en el tratamiento de formas activas, recidivantes de EM. Los resultados del estudio CHOICE confirmaron que daclizumab a 2 mg/kg cada dos semanas disminuía significativamente la cantidad de nuevas Gd-CEL en pacientes que tienen formas activas, recidivantes de EM en terapia concurrente con IFN-beta (Montalban, X. y col., Multiple Sclerosis, 13: S18-S18 Supl. 2 OCT 2007; y, Kaufman, M.D., y col., Neurology, 70 (11): A220-A220 Supl. 1 MAR 11 2008). Se observó una disminución menor en Gd-CEL nuevas o aumentadas para aquellos sujetos del estudio que recibían 1 mg/kg de daclizumab cada cuatro semanas.

30 Se incluía a un paciente en el estudio una que se había aleatorizado. Los pacientes incluidos permanecieron en su régimen basal de IFN-beta y se aleatorizaron en una proporción 1:1:1 a uno de los siguientes 3 brazos de tratamiento (véase la Tabla 2).

Tabla 2

Brazo de tratamiento ¹	Nivel de dosis y frecuencia	Nº de visitas totales de dosificación	Nº de pacientes
A (Dosis elevada) ²	Daclizumab SC: 2 mg/kg q2 semanas x 11 dosis	11	55
B (Dosis baja) ³	Daclizumab SC: 1 mg/kg q4 semanas x 6 dosis	11	55
C (Placebo) ⁴	Placebo SC: q2 semanas x 11 dosis	11	55

1 Todos los pacientes siguen con el régimen previo de IFN-beta SC/IM mientras dure el estudio.

2 Los pacientes en el brazo A (dosis elevada) reciben 2 inyecciones SC (2 de daclizumab 1 mg/kg) durante 11 visitas de dosificación. Dosis máxima de daclizumab por visita de dosificación = 200 mg.

3 Los pacientes en el brazo B (dosis baja) reciben 2 inyecciones SC (1 de daclizumab 1 mg/kg, 1 de placebo) durante 6 visitas de dosificación, alternando con 2 inyecciones SC (2 de placebo) durante 5 visitas de dosificación. Dosis máxima de daclizumab por visita de dosificación de daclizumab = 100 mg.

4 Los pacientes en el brazo C (placebo) reciben 2 inyecciones SC (2 de placebo) durante 11 visitas de dosificación.

35 El periodo de selección fue de hasta 3 semanas. El periodo de tratamiento se designó como de 24 semanas (6 meses, hasta el día 168) para incluir 4 semanas posteriores a la última dosis del fármaco del estudio ciego (Dosis nº 11, que sucede en la visita nº 14, día 140). Después del periodo de tratamiento, se hizo un seguimiento de los pacientes durante un total de 48 semanas (12 meses) y se continuó la terapia con IFN beta durante al menos 5 meses de este periodo. El tiempo máximo total en el estudio para cada paciente fue de aproximadamente 18 meses.

Las evaluaciones de un paciente dado por la EEND y la Escala Funcional Compuesta de la Esclerosis Múltiple, versión 3 (MSFC-3) se realizaron por un médico que no estaba implicado en el tratamiento del paciente y se designó

un "médico de evaluación". Todas las demás valoraciones del paciente fueron bajo la responsabilidad del médico a cargo del tratamiento del paciente (médico de tratamiento). La MSFC-3 incluye ensayos cuantitativos de: (1) Función de las piernas/locomoción-Paseo cronometrado de 25 pasos (T25FW); (2) Función de los brazos-Ensayo de 9 estacas en agujero (9HPT), y (3) Ensayo de cognición-Adición auditiva en ritmo seriado con intervalos entre estímulos de 3 segundos (PASAT3) (Cutter y col., 1999, Brain, 122(Pt 5):871-882).

La elegibilidad preliminar para el estudio CHOICE se estableció por el historial, la inspección de gráficos, y evaluaciones rutinarias. Durante el periodo de tratamiento y seguimiento, se realizaron varios procedimientos y evaluaciones sobre los sujetos en días especificados incluyendo, aunque sin limitación, RM, EEND, MSFC-3, exploraciones físicas, exploraciones físicas dirigidas a los síntomas, hematología/química sérica (por ejemplo, para la determinación de la evaluación farmacocinética y anticuerpos anti-DAC), y extracciones de sangre para evaluaciones farmacodinámicas y NAb IFN-beta.

La sustancia de fármaco daclizumab fabricada por PDL BioPharma, Inc. (Redwood City, CA) para suministro subcutáneo, se suministró en viales de un único uso que contenían 100 mg de daclizumab en 1,0 ml de succinato sódico 40 mM, cloruro sódico 100 mM, polisorbato 80 al 0,03%, pH 6,0. El placebo se suministró en viales de un único uso como una solución isotónica en viales coincidentes que contenían succinato sódico 40 mM, sacarosa al 6%, polisorbato 80 al 0,03%, pH 6,0.

Ejemplo 2: Reducciones en linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en respuesta a tratamiento con daclizumab

Se determinaron los cambios en la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en los pacientes que participaban en el estudio CHOICE (véase el Ejemplo 1). Se analizaron los niveles de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en los pacientes que recibieron daclizumab 2 mg/kg cada 2 semanas (dosis alta), daclizumab 1 mg/kg cada 4 semanas (dosis baja), o placebo SC añadido a terapia con interferón beta durante 24 semanas. Se recogieron muestras de sangre completa de los pacientes en tubos vacutainer que contenían anti-coagulante usando técnicas convencionales de venipunción y de se enviaron mediante mensajería durante una noche para el análisis inmediato, ciego al tratamiento usando clasificación celular activada fluorescente (FACS). Se obtuvieron anticuerpos disponibles en el mercado de BD Biosciences (EEUU) que se unen preferentemente a la proteína HLA-DR (por ejemplo, el clon de anticuerpo L243 (G45-6)) y que se unen preferentemente a subconjuntos inmunes específicos (por ejemplo, anticuerpos que se unen de forma selectiva a los antígenos CD3 (por ejemplo, clon SK7) y CD4 (por ejemplo, clon SK3)) y se usaron en combinación con FACS para determinar los niveles de células que expresan HLA-DR⁺ cuando los pacientes se trataban con anticuerpo contra DAC. La preparación de las muestras y los procedimientos de ensayo FACS se realizaron de acuerdo con las prácticas recomendadas en la "Guideline for Flow Cytometric Immunophenotyping" (véase Calevetti y col., 1993, Cytometry 14:702-714). Se realizaron análisis paramétricos (ensayo t para muestras dependientes) y no paramétricos (Wilcoxon) que comparaban los niveles de recuentos celulares de subconjuntos inmunes entre grupos de dosificación. Se usaron las características individuales de exposición a daclizumab (resultados de análisis *post hoc*) de un subconjunto de sujetos, incluyendo el seno en estado estacionario ($C_{ss,min}$), y el AUC_{ss}, por separado, como predictores para modelar cambios desde el nivel basal en subconjuntos inmunes individuales o cambios en el tiempo (área calculada bajo la curva de cambio desde la medida inicial-tiempo (AUC)). También se evaluó la relación entre los cambios desde el nivel basal de subconjuntos putativos de linfocitos T activados y el total de Gd-CEL nuevas o aumentadas entre las semanas 8 y 24 usando aproximaciones de análisis estadístico de correlación lineal, correlación binomial negativa, ANOVA o ensayos de Kruskal-Wallis.

El análisis de los tratamientos con daclizumab a una dosis de 2 mg/kg SC cada 2 semanas, añadidos al tratamiento de fondo con interferón-beta produjo reducciones estadística y clínicamente significativas en la actividad de lesiones por EM (véase la FIG. 1) en comparación con el resto con solamente interferón-beta (y añadiendo el placebo).

Se observaron rápidas reducciones en los niveles absolutos de linfocitos T activados entre los pacientes en ambos grupos de dosis de daclizumab, pero no en pacientes tratados con placebo (véase la FIG. 2). Como se muestra en la FIG. 2, se observaron disminuciones desde la medida inicial en los niveles absolutos de linfocitos T CD4⁺ activados HLA-DR⁺ para ambos grupos de dosificación. Se indican reducciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en comparación con el placebo (* DAC dosis baja y ** DAC dosis alta). Los niveles absolutos de linfocitos T CD4⁺ activados HLA-DR⁺ volvieron a niveles basales aproximados en el momento de des-saturación de CD25 entre los días 196 y 280. En el último muestreo al final del periodo de tratamiento (semana 22), los valores medios en los linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ eran significativamente inferiores en ambos grupos de dosis de DAC en comparación con el placebo (DAC dosis baja frente a placebo: 22,5 frente a 37,4 células/ μ l, $P = 0,006$; DAC dosis alta frente a placebo: 23,1 frente a 37,4 células/ μ l, $P = 0,009$). Las reducciones en los linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ reversionaron tras interrumpir el tratamiento con DAC.

Como se muestra en la FIG. 3, se observó una relación lineal positiva estadísticamente significativa ($p = 0,008$) entre la exposición individual a DAC en estado estacionario y las reducciones del sujeto desde la medida inicial en los niveles absolutos de recuentos de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en el tiempo (dentro del periodo de dosificación), cuando cada factor se expresaba en términos de área bajo la curva (AUC) y cuando una reducción en los recuentos de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ se expresaba como un valor positivo (es decir cuando una disminución en los recuentos de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ desde la medida inicial se representaba como un valor positivo). Por tanto, se demostró una relación positiva significativa entre la exposición a daclizumab y la reducción en los recuentos de

linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ T (AUC) en el tiempo.

5 Como se muestra en las FIG. 2 y 3, el tratamiento de pacientes con EM con daclizumab se asoció con reducciones en los linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺; estas reducciones eran rápidas durante la fase de tratamiento con daclizumab para ambos grupos de dosificación y revertían después de que finalizara el tratamiento con daclizumab (véase la FIG. 2). Se observó una relación positiva, dependiente de la dosis y estadísticamente significativa entre la exposición a daclizumab (AUC_{ss}) y las reducciones en los recuentos de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ (AUC) en el tiempo cuando una reducción en los recuentos de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ se expresaba como un valor positivo (es decir cuando una disminución en los recuentos de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ desde la medida inicial se expresaba como un valor positivo) (véase la FIG. 3). El efecto dependiente de la exposición observado de daclizumab en la reducción de las cantidades de linfocitos T activados durante la fase de tratamiento es coherente con la respuesta clínica dependiente de la exposición. Tomadas en conjunto, estas observaciones apoyan el uso del control de los recuentos de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ como biomarcador del tratamiento con anticuerpo daclizumab en EM.

Aunque se han ilustrado y descrito diversas realizaciones específicas, se apreciará que pueden hacerse diversos cambios sin alejarse del alcance de la invención.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Facet Biotech corporation

20 <120> PROCEDIMIENTOS PARA CONTROLAR LA EFICACIA DE ANTICUERPOS ANTI-IL-2R EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

<130> 222 WO 01

25 <150> US 61/173.138

<151> 27-04-2009

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Construcción sintética. "Región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado anti-Tac de PDL"

40 <400> 1

ES 2 456 504 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Arg Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

5

<210> 2
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Construcción sintética. "Región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-Tac de PDL"
 <400> 2

ES 2 456 504 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

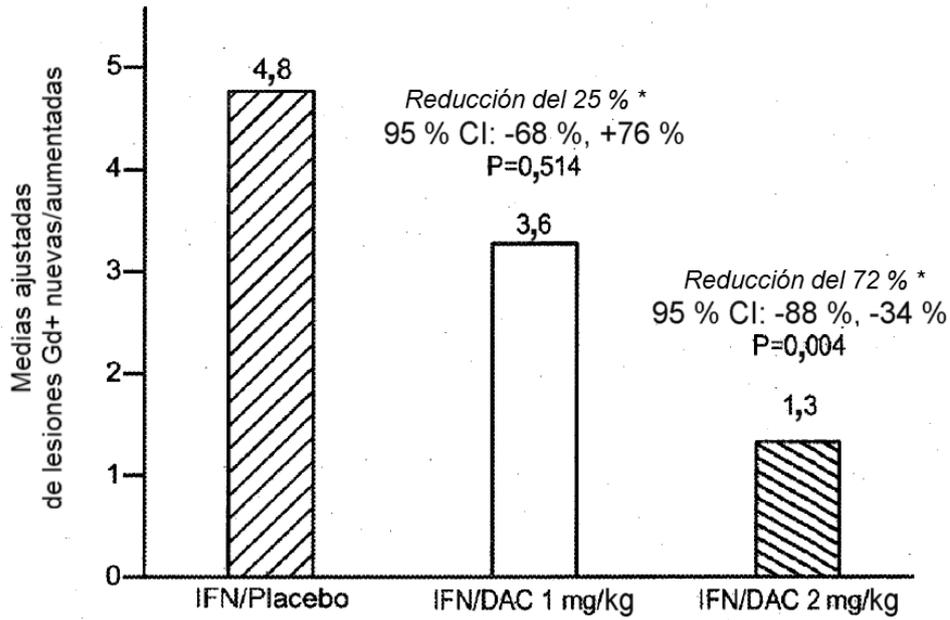
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
100 105

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de supervisión de la eficacia de un anticuerpo anti-IL-2R en un paciente diagnosticado con esclerosis múltiple, que comprende determinar el nivel de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺, en el que una disminución en el nivel de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en el paciente después de exposición al anticuerpo anti-IL-2R indica que el anticuerpo anti-IL-2R es eficaz en mejorar al menos un síntoma de la esclerosis múltiple en el paciente tratado.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nivel de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ se determina en muestras de sangre de un paciente antes de, y posteriormente a, administrar el anticuerpo anti-IL-2R a dicho paciente, en el que una disminución en los linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ posterior a dicho tratamiento indica que el anticuerpo anti-IL-2R es eficaz en mejorar al menos un síntoma de la esclerosis múltiple en el paciente tratado.
- 10 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende comparar la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en una muestra de sangre obtenida del paciente con una referencia no tratada, en el que una disminución en la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en la muestra de sangre en comparación con la referencia no tratada indica que el tratamiento es eficaz para mejorar al menos un síntoma de la esclerosis múltiple en el sujeto.
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el anticuerpo que se une específicamente al receptor de interleuquina 2 es un anticuerpo humanizado.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3 ó 4, en el que el anticuerpo anti-IL-2R se une específicamente a la subunidad alfa del receptor humano de alta afinidad de interleuquina-2 e inhibe la señalización de IL-2.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo anti-IL-2R es un anticuerpo humanizado.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo humanizado es daclizumab.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la mejora de un síntoma de esclerosis múltiple comprende reducir la cantidad de recaídas en un periodo dado, reducir la tasa de aumento del valor en la escala expandida del nivel de discapacidad del sujeto, reducir la cantidad de lesiones en IRM potenciadas con contraste gadolinio T1, o reducir la cantidad de lesiones IRM T2.
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que se administra daclizumab a una dosis de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 miligramos por kilogramo, o a una dosis de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 miligramos por kilogramo.
10. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que se administra daclizumab por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intranasal, o transdérmica.
- 30 11. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que se administra daclizumab al menos bisemanalmente, o al menos mensualmente.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sujeto tiene una forma recidivante de esclerosis múltiple.
- 35 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el sujeto tiene esclerosis múltiple recidivante-remitente, progresiva secundaria, recidivante progresiva, o recidivante agravada.
14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende determinar la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en muestras de sangre recogidas de dicho paciente antes, y después, de administrar el anticuerpo anti-IL-2R a dicho paciente, para determinar si ha sucedido un cambio en la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en el paciente después del tratamiento con el anticuerpo anti-IL-2R.
- 40 15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en que el cambio en la cantidad de linfocitos T HLA-DR⁺CD4⁺ en el paciente tratado se reduce en al menos un 25%, al menos un 50% o al menos un 100%.



*Los valores P, porcentajes de reducción, e intervalos de confianza del 95 % se estimaron a partir de una regresión binomial negativa que se ajusta a la cantidad de lesiones basales y el tipo de EM (EMRR frente a EMPS)

FIG. 1

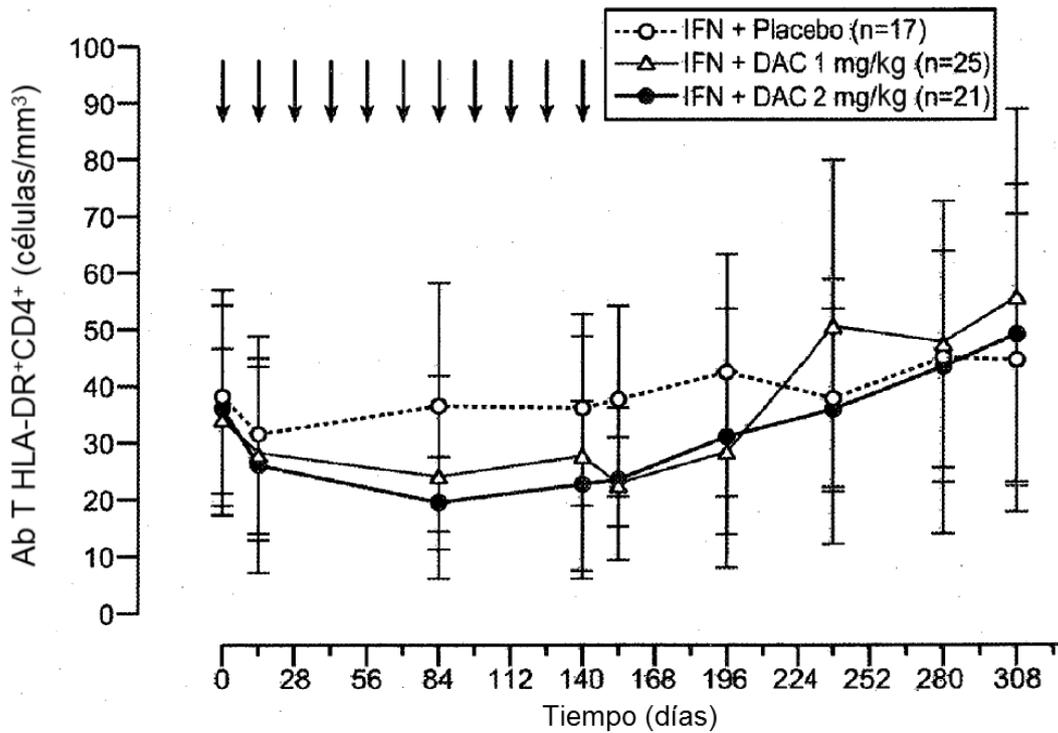


FIG. 2

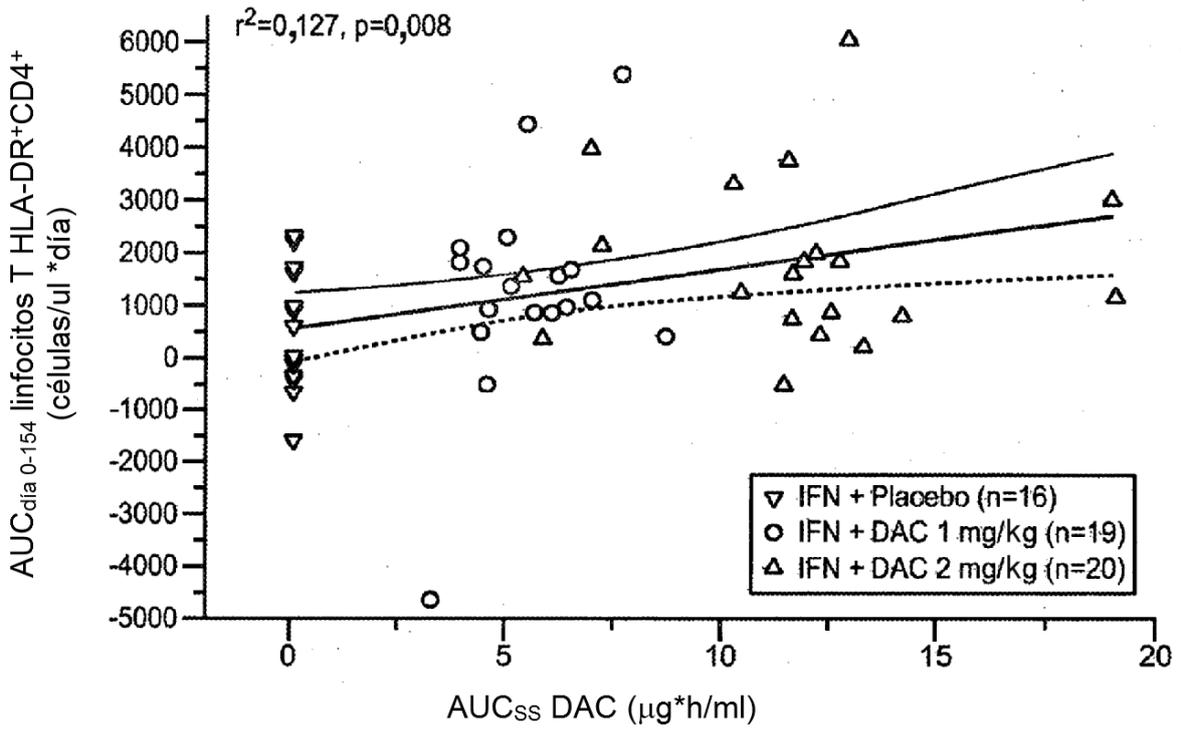


FIG. 3