

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 011**

51 Int. Cl.:

A61K 35/30 (2015.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 31/7052 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2003 E 10182563 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2314627**

54 Título: **Método para el tratamiento de la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

28.06.2002 US 393021 P

27.11.2002 WO PCT/US02/38290

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2017

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE U.S.A. AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE
DEPT. OF HEALTH & HUMAN SERVICES (100.0%)
National Institutes of Health Office of Technology
Transfer 6011 Executive Boulevard, Suite 325
Rockville, MD 20852-3804, US**

72 Inventor/es:

**MARTIN, ROLAND;
MCFARLAND, HENRY, F. y
BIELEKOVA, BIBIANA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 637 011 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

Método para el tratamiento de la esclerosis múltiple

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere al tratamiento de enfermedades autoinmunes, concretamente al tratamiento de la esclerosis múltiple usando un antagonista del receptor de IL-2, tal como un anticuerpo que se une al receptor de IL-2 (IL-2R).

10

Antecedentes

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, neurológica, autoinmune, desmielinizante. La EM puede causar visión borrosa, pérdida de visión unilateral (neuritis óptica), pérdida del equilibrio, falta de coordinación, dificultad para hablar, temblores, entumecimiento, fatiga extrema, cambios en la función intelectual (tales como en la memoria y la concentración), debilidad muscular, parestesias y ceguera. Muchos sujetos desarrollan discapacidades crónicas y progresivas, pero los períodos de deterioro pueden verse interrumpidos por largos períodos de estabilidad clínica. Los déficits neurológicos pueden ser permanentes o evanescentes. En Estados Unidos, hay aproximadamente de 250.000 a 400.000 personas con EM, y cada semana, se diagnostican aproximadamente 200 nuevos casos. A nivel mundial, la EM puede afectar a 2,5 millones de personas. Debido a su carácter no contagioso, lo que obligaría a los médicos estadounidenses a informar de los nuevos casos, y dado que los síntomas pueden ser difíciles de detectar, la incidencia de la enfermedad es solo una estimación, y el número real de personas con EM podría ser mucho mayor.

25

La patología de la EM se caracteriza por una respuesta inmune anómala dirigida contra el sistema nervioso central. En particular, los linfocitos T se activan contra la vaina de mielina de las neuronas del sistema nervioso central causando la desmielinización. En el proceso de desmielinización, la mielina se destruye y se reemplaza por cicatrices de tejido "esclerótico" endurecido conocidas como placas. Estas lesiones aparecen en lugares dispersados por todo el cerebro, el nervio óptico y la médula espinal. La desmielinización interfiere en la conducción de los impulsos nerviosos, lo que produce los síntomas de la esclerosis múltiple. La mayoría de los sujetos se recupera clínicamente de cada período de desmielinización, produciéndose el curso de remisión y agravamiento clásico de la forma más común de la enfermedad conocida como esclerosis múltiple recurrente-remitente.

30

La EM se desarrolla en individuos genéticamente predispuestos y lo más probable es que se desencadene por agentes ambientales tales como virus (Martin *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 10: 153-187,1992). De acuerdo con las hipótesis actuales, las células auxiliares T CD4+ autorreactivas activadas (células Th1) que secretan preferentemente interferón- γ (IFN- γ) y factores de necrosis tumoral α/β (TNF- α/β), inducen la inflamación y la desmielinización en la EM (Martin *et al.*, *supra*). Los datos disponibles sugieren que la predisposición para que se produzca una respuesta de tipo Th1 hacia una serie de diferentes antígenos es un aspecto importante de la patogénesis de la enfermedad de la EM. Las citocinas proinflamatorias (tales como IFN- γ , TNF- α/β) y las quimiocinas secretadas por las células Th1 contribuyen a muchos aspectos del desarrollo de lesiones, incluyendo la apertura de la barrera hematoencefálica, el reclutamiento de otras células inflamatorias, la activación de la glía residente (micro- y astroglia) y la fase efectora del daño de la mielina a través de radicales de nitrógeno y oxígeno secretados por los macrófagos activados (Wekerle *et al.*, *Trends Neuro Sci.* 9: 271-277,1986) (Martin *et al.*, *supra*).

35

40

45

La activación periférica de linfocitos autorreactivos a través del mimetismo molecular (Wucherpfenning y Strominger, *Cell.* 80: 695-705,1995; Gran *et al.*, *Ann. Neurol.* 45: 559-567,1999) es un requisito previo fundamental para la migración de las células T hacia el compartimento del SNC (Calabresi *et al.*, *Ann. Neurol.* 41: 669-674, 1998). Solo las células T activadas que expresan las moléculas de adhesión necesarias son capaces de migrar a través de la barrera hematoencefálica. Se ha planteado la hipótesis de que los linfocitos T de los pacientes con esclerosis múltiple, así como de modelos para la EM tales como la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE; en particular, en ratones SJL, véase Encinas *et al.*, *Nature Genet* 21: 158-160,1999) difieren de los individuos no susceptibles en que se encuentran en un estado diferente de activación (Calabresi *et al.*, *supra*), ya que las células entran en el ciclo celular más fácilmente, permanecen más tiempo en fase de crecimiento, pueden presentar defectos en las vías de apoptosis (Zipp *et al.*, *Ann. Neurol.* 43: 116-120,1998) o están activadas *in vivo* según lo indicado por mayores tasas de mutación en el gen de la hipoxantina-fosforribosil transferasa de las células T específicas de la mielina (Allegretta *et al.*, *Science.* 247: 718-721, 1990).

55

60

El estado de los pacientes con EM se puede evaluar mediante el seguimiento mensual longitudinal de la actividad de resonancia magnética (RM) producida en el cerebro de los pacientes con EM. La RM ofrece un conjunto único de medidas de resultados para los ensayos clínicos en fase I/II realizados en pequeñas cohortes de pacientes y, por lo tanto, es muy adecuada para establecer los datos que prueban los principios de las nuevas estrategias terapéuticas (por ejemplo, véase Harris *et al.*, *Ann. Neurol.* 29: 548-555, 1991; MacFarland *et al.*, *Ann. Neurol.* 32: 758-766, 1992; Stone *et al.*, *Ann. Neurol.* 37: 611-619, 1995). Actualmente hay cuatro tratamientos aprobados para la EM recurrente-remitente, tres tipos de IFN- β (grupo de estudio de la esclerosis múltiple con interferón- β , *Neurology* 43: 655-661,1993; grupo de estudio de la esclerosis múltiple con IFN- β y grupo de análisis de la EM mediante RM de la

65

Universidad de British Columbia, *Neurology*. 45: 1277-1285, 1995; Jacobs *et al.*, *Ann. Neurol.* 39: 285-294, 1996) y copolímero-1 (Johnson K. P., Group tCMST, *J. Neurol.* 242: S38, 1995). Los fracasos del tratamiento se han relacionado con el desarrollo de anticuerpos anti-IFN- β neutralizantes, aunque su papel tampoco se conoce por completo en la actualidad (grupo de estudio de la esclerosis múltiple con IFN- β y grupo de análisis de la EM mediante RM de la Universidad de British Columbia, *Neurology*. 47: 889-894, 1996). La ausencia de respuesta hacia el IFN- β no es un hecho raro y, por lo tanto, es importante identificar combinaciones adecuadas de la terapia convencional con IFN- β con otras modalidades de tratamiento, y nuevos protocolos terapéuticos.

El documento WO 90/07861 desvela nuevos métodos para diseñar inmunoglobulinas humanizadas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) a partir de una inmunoglobulina donadora y una región marco de una inmunoglobulina humana.

Sumario

Se desvelan métodos en el presente documento para tratar a un sujeto, tal como un sujeto humano, con esclerosis múltiple.

La presente invención por lo tanto proporciona un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad α del receptor de interleucina-2, donde el anticuerpo es daclizumab, para su uso en un método de tratamiento de un sujeto humano que tiene esclerosis múltiple, donde el anticuerpo se administra en una forma de dosificación unitaria que contiene 50 mg/dosis a 400 mg/dosis de anticuerpo.

En una realización de la divulgación, el método incluye la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del receptor de IL-2 (IL-2R) en ausencia de tratamiento con interferón- β , mejorando así uno o varios síntomas de la esclerosis múltiple y tratando al sujeto. En un ejemplo, el sujeto no ha respondido al tratamiento previo con interferón- β . En otro ejemplo, el antagonista de IL-2R es un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo quimérico, humanizado o humano, que se une específicamente a la cadena α o de p55 (Tac) del receptor de IL-2.

En otra realización, se proporciona un método para tratar un sujeto con esclerosis múltiple, donde el método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o completamente humano que se une específicamente al receptor de interleucina 2. El anticuerpo monoclonal se administra al menos dos veces por semana durante un período de al menos dos meses. El sujeto no se trata con interferón- β durante la administración del anticuerpo monoclonal. En un ejemplo, el anticuerpo monoclonal se une a p55. En otro ejemplo específico no limitante, el sujeto no ha respondido previamente al tratamiento con interferón- β .

En una realización adicional, se desvela un método de tratamiento en que la administración de interferón-beta se combina con la administración de un antagonista de la IL-2R para proporcionar mejora clínica significativa en individuos con EM. En ejemplos particulares, el antagonista de IL-2R es un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo anti-p55 tal como daclizumab.

Las características y ventajas anteriores, así como otras adicionales, se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La **Fig. 1** es un gráfico del número de lesiones nuevas, totales, supertotales y T2LL en un sujeto tratado solo con Zenapax® a lo largo del tiempo. El sujeto no respondió a la terapia de combinación previa con Zenapax® e interferón (IFN)- β , como se indica en la región de la derecha de la línea vertical continua. El inicio de la monoterapia con Zenapax® (en ausencia de tratamiento con interferón- β) se muestra con la flecha. No se detectaron nuevas lesiones tras el inicio de la monoterapia con Zenapax®.

La **Fig. 2** es un gráfico del número de lesiones nuevas, totales, supertotales y T2LL en un segundo sujeto tratado solo con Zenapax® a lo largo del tiempo. El sujeto no respondió a la terapia de combinación previa con Zenapax® e interferón (IFN)- β , como se indica en la región de la derecha de la línea vertical discontinua. El inicio de la monoterapia con Zenapax® (en ausencia de tratamiento con interferón- β) se muestra con la flecha. No se detectaron nuevas lesiones tras el inicio de la monoterapia con Zenapax®.

La **Fig. 3** es un conjunto de gráficos que muestra los cambios en las lesiones nuevas, totales y supertotales realizadas con el medio de contraste, medidos mediante exploración de generación de imágenes por resonancia magnética (IRM), en sujetos tratados con una combinación de daclizumab e interferón- β que muestra la diferencia entre un período de la línea basal de 3 meses de tratamiento solo con interferón- β y tras la terapia de combinación en ocho sujetos.

Las **Fig. 4A y 4B** son gráficos que muestran los cambios en el rendimiento neurológico medidos por los resultados obtenidos en la escala extendida del estado de la discapacidad (EDSS) (Fig. 4A) y la escala de clasificación neurológica de Scripps (NRS) (Fig. 4B) entre el período de la línea basal y tras la terapia de

combinación para los mismos sujetos que en la Fig. 3.

Las **Fig. 5A y 5B** son gráficos que muestran los cambios en el rendimiento neurológico medidos por los resultados obtenidos en el índice de deambulación (Fig. 5A) y el recorrido de 20 metros a pie cronometrado (Fig. 5B) entre el período de la línea basal y tras la terapia de combinación para los mismos sujetos que en la Fig. 3.

Las **Fig. 6A y 6B** son gráficos que muestran los cambios en el rendimiento neurológico medidos por los tiempos de la prueba del clavijero de nueve agujeros con la mano dominante (Fig. 6A) y no dominante (Fig. 6B) respectivamente, entre el período de la línea basal y tras la terapia de combinación para los mismos sujetos que en la Fig. 1.

La **Fig. 7** es un conjunto de gráficos que muestra los cambios en el porcentaje de las células CD4+/CD25+ y células CD8+/CD25+ que expresan el epítipo Tac entre el período de la línea basal y tras la terapia de combinación para siete de los sujetos de la Fig. 3.

Las **Fig. 8A y 8B** son gráficos que muestran los cambios en el número de las mitosis de células T CD4 por cada cien células (Fig. 8A) y de mitosis de células T CD8 por cada cien células (Fig. 8B) entre el período de la línea basal y tras la terapia de combinación para los mismos sujetos que en la Fig. 3.

La **Fig. 9** es un gráfico que muestra los cambios en el número de células T CD4 que expresan el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) en su superficie medidos mediante clasificación celular activada por fluorescencia de las muestras de sangre entre el período de la línea basal y tras la terapia de combinación para los mismos sujetos que en la Fig. 3.

Descripción detallada

I. Abreviaturas

CDR: regiones determinantes de la complementariedad

CBC: hemograma completo

CNP: nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa

EDSS: escala extendida del estado de la discapacidad

FR: región marco

Gd: gadolinio

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

HV: región hipervariable

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina

IL-2: interleucina 2

IL-2R: receptor de la interleucina 2

kg: kilogramo

KLH: hemocianina de lapa californiana

LPS: lipopolisacárido

MBP: proteína básica de la mielina

mg: miligramo

mm: milímetros

MOG: glucoproteína mielínica del oligodendrocito

IRM: generación de imágenes por resonancia magnética

EM: esclerosis múltiple

NK: linfocito citolítico natural

NO-: óxido nítrico

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

PLP: proteína proteolípídica de la mielina

SRS: escala de clasificación neurológica de Scripps

TGF: factor de crecimiento transformante

TNF: factor de necrosis tumoral

VH: región variable de cadena pesada

VL: región variable de cadena ligera

II. Términos

A menos que se indique lo contrario, las expresiones y los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de las expresiones y los términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en Benjamin Lewin, *Genes V.*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (Eds.), "The Encyclopedia of Molecular Biology", publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), "Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference", publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Las definiciones e información adicional conocidas por el experto en inmunología se pueden encontrar, por ejemplo, en "Fundamental Immunology", W. E. Paul, ed., IV edición, Lippincott-Raven Publishers, 1999.

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes

explicaciones de expresiones y términos específicos:

Efectos adversos: cualquier indicio no deseado, incluyendo las manifestaciones clínicas de los resultados anómalos obtenidos en el laboratorio o los diagnósticos médicos señalados por el personal médico o los síntomas informados por el sujeto, que haya empeorado. Los sucesos adversos incluyen, pero sin limitación, los sucesos con peligro para la vida, un suceso que prolongue la hospitalización o un suceso que provoque la intervención médica o quirúrgica para evitar un resultado no deseado.

Antagonista de un receptor de IL-2 (IL-2R): agente que se une específicamente a IL-2R, o un componente del mismo, e inhibe una función biológica del receptor de IL-2 o del componente. Los ejemplos de funciones que se pueden inhibir son la unión de IL-2 a IL-2R, la transmisión intracelular de una señal de unión de IL-2, y la proliferación y/o activación de linfocitos tales como células T en respuesta a IL-2. En una realización, los antagonistas de IL-2R de uso en los métodos desvelados en el presente documento inhiben al menos una de estas funciones. Como alternativa, el antagonista de IL-2R de uso en los métodos desvelados en el presente documento puede inhibir más de una o todas estas funciones.

En un ejemplo, un antagonista del receptor de IL-2 es un anticuerpo que se une específicamente a Tac (p55), tal como, por ejemplo, Zenapax® (véase más abajo). Otros agentes anti-p55 incluyen el anticuerpo quimérico basiliximab (Simulect®), BT563 (véase Baan *et al.*, *Transplant. Proc.* 33: 224-2246, 2001) y 7G8. Se ha informado que el basiliximab es beneficioso en la prevención del rechazo de aloinjertos (Kahan *et al.*, *Transplantation* 67: 276-84, 1999) y el tratamiento de la psoriasis (Owen y Harrison, *Clin. Exp. Dermatol.* 25: 195-7, 2000). Un ejemplo de anticuerpo anti-p55 humano de uso en los métodos de la invención es HuMax-TAC, desarrollado por Genmab. En otro ejemplo, un antagonista del receptor de IL-2 es un anticuerpo que se une específicamente a p75 o la subunidad β de IL-2R.

Hay otros anticuerpos adicionales que se unen específicamente al receptor de IL-2 conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase la patente de EE.UU. N° 5.011.684; patente de EE.UU. N° 5.152.980; patente de EE.UU. N° 5.336.489; patente de EE.UU. N° 5.510.105; patente de EE.UU. N° 5.571.507; patente de EE.UU. N° 5.587.162; patente de EE.UU. N° 5.607.675; patente de EE.UU. N° 5.674.494; patente de EE.UU. N° 5.916.559. El anticuerpo mik- β 1 es un antagonista que se une específicamente a la cadena β del IL-2R humano.

En otro ejemplo, un antagonista del receptor de IL-2 es un antagonista peptídico que no es un anticuerpo. También se conocen antagonistas peptídicos del receptor de IL-2, incluyendo los antagonistas de Tac (p55) y p75 (IL-2R β). Por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.635.597, se revelan antagonistas peptídicos de p55 y p75. Estos péptidos también se usan de en los métodos desvelados en el presente documento.

En un ejemplo adicional, un antagonista del receptor de IL-2 es un compuesto químico o una molécula pequeña que se une específicamente al receptor de IL-2 e inhibe una función biológica del receptor.

Fragmento de anticuerpo (fragmento con unión a un antígeno específico): se han definido varios fragmentos de anticuerpos, incluyendo Fab, (Fab')₂, Fv y Fv monocatenario (scFv). Estos fragmentos de anticuerpo se definen de la siguiente manera: (1) Fab: el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo producida por la digestión del anticuerpo entero con la enzima papaína, produciendo una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada o, de manera equivalente, por ingeniería genética; (2) Fab': el fragmento de una molécula de anticuerpo obtenido tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de la reducción, produciendo una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo obtenido tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior o, de manera equivalente, por ingeniería genética; (4) F(Ab')₂: un dímero de dos fragmentos FAB' mantenidos en unión por enlaces disulfuro; (5) Fv: un fragmento modificado por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y (6) anticuerpos monocatenarios ("SCA"): una molécula diseñada por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente. Los métodos de fabricación de estos fragmentos son habituales en la técnica.

Trastorno autoinmune: trastorno donde el sistema inmune produce una respuesta inmune (por ejemplo, una célula B o una respuesta de células T) frente a un antígeno endógeno, con el consiguiente daño en los tejidos.

Interferón- β : cualquier interferón- β , incluyendo interferón- β 1a e interferón- β 1b.

El interferón- β 1a es una glucoproteína de 166 aminoácidos con un peso molecular previsto de aproximadamente 22.500 daltons. El interferón- β 1a, conocido como Avonex®, se produce mediante tecnología de ADN recombinante usando células de mamífero (células de ovario de hámster chino) en las que se ha introducido el gen del interferón- β humano. La secuencia de aminoácidos de Avonex® es idéntica a la del interferón- β humano natural. Los productos génicos y los marcadores inducidos por el interferón, incluyendo la 2',5'-oligoadenilato sintetasa, la β_2 -microglobulina

y la neopterina, se han medido en el suero y fracciones celulares de sangre recogida de pacientes tratados con Avonex®. Avonex® fue aprobado en 1996 y es comercializado por Biogen, Inc. Se ha demostrado que Avonex® reduce el número de las lesiones realizadas con gadolinio (Gd) en los sujetos que han recibido el fármaco durante dos años hasta en un 13 % y mejora aproximadamente el 22 % de las puntuaciones de la escala extendida del estado de la discapacidad (EDSS) de los sujetos.

Otro interferón-β 1a fue aprobado en 2002 y se conoce como Rebif®, comercializado por Serono, Inc. El interferón-β 1a conocido como Rebif®, ha sido aprobado recientemente para el tratamiento de la EM remitente-recurrente. La principal diferencia entre Avonex® y Rebif® es el método de administración, la inyección intramuscular para el primero y la inyección subcutánea para el segundo. De acuerdo con Samkoff, *Hosp. Phys.*, pág. 21-7 (2002), Rebif® puede reducir las tasas de recaída en el 33 % de los sujetos que toman el fármaco.

El interferón-β 1b es una proteína altamente purificada que tiene 165 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 18.500 daltons. Una interferón-β 1b conocido como Betaseron® fue aprobado como tratamiento para la EM en 1993 y es comercializado por Berlex Laboratories, Inc. Betaseron® se fabrica mediante la fermentación bacteriana de una cepa de *Escherichia coli* que porta un plásmido creado por ingeniería genética que contiene el gen de interferón-β humano. Se obtuvo el gen nativo a partir de fibroblastos humanos y se modificó para sustituir la serina por el resto de cisteína encontrado en la posición 17. De acuerdo con "Physicians' Desk Reference" (1996), el Betaseron® ha demostrado reducir la tasa de agravamiento en los sujetos que toman el fármaco en aproximadamente un 31 %. Los mecanismos mediante los que el interferón-β 1b ejerce sus acciones en la esclerosis múltiple no se entienden totalmente. Sin embargo, se sabe que las propiedades modificadoras de las respuestas biológicas del interferón-β 1b están mediadas a través de sus interacciones con receptores celulares específicos. La unión del interferón-β 1b con estos receptores induce la expresión de una serie de productos génicos inducidos por el interferón (por ejemplo, 2',5'-oligoadenilato sintetasa, proteína quinasa e indolamina 2,3-dioxigenasa), que se cree que son mediadores de las acciones biológicas del interferón-β 1b.

Región determinante de la complementariedad (CDR): las CDR son tres regiones hipervariables que se encuentran dentro de cada una de las regiones variables de cadena ligera (VL) y de cadena pesada (VH) de una molécula de anticuerpo, que forman la superficie de unión al antígeno que es complementaria a la estructura tridimensional del antígeno unido. Partiendo del terminal N de una cadena pesada o ligera, estas regiones determinantes de la complementariedad se denotan como "CDR1", "CDR2" y "CDR3", respectivamente. Las CDR están implicadas en la unión antígeno-anticuerpo, y la CDR3 comprende una región única específica de la unión antígeno-anticuerpo. Por lo tanto, un sitio de unión al antígeno puede incluir seis CDR, comprendiendo las regiones CDR de cada una de las regiones V de cadena pesada y cadena ligera. La alteración de un solo aminoácido dentro de una región CDR puede destruir la afinidad de un anticuerpo hacia un antígeno específico (véase Abbas *et al.*, "Cellular and Molecular Immunology", IV ed. 143-5, 2000). Las ubicaciones de las CDR han sido definidas de forma precisa, por ejemplo, por Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunologic Interest", Departamento estadounidense de sanidad y servicios sociales, 1983.

Epítipo: el sitio en un antígeno reconocido por un anticuerpo según lo determinado por la especificidad de la secuencia de aminoácidos. Se dice que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo si cada uno inhibe competitivamente (bloquea) la unión del otro con el antígeno según lo medido en un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 50: 1495-1502, 1990). Como alternativa, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si la mayoría de las mutaciones de aminoácidos del antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Se dice que dos anticuerpos tienen epítipos superpuestos si cada uno inhibe parcialmente la unión del otro con el antígeno y/o si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

Región marco (FR): secuencias relativamente conservadas que flanquean las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) altamente divergentes dentro de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo. Por consiguiente, la región variable de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo consiste en una FR y tres CDR. Algunos restos de la FR pueden comunicarse con el antígeno unido. Sin embargo, las FR son principalmente responsables de plegar la región variable en el sitio de unión al antígeno, particularmente los restos de la FR que son directamente adyacentes a las CDR. Sin quedar vinculados a teoría alguna, la región marco de un anticuerpo sirve para posicionar y alinear las CDR. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan relativamente dentro de una especie. Una región marco "humana" es una región marco que es sustancialmente idéntica (aproximadamente el 85 % o más, por lo general, 90-95 % o más) a la región marco de una inmunoglobulina humana de origen natural.

Inmunoglobulina: proteína que incluye uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa (IgA), gamma (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), delta (IgD), épsilon (IgE) y mu (IgM), así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras de inmunoglobulina de longitud completa son generalmente de aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos de longitud. Las cadenas pesadas de inmunoglobulina de longitud completa son generalmente de aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos de longitud. Las cadenas

ligeras están codificadas por un gen de la región variable en el extremo NH₂ (aproximadamente 110 aminoácidos de longitud) y un gen de la región constante kappa o lambda en el extremo COOH. Las cadenas pesadas están codificadas de manera similar por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos de longitud) y uno de los otros genes de región constante.

La unidad estructural básica de un anticuerpo es generalmente un tetrámero que consiste en dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada. En cada par, las regiones variables de cadena ligera y pesada se unen a un antígeno, y las regiones constantes median las funciones efectoras. Las inmunoglobulinas también existen en una variedad de otras formas incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab, y (Fab')₂, así como anticuerpos híbridos bifuncionales y cadenas sencillas (por ejemplo, Lanzavecchia *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 17: 105, 1987; Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Science. EE.UU.*, 85: 5879-5883, 1988; Bird *et al.*, *Science* 242: 423-426, 1988; Hood *et al.*, *Immunology*, Benjamin, Nueva York, II ed., 1984; Hunkapiller y Hood, *Nature* 323: 15-16, 1986).

Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina incluye una región marco interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", E. Kabat *et al.*, Departamento estadounidense de sanidad y servicios sociales, 1983). Como se ha indicado anteriormente, las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno.

Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de la cadena ligera o pesada se han construido, normalmente por ingeniería genética, a partir de genes de regiones variables y constantes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden unir a segmentos constantes humanos, tales como kappa y gamma 1 o gamma 3. En un ejemplo, un anticuerpo quimérico terapéutico es, por tanto, una proteína híbrida compuesta del dominio variable o de unión al antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio constante o efector de un anticuerpo humano (por ejemplo, el número de registro ATCC CRL 9688 segrega un anticuerpo quimérico anti-Tac), aunque se pueden usar otras especies de mamíferos, o se pueden producir la región variable por técnicas moleculares. Los métodos de fabricación de anticuerpos quiméricos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, véase la patente de EE.UU. N° 5.807.715.

Una inmunoglobulina "humanizada" es una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (tal como de ratón, rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "aceptor". En una realización, todas las CDR proceden de la inmunoglobulina donante de una inmunoglobulina humanizada. No es necesaria la presencia de las regiones constantes, pero si están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente del 85 al 90 %, tal como aproximadamente del 95 % o más idénticas. Por consiguiente, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de la inmunoglobulina humana natural. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada de inmunoglobulina. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. El marco aceptor de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado puede tener un número limitado de sustituciones con aminoácidos tomados a partir del marco donante. Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones conservadoras de aminoácidos adicionales que no tengan sustancialmente ningún efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones de la inmunoglobulina. Los ejemplos de sustituciones conservadoras son aquellas tales como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, Tyr (véase la patente de EE.UU. N° 5.585.089). Es posible construir inmunoglobulinas humanizadas por medio de ingeniería genética, por ejemplo, véase la patente de EE.UU. N° 5.225.539 y en la patente de EE.UU. N° 5.585.089.

Un anticuerpo humano es un anticuerpo donde los genes de las cadenas ligera y pesada son de origen humano. Los anticuerpos humanos se pueden generar usando métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanos se pueden producir por inmortalización de una célula B humana que segregue el anticuerpo de interés. La inmortalización se puede realizar, por ejemplo, mediante infección por EBV o mediante la fusión de una célula B humana con un mieloma o célula de hibridoma para producir una célula de trioma. Los anticuerpos humanos también se pueden producir mediante métodos de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Dower *et al.*, publicación PCT N° WO91/17271.; McCafferty *et al.*, Publicación PCT N° WO92/001047; y Winter, publicación PCT N° WO92/20791), o seleccionar de una biblioteca combinatoria de anticuerpos monoclonales humanos (véase el sitio web Morphosys). Los anticuerpos humanos también se pueden preparar mediante el uso de animales transgénicos portadores de un gen de inmunoglobulina humana (por ejemplo, véase Lonberg *et al.*, publicación PCT N° WO93/12227; y Kucherlapati, publicación PCT N° WO91/10741).

Interleucina 2 (IL-2): proteína de 133 aminoácidos (15,4 kDa) con un pH ligeramente básico que no muestra homología de secuencia con ningún otro factor. La IL-2 murina y humana muestran una homología del aproximadamente 65 %. La IL-2 se sintetiza como una proteína precursora de 153 aminoácidos con los primeros 20 aminoácidos amino-terminales funcionando como una secuencia señal secretora hidrófoba. La proteína contiene un

solo enlace disulfuro (posiciones Cys58/105) esencial para la actividad biológica. El gen de IL-2 humano contiene cuatro exones y se correlaciona con el cromosoma humano 4q26-28 (cromosoma murino 3).

Las actividades biológicas de la IL-2 están mediadas por un receptor de membrana que se expresa sobre células T y células NK (linfocito citolítico natural) activadas, pero no en reposo. Las células B activadas y los leucocitos mononucleares en reposo también expresan raramente este receptor.

Receptor de IL-2: receptor celular que se une a IL-2 y media en sus efectos biológicos. Se distinguen tres tipos diferentes de receptores de IL-2 que se expresan diferencial e independientemente. El receptor de IL-2 de alta afinidad ($K_d \sim 10$ pM) constituye aproximadamente el 10 % de todos los receptores de IL-2 expresados por las células. Este receptor es un complejo de receptor de membrana que consiste en las dos subunidades: IL-2R- α (también conocido como antígeno de activación de células T (TAC) o p55) e IL-2R- β (también conocido como p75 o CD122). Un receptor de IL-2 de afinidad intermedia ($K_d = 100$ pM) consiste en la subunidad p75 y una cadena γ , mientras que un receptor de baja afinidad ($K_d = 10$ nM) está formado solo por p55.

p75 tiene una longitud de 525 aminoácidos. Tiene un dominio extracelular de 214 aminoácidos y un dominio citoplasmático de 286 aminoácidos. El gen p75 se correlaciona con el cromosoma humano 22q11. 2-m12 contiene 10 exones y tiene una longitud de aproximadamente 24 kb. p55 tiene una longitud de 251 aminoácidos con un dominio extracelular de 219 aminoácidos y un dominio citoplasmático muy corto de 13 aminoácidos. El gen que codifica p55 se correlaciona con el cromosoma humano 10p14-p15.

p75 se expresa constitutivamente en linfocitos T en reposo, células NK y una serie de otros tipos de células, mientras que la expresión de p55 solo se observa, por lo general, tras la activación. Los linfocitos activados secretan continuamente un fragmento de 42 kDa de p55 (antígeno TAC). Este fragmento circula en el suero y el plasma, y funciona como un receptor de IL-2 soluble (véase Smith, *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 397-425, 1989; Taniguchi y Minami, *Cell* 73: 5-8, 1993).

p55 tiene una longitud de 251 aminoácidos con un dominio extracelular de 219 aminoácidos y un dominio citoplasmático de muy corto de 13 aminoácidos. El gen p55 se correlaciona con el cromosoma 10p14-p15 humano. La expresión de p55 está regulada por una proteína nuclear denominada RPT-1.

Se ha descrito una tercera subunidad de 64 kDa del receptor de IL2, designada γ . Esta subunidad es necesaria para la generación de receptores de IL-2 de afinidad alta e intermedia, pero no se une con IL-2 por sí misma. El gen que codifica la subunidad γ del receptor de IL2 se correlaciona con el cromosoma humano Xq13, abarca aproximadamente 4,2 kb y contiene ocho exones.

Generación de imágenes por resonancia magnética: técnica de diagnóstico no invasiva que produce imágenes informatizadas de los tejidos corporales internos y que se basa en la resonancia magnética nuclear de átomos del interior del cuerpo inducida por la aplicación de ondas de radio.

La IRM cerebral es una importante herramienta para la comprensión de la patología dinámica de la esclerosis múltiple. La IRM cerebral ponderada en T_2 define lesiones con alta sensibilidad en la esclerosis múltiple y se usa como una medida de la carga de la enfermedad. Sin embargo, dicha alta sensibilidad se produce a expensas de la especificidad, pues los cambios de la señal T_2 pueden reflejar zonas de edema, desmielinización, gliosis y pérdida axonal. Se cree que las zonas realzadas con gadolinio (Gd) observadas en la IRM cerebral ponderada en T_1 reflejan la alteración de la barrera hematoencefálica subyacente a partir de la inflamación perivascular activa. Dichas zonas realzadas son transitorias y, por lo general, de una duración < 1 mes. Por lo tanto, las IRM cerebrales ponderadas en T_1 realzadas con gadolinio se usan para evaluar la actividad de la enfermedad. La mayoría de las lesiones ponderadas en T_2 en la materia blanca central de los sujetos con esclerosis múltiple comienzan con un período variable de dilatación por el gadolinio (Gd) ponderada en T_1 , representando dicha dilatación por el Gd ponderada en T_1 y las lesiones en T_2 etapas de un mismo proceso patológico. Las técnicas de IRM del cerebro para evaluar las lesiones realzadas con gadolinio en T_1 y T_2 son convencionales (por ejemplo, véase Lee *et al.*, *Brain* 122 (Pt 7): 1211-2, 1999).

Anticuerpo monoclonal: anticuerpo producido por un solo clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de cadena ligera y pesada de un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la fabricación de células formadoras de anticuerpos híbridos a partir de una fusión de células de mieloma con células de bazo inmunes.

Esclerosis múltiple: enfermedad autoinmune clásicamente descrita como un trastorno de la materia blanca del sistema nervioso central diseminado en el tiempo y en el espacio, que se presenta como una enfermedad recurrente-remitente en el 80-85 % de los pacientes. El diagnóstico se puede realizar mediante generación de imágenes por resonancia magnética (IRM) del cerebro y de la médula espinal, análisis de potenciales evocados somatosensoriales y análisis del líquido cefalorraquídeo para detectar el aumento de cantidades de inmunoglobulina o bandas oligoclonales. La IRM es una herramienta de diagnóstico especialmente sensible. Las anomalías detectadas por IRM que indican la presencia o progresión de la EM incluyen señales hiperintensas de sustancia

blanca en las imágenes atenuadas de recuperación de inversión de líquido y ponderadas en T₂, dilatación por el gadolinio de las lesiones activas, "agujeros negros" hipointensos (que representan gliosis y la patología axonal) y la atrofia cerebral en estudios ponderados en T₁. Se pueden usar estudios de IRM en serie para indicar la progresión de la enfermedad.

5 La esclerosis múltiple recurrente-remitente es un curso clínico de la EM que se caracteriza por ataques agudos claramente definidos con una recuperación total o parcial y sin progresión de la enfermedad entre los ataques.

10 La esclerosis múltiple progresiva secundaria es un curso clínico de la EM que, en un principio, es recurrente-remitente y luego se vuelve progresiva a una velocidad variable, posiblemente, con una recaída ocasional y una remisión menor.

La esclerosis múltiple progresiva primaria se presenta inicialmente en forma progresiva.

15 **Polipéptido:** polímero en el que los monómeros son restos de aminoácido que están unidos entre sí a través de enlaces amida. Cuando los aminoácidos son aminoácidos α, se puede usar bien el isómero óptico L o el isómero óptico D, prefiriéndose los isómeros L. Los términos "polipéptido" o "proteína", como se usan en el presente documento, pretenden abarcar cualquier secuencia de aminoácidos, e incluyen secuencias modificadas tales como glucoproteínas. El término "polipéptido" pretende englobar específicamente proteínas de origen natural, así como
20 aquellas que se producen de forma recombinante o sintética.

El término "fragmento" se refiere a una porción de un polipéptido que es de al menos 8, 10, 15, 20 o 25 aminoácidos de longitud. La expresión "fragmentos funcionales de un polipéptido" se refiere a todos los fragmentos de un polipéptido que conservan una actividad del polipéptido (por ejemplo, la unión de un antígeno). Los fragmentos
25 biológicamente funcionales, por ejemplo, pueden variar en tamaño desde un fragmento de polipéptido tan pequeño como un epítipo capaz de unirse a una molécula de anticuerpo a un polipéptido grande capaz de participar en la inducción o la programación característica de los cambios fenotípicos de una célula. El término "soluble" se refiere a una forma de un polipéptido que no se inserta en una membrana celular.

30 **Agente farmacéutico o fármaco:** compuesto o composición química capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra correctamente a un sujeto.

Vehículos farmacéuticamente aceptables: los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles en los métodos desvelados en el presente documento son convencionales. En "Remington's Pharmaceutical Sciences", por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, XV Edición (1975), se describen composiciones y formulaciones
35 adecuadas para la administración farmacéutica de los antagonistas del receptor de IL-2 desvelados en el presente documento.

En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que se esté empleando. Por
40 ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para las composiciones sólidas (por ejemplo, formas en polvo, píldoras, comprimidos o cápsulas), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los vehículos
45 biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas por administrar pueden contener sustancias adyuvantes no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, sales, aminoácidos y agentes de tamponamiento del pH y similares, por ejemplo, cloruro de sodio o potasio, o fosfato, Tween, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

50 **Purificado:** el término purificado no requiere una pureza o un aislamiento absoluto; más bien, se pretende usar como un término relativo. Así pues, por ejemplo, una preparación de proteína purificada o aislada es aquella en la que la proteína está más enriquecida que la proteína que está en su entorno generativo, por ejemplo, dentro de una célula o en una cámara de reacción bioquímica. Preferentemente, una preparación de la proteína se purifica de manera que la proteína representa al menos el 50 % del contenido total de proteína de la preparación. Para los
55 productos farmacéuticos, se puede utilizar la pureza "sustancial" del 90 %, 95 %, 98 % o incluso 99 % o superior del agente activo.

Identidad de secuencia: la similitud entre dos secuencias de ácidos nucleicos o dos secuencias de aminoácidos se expresa en términos de similitud entre las secuencias, denominada también identidad de secuencia. La identidad de
60 secuencia frecuentemente se mide en términos de porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor sea el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los homólogos u ortólogos de los anticuerpos de IL-2R o fragmentos de unión al antígeno, y la secuencia de ADNc correspondiente, poseerán un grado relativamente alto de identidad de secuencia cuando se alinean usando métodos convencionales. Esta homología será más significativa cuando las proteínas ortólogas o ADNc se obtengan de especies que estén más estrechamente relacionadas, en
65 comparación con las especies más alejadas (por ejemplo, las secuencias humana y murina).

Los métodos de alineación de secuencias para su comparación son muy conocidos en la técnica. Varios programas y algoritmos de alineación se describen en Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 2444, 1988; Higgins y Sharp, *Gene* 73: 237-244, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151-153, 1989; Corpet *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 16: 10881-90, 1988; Huang *et al.*, *Computer Appls. in the Biosciences* 8: 155-65, 1992; y Pearson *et al.*, *Meth. Mol. Bio.* 24: 307-31, 1994. Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990, presentan un examen detallado de los métodos de alineación de secuencias y cálculos de homología.

Agente de unión específica: agente que se une sustancialmente solo a una diana definida. Así pues, un agente de unión específico del receptor de IL-2 se une sustancialmente solo al receptor de IL-2, o un componente del mismo. Como se usa en el presente documento, la expresión "agente de unión específico del receptor de IL-2" incluye anticuerpos contra el receptor de IL-2 y otros agentes que se unen sustancialmente solo a un receptor de IL-2 o un componente del mismo (por ejemplo, p55, p75).

Los anticuerpos contra el receptor de IL-2 se pueden producir usando procedimientos convencionales descritos en una serie de textos, incluyendo Harlow y Lane ("Using Antibodies, A Laboratory Manual", CSHL, Nueva York, 1999, ISBN 0-87969-544-7). Además, ciertas técnicas pueden mejorar la producción de anticuerpos neutralizantes (patente de EE.UU. N° 5.843.454; patente de EE.UU. N° 5.695.927; patente de EE.UU. N° 5.643.756; y la patente de EE.UU. N° 5.013.548). La determinación de que un determinado agente se une sustancialmente solo a un componente del receptor de IL-2 se puede realizar fácilmente mediante el uso o la adaptación de procedimientos rutinarios. Un ensayo *in vitro* adecuado hace uso del procedimiento de transferencia Western (descrito en muchos textos convencionales, incluyendo Harlow y Lane, 1999). La transferencia Western se puede usar para determinar que un agente de unión a proteínas dado, tal como un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-2, se une sustancialmente solo al receptor de IL-2. Los anticuerpos contra el receptor de IL-2 son muy conocidos en la técnica.

Los fragmentos más cortos de anticuerpos también pueden servir como agentes de unión específicos. Por ejemplo, los Fab, Fv y Fv monocatenarios (scFv) que se unen a un receptor de IL-2 serían agentes de unión específicos del receptor de IL-2.

Sujeto: un ser humano o un animal. En una realización, el sujeto tiene esclerosis múltiple.

Un sujeto que tiene esclerosis múltiple que no ha respondido a un protocolo terapéutico (tal como la administración de interferón- β) es un sujeto que no responde o no responde adecuadamente a la terapia, de manera que su afección no ha mejorado lo suficiente, no ha cambiado o se ha deteriorado como consecuencia del tratamiento con una cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco. Un sujeto que no ha respondido a un protocolo terapéutico puede requerir dosis crecientes del fármaco para lograr un efecto deseado.

En un ejemplo, el hecho de que un sujeto con EM no responda a un agente terapéutico, tal como interferón- β , se puede medir como una recurrencia de las lesiones detectadas por IRM con agente de contraste de Gd hasta al menos la mitad de la media de las lesiones de contraste mensuales de la línea basal durante seis meses. En otros ejemplos, un sujeto con EM que no responde a un agente terapéutico, tal como el tratamiento con interferón- β , se identifica porque el sujeto experimenta uno o más agravamientos en un período de 18 meses de terapia con interferón- β , presentando un aumento de 1 punto o superior en la EDSS durante 18 meses de tratamiento, o tiene persistencia o recurrencia de lesiones realizadas con medio de contraste en las exploraciones de IRM del cerebro hasta al menos la mitad de la media de una línea basal de las lesiones realizadas con medio de contraste establecidas mensualmente durante un período de línea basal de 6 meses medido antes del comienzo de la terapia con interferón- β .

Sin quedar ligados a teoría alguna, un sujeto puede no responder al tratamiento con IFN debido al desarrollo de anticuerpos neutralizantes, aunque la ausencia de respuesta al tratamiento con IFN también se puede detectar en ausencia de anticuerpos neutralizantes (fallo primario). En un ejemplo, un sujeto que no responde al tratamiento con interferón- β es un sujeto que desarrolla anticuerpos neutralizantes que se unen específicamente al interferón- β , de manera que se requieren dosis crecientes para observar un efecto o para modificar un signo o síntoma de la EM.

Síntoma y indicio: cualquier prueba subjetiva de la enfermedad o de una afección del sujeto, es decir, dicha prueba como la percibe el sujeto; un cambio notable en el estado de un sujeto que indique cierto estado físico o mental. Un "indicio" es cualquier anomalía indicativa de la enfermedad que se detecte al explorar o evaluar un sujeto. Un indicio, generalmente, es una indicación objetiva de la enfermedad. Los indicios incluyen, pero sin limitación, cualquier parámetro medible tal como ensayos para el estado inmunológico o la presencia de lesiones en un sujeto con esclerosis múltiple.

Cantidad terapéuticamente eficaz: dosis suficiente para prevenir el avance, o para provocar la regresión de la enfermedad, o que es capaz de reducir los síntomas causados por una enfermedad tal como la esclerosis múltiple.

Zenapax® (daclizumab): un determinado anticuerpo monoclonal humanizado, recombinante, del isotipo IgG1

humano que se une específicamente a Tac (p55). Los genes recombinantes que codifican Zenapax® son un material compuesto de secuencias de anticuerpo humano (aproximadamente 90 %) y murino (aproximadamente 10 %). El anticuerpo anti-Tac murino 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 células linfoides. El anticuerpo anti-Tac murino se "humanizaba" mediante la combinación de las regiones determinantes de la complementariedad y otros restos seleccionados del anticuerpo anti-Tac murino con las regiones marco y constantes del anticuerpo IgG1 humano. El anticuerpo anti-Tac humanizado daclizumab está descrito, y su secuencia se muestra en la patente de EE.UU. N° 5.530.101, véase la SEC ID N° 5 y SEC ID N° 7 para las regiones variables de cadena pesada y ligera, respectivamente. La patente de EE.UU. N° 5.530.101 y Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1029-1033, 1989 se encuentran en el presente documento por referencia.

El Daclizumab inhibe la proliferación de células T inducida por el antígeno dependiente de IL-2 y la respuesta mixta de linfocitos (MLR) (Junghans *et al.*, *Cancer Research* 50: 1495-1502, 1990), así como otros anticuerpos de uso en los métodos desvelados en el presente documento.

El Zenapax® ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) estadounidense para la profilaxis del rechazo agudo de órganos en pacientes que reciben trasplantes renales, como parte de un régimen inmunosupresor que incluye ciclosporina y corticosteroides. El Zenapax® ha demostrado ser activo en el tratamiento de la mielopatía/paraparesia espástica tónica asociada con el virus linfotrópico de tipo 1 de células T humanas (HAM/TSP, véase Lehky *et al.*, *Ann. Neuro.*, 44: 942-947, 1998). También se ha descrito el uso de Zenapax® para tratar la uveítis posterior (véase Nussenblatt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 7462-7466, 1999).

A menos que se expliquen de otro modo, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Los términos en singular "un", "uno", "una", "el" y "ella" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" pretende incluir "y", a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, se ha de entender que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular dados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan a modo descriptivo. Aunque, en la práctica o el ensayo de la presente divulgación, se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen los métodos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye".

En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo la explicación de los términos y las expresiones. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Métodos para el tratamiento de sujetos con esclerosis múltiple

En el presente documento, se proporciona un antagonista del receptor de IL-2 para el tratamiento de sujetos que tienen esclerosis múltiple. En una realización, el sujeto tiene esclerosis múltiple recurrente-remite. Sin embargo, los antagonistas desvelados en el presente documento también se pueden usar para el tratamiento de sujetos con otras formas de esclerosis múltiple, tales como la esclerosis múltiple progresiva primaria o secundaria.

En ciertas realizaciones, el antagonista del receptor de IL-2 se usa para tratar pacientes que no han respondido adecuadamente al tratamiento solo con interferón-β. La ausencia de respuesta al tratamiento solo con interferón-β, en algunos ejemplos, se demuestra porque el sujeto experimenta uno o más agravamientos en un período de 18 meses de terapia con interferón-β, un aumento de 1 punto o más en la escala de EDSS durante 18 meses de tratamiento, o la persistencia o recurrencia de lesiones realizadas con medio de contraste en exploraciones de IRM del cerebro hasta al menos la mitad de la media de una línea basal de lesiones realizadas con medio de contraste establecidas mensualmente a lo largo de un período de línea basal de 6 meses medido antes del comienzo de la terapia con interferón-β. También se pueden usar otros indicadores de la progresión de la enfermedad o de la actividad conocidos por los expertos en la materia para determinar si un sujeto no ha respondido a la terapia con interferón-β. La terapia con interferón-β puede ser el tratamiento con interferón-β 1b, interferón-β 1a, o ambos tipos de interferón.

En una realización específica, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del receptor de IL-2 (IL-2R) al sujeto sin la administración simultánea de interferón-β. En el tratamiento de la esclerosis múltiple, se puede utilizar un solo antagonista de IL-2R o se puede utilizar una combinación de antagonistas de IL-2R. El antagonista de IL-2R es un agente que se une al IL-2R en los linfocitos T activados e inhibe la actividad del receptor.

El antagonista del receptor de IL-2 es un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano. Un ejemplo específico de un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a p55 es daclizumab, que está descrito y su secuencia expuesta en la patente de EE.UU. N° 5.530.101 y en Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1029-1033, 1989. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser una inmunoglobulina humanizada que tenga regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una

inmunoglobulina donante, y marcos de la región variable de cadena pesada y ligera de marcos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina aceptora humana, donde la inmunoglobulina humanizada se une específicamente a un receptor de la interleucina-2 humana con una constante de afinidad de al menos 10^8 M^{-1} . La secuencia del marco de la región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina humanizada puede ser al menos un 65 % idéntica a la secuencia del marco de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina donante. Un ejemplo específico de la región variable del anticuerpo anti-Tac se expone como SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3 de la patente de EE.UU. N° 5.520.101 (cadena ligera y pesada, respectivamente), y la región variable del anticuerpo anti-Tac humanizado daclizumab se expone como SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 7 (cadena pesada y ligera, respectivamente) de la patente de EE.UU. N° 5.530.101.

El anticuerpo puede incluir dos dímeros de cadena ligera/cadena pesada, y se une específicamente a p55 (tal como el anticuerpo anti-Tac) o a p75. Los antagonistas de IL-2R de uso incluyen agentes que se unen específicamente a p55 (también conocida como la cadena α o subunidad Tac) del IL-2R humano. En un ejemplo, el agente es un anticuerpo monoclonal tal como daclizumab, basiliximab, BT563 y 7G8, o sus formas químicas o humanizadas. El agente también puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado con CDR sintéticas, que se une específicamente a p55. Los anticuerpos que se unen al mismo epítipo (o solapante) que daclizumab o basiliximab también se pueden usar en los métodos desvelados en el presente documento. En otras realizaciones, el anticuerpo tendrá alta identidad de secuencia con daclizumab o basiliximab, al menos un 90 o 95 %, tal como al menos un 98 % o 99 % de identidad de secuencia, al tiempo que conserva las propiedades funcionales del anticuerpo, es decir, sus propiedades antagonistas contra el IL-2R. El anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, pero en varias realizaciones, el anticuerpo es una IgG, incluyendo, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En otras realizaciones, el anticuerpo es basiliximab, comercializado como Simulect® por Novartis Pharma AG. Simulect® es un anticuerpo monoclonal quimérico (murino/humano) (IgG_{1k}), producido mediante tecnología de ADN recombinante, que funciona como un agente inmunosupresor, uniéndose específicamente a y bloqueando la cadena α de IL-2R en la superficie de linfocitos T activados. Simulect® es una glucoproteína obtenida a partir de la fermentación de una línea celular de mieloma murina establecida, diseñada por ingeniería genética para expresar plásmidos que contengan los genes de la región constante de cadena pesada y ligera humana, y los genes de la región variable de cadena pesada y ligera murina que codifican el anticuerpo RFT5 que se une selectivamente a IL-2R (α). Basándose en la secuencia de aminoácidos, el peso molecular calculado de la proteína es de 144 kilodaltons.

También se describe que el antagonista de IL-2R es una molécula que se une a otras subunidades del receptor de IL-2, tales como Mik- β 1 o Mik- β 2, o sus versiones químicas o humanizadas, que se unen a la cadena β del IL-2R humano, u otro anticuerpo que se une específicamente a p75 (véase la patente de EE.UU. N° 5.530.101).

El antagonista de IL-2R también puede ser un fragmento de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o humano) tal como un Fab, (Fab')₂, Fv o scFv. Además, el fragmento se puede pegar para aumentar su semivida.

En algunos ejemplos, el antagonista de IL-2R es una combinación de agentes anti-IL-2R. Por ejemplo, Zenapax® y Simulect® se administran juntos como un cóctel, o los agentes se alternan en la pauta de administración.

El antagonista de IL-2R, tal como un anticuerpo humanizado que se une específicamente a IL-2R, se puede usar en combinación con otros anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales humanos reactivos con otros marcadores sobre células responsables de una enfermedad. Por ejemplo, los marcadores adecuados de células T pueden incluir los que se agrupan en los denominados "Grupos de diferenciación", (antígenos CD, véase "the First International Leukocyte Differentiation Workshop, Leukocyte Typing", Bernard *et al.*, Eds., Springer-Verlag, N. Y., 1984). En otro ejemplo, el otro anticuerpo se une e inhibe una linfoquina, tal como IFN- γ , o un receptor de linfoquinas. En un ejemplo, el otro anticuerpo se une a la integrina α 5 β 1 (VLA-5), de los cuales un anticuerpo a modo de ejemplo particularmente preferido es Antegren® (Elan Pharmaceuticals y Biogen, Inc.).

El antagonista de IL-2R se puede administrar parenteralmente, es decir, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa o por medio de un dispositivo de inyección sin aguja. Las composiciones para la administración parenteral incluirán comúnmente una solución del antagonista de IL-2R (por ejemplo, el anticuerpo) en un vehículo farmacéuticamente aceptable como se ha descrito anteriormente. La concentración de anticuerpo en las formulaciones puede variar ampliamente, es decir, de menos del aproximadamente 0,5 %, normalmente del 0 al menos aproximadamente 1 % hasta tanto como el 15 o 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.

Los métodos para la preparación de composiciones farmacéuticas son conocidos por los expertos en la materia (véase "Pharmaceutical Science de Remington", XV ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980).

Los anticuerpos de uso en los métodos desvelados en el presente documento se pueden congelar o liofilizar para su

almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes de su uso. El experto en la materia puede diseñar fácilmente las técnicas de liofilización y reconstitución adecuadas.

El antagonista de IL-2R se puede administrar para tratamientos terapéuticos de un sujeto con esclerosis múltiple. Por lo tanto, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición a un sujeto que ya padece EM, en una cantidad suficiente para mejorar un indicio o un síntoma del trastorno. En general, una dosis adecuada de Zenapax® (daclizumab) es de aproximadamente 0,5 miligramos por kilogramo (mg/kg) a aproximadamente 3 mg/kg, tal como una dosis de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, o aproximadamente 2,5 mg/kg administrados por vía intravenosa o subcutánea. Las formas de dosificación unitaria también son posibles, por ejemplo, 50 mg, 100 mg, 150 mg o 200 mg, o hasta 400 mg por dosis. Sin embargo, también se podrían usar otras dosis superiores o inferiores, tales como de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 8 mg/kg. Se ha sugerido que son necesarios niveles en suero de 5 a 10 µg/ml para la saturación de la subunidad Tac de los receptores de IL-2 con el fin de bloquear las respuestas de los linfocitos T activados. Un experto en la materia será capaz de elaborar una pauta de administración que mantenga los niveles en suero dentro de ese intervalo, aunque se podría usar una administración que generara niveles en suero más elevados o más bajos. Es probable que las dosis de Simulect® sean inferiores, por ejemplo, de 0,25 mg/kg a 1 mg/kg, por ejemplo, de 0,5 mg/kg, o dosis unitarias de 10, 20, 40, 50 o 100 mg. El principio general de mantener el IL-2R saturado también se podría usar para guiar la elección de niveles de dosis de otros antagonistas de IL-2R tales como otros anticuerpos monoclonales.

Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones de antagonistas de IL-2R se pueden llevar a cabo con los niveles y las pautas de dosificación seleccionados por el médico tratante. En general, se administran dosis múltiples. En varios ejemplos, se utilizan múltiples administraciones de Zenapax® (daclizumab) u otros anticuerpos contra IL-2R, tales como la administración mensual, bimensual, cada 6 semanas, cada dos semanas, semanal o de dos veces por semana. Un protocolo a modo de ejemplo para la administración de Zenapax® (daclizumab), también aplicable a otros anticuerpos contra IL-2R, se describe en el apartado de ejemplos que figura más adelante.

El antagonista de IL-2R se administra sin la administración simultánea de un interferón-β, tal como interferón-β-1a o interferón-β-1b. En un ejemplo específico no limitante, se administra Zenapax® (daclizumab) sin la administración simultánea de un interferón-β, tal como interferón-β-1a o interferón-β-1b. En otro ejemplo específico no limitante, se administra Zenapax® (daclizumab) sin la administración simultánea de otros agentes farmacéuticos adicionales para tratar la esclerosis múltiple, tales como otros agentes inmunosupresores.

En otra realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del receptor de IL-2 se administra en combinación con un interferón-beta, tal como interferón-beta-1a o interferón-beta-1b.

Si el interferón-beta es interferón-beta 1b (por ejemplo, Betaseron®), una dosis ejemplar es 0,25 mg por inyección subcutánea un día sí un día no. Sin embargo, dosis mayores o menores pueden usarse, por ejemplo de 0,006 mg a 2 mg al día, dos veces al día, semanalmente, bimensualmente o mensualmente. Si el interferón-beta es interferón-beta 1a y es Avonex®, una dosis ejemplar es 30 µg inyectados intramuscularmente una vez a la semana. Sin embargo, podrían usarse dosis mayores o menores, por ejemplo de 15 a 75 µg al día, dos veces al día, semanalmente, bimensualmente o mensualmente. Si el interferón-beta 1a es Rebif®, una dosis ejemplar es 44 µg tres veces a la semana por inyección subcutánea. Sin embargo, podrían usarse dosis mayores o menores, incluyendo tratamiento una vez al día, dos veces al día, semanalmente, bimensualmente o mensualmente. Adicionalmente, la dosificación puede cambiarse durante el transcurso de la terapia. Por ejemplo, Rebif® puede administrarse a una dosis inicial de 8,8 µg durante las primeras dos semanas, después 22 µg durante las siguientes dos semanas y después a 44 µg durante el resto del periodo de terapia. En realizaciones específicas, Avonex® puede administrarse a una dosis de 30 µg a la semana o Betaseron® puede administrarse a una dosis de 0,25 mg un día sí un día no.

La administración de interferón-beta también puede realizarse en horarios estrictos o ajustables. Por ejemplo, el interferón-beta se administra una vez a la semana, un día sí un día no o en un horario ajustable, por ejemplo basado en la concentración en un sujeto. Un experto en la materia se dará cuenta de que el horario de administración particular dependerá del sujeto y de la dosificación a usarse. El horario de administración también puede ser diferente para sujetos individuales o cambiar durante el transcurso de la terapia dependiendo de la reacción del sujeto. En ejemplos específicos, el interferón-beta 1a se administra cada semana sí semana no o una vez al mes.

La administración combinada del antagonista de IL-2R e interferón-beta incluye administrar interferón-beta bien secuencialmente con el antagonista de IL-2R, es decir, el tratamiento con un primer agente y después el segundo agente, o bien administrar ambos agentes sustancialmente al mismo tiempo, es decir, una superposición al realizar la administración. Con la administración secuencial un sujeto se expone a los agentes en momentos diferentes siempre que alguna cantidad del primer agente se mantenga en el sujeto (o tenga un efecto terapéutico) cuando el otro agente se administra. El tratamiento con ambos agentes al mismo tiempo puede ser en la misma dosis, es decir, mezclados físicamente, o en dosis separadas administradas al mismo tiempo.

En una realización particular el interferón-beta 1a (por ejemplo, Avonex®) se administra una vez a la semana a través de inyección intramuscular. La primera semana de terapia el sujeto recibe una infusión intravenosa del anticuerpo monoclonal (por ejemplo, Zenapax®) al mismo tiempo que la inyección de interferón beta 1a, con una infusión de un segundo anticuerpo monoclonal anti-Tac humanizado (por ejemplo, Zenapax®) administrado dos veces a la semana después al mismo tiempo que la inyección del interferón-beta 1a (por ejemplo, Avonex®). En lo sucesivo el anticuerpo monoclonal anti-Tac humanizado (por ejemplo, Zenapax®) se administra una vez al mes al mismo tiempo que la inyección del interferón-beta 1a semanal. En otra realización el interferón-beta 1b (por ejemplo Betaseron®) se administra un día sí un día no por inyección subcutánea mientras que el anticuerpo monoclonal anti-Tac humanizado (por ejemplo, Zenapax®) se administra una semana sí una semana no durante un mes y después una vez al mes, la infusión de anticuerpo monoclonal anti-Tac humanizado (por ejemplo, Zenapax®) no necesariamente el mismo día que la inyección del interferón-beta 1b (por ejemplo, Betaseron®).

El antagonista de IL-2R también se puede usar en combinación con uno o más de otros fármacos que pueden ser activos en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Estos incluyen, pero sin limitación, Copaxone®, corticosteroides tales como la prednisona o la metilprednisolona; agentes inmunosupresores tales como ciclosporina (u otros inhibidores de la calcineurina tales como Prograf®), azatioprina, Rapamune® y Cellcept®; antimetabolitos tales como metotrexato; y agentes antineoplásicos tales como mitoxantrona.

El tratamiento con el antagonista de IL-2R, solo o en combinación con otros agentes, en promedio reducirá el número de lesiones de IRM realizadas con gadolinio en al menos un 30 %. En una realización, las lesiones de IRM realizadas con gadolinio se reducen en al menos aproximadamente un 50 % o en al menos aproximadamente un 70 %, tal como una reducción del aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o de más de un 95 %, en comparación con las mediciones de la línea basal para los mismos sujetos o con las mediciones en los sujetos de control (por ejemplo, los sujetos que no recibieron el antagonista de IL-2R). Del mismo modo, el tratamiento con el antagonista de IL-2R, solo o en combinación con otros agentes, reducirá el número medio de agravamientos de la EM por sujeto en un período dado (por ejemplo, 6, 12, 18 o 24 meses) en al menos aproximadamente un 25 %, tal como al menos aproximadamente un 40 % o al menos aproximadamente un 50 %. En una realización, el número de agravamientos de la EM se reduce en al menos aproximadamente un 80 %, tal como en al menos aproximadamente un 90 %, en comparación con los sujetos de control. Los sujetos de control pueden ser sujetos sin tratamiento o sujetos que no recibieron el antagonista de IL-2R (por ejemplo, sujetos que recibieron otros agentes). El tratamiento con el antagonista de IL-2R, solo o en combinación con otros agentes, también puede reducir la tasa media de aumento de la puntuación de discapacidad del sujeto en un cierto período (por ejemplo, 6, 12, 18 o 24 meses), por ejemplo, como se mide por la puntuación de EDSS, en al menos aproximadamente un 10 % o aproximadamente un 20 %, tal como al menos aproximadamente un 30 %, 40 % o 50 %. En una realización, la reducción en la tasa media de aumento en la puntuación de ESS es al menos de aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 75 % o al menos aproximadamente un 90 %, o incluso puede conducir a una mejora real en la puntuación de discapacidad, en comparación con los sujetos de control, tales como los sujetos no tratados o los sujetos que no recibieron el antagonista de IL-2R, pero que posiblemente recibieron otros agentes. Estos beneficios se pueden demostrar en uno o más ensayos clínicos, en fase II o III, doble ciego, controlados con placebo, aleatorios, y serán estadísticamente significativos (por ejemplo, $p < 0,05$).

La presente divulgación se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Protocolo para el uso de un anticuerpo contra el IL-2R humanizado (Zenapax®) para tratar la esclerosis múltiple

A. Objetivos

Se realizó un estudio para determinar la eficacia de la terapia con Zenapax® en sujetos con esclerosis múltiple que no habían respondido a la terapia con IFN- β convencional, comparando el número medio de lesiones realizadas con Gd durante el período de pretratamiento con el del período de tratamiento. En este estudio, también se demostró la seguridad y la tolerabilidad de Zenapax® en sujetos con esclerosis múltiple usando medidas clínicas, de IRM e inmunológicas.

Para evaluar la eficacia de la terapia con Zenapax® en sujetos con esclerosis múltiple que no habían respondido a la terapia con IFN- β convencional se usaron las siguientes medidas:

1. Medidas de IRM
 - carga de lesiones en T2,
 - volumen de las lesiones realizadas con Gd,
 - volumen de hipointensidades en T1 (opcional);

2. Medidas clínicas, en concreto:

cambio en la EDSS, cambio en la SRS (escala de clasificación neurológica de Scripps), tasa de recaída; prueba del clavijero de nueve agujeros.

3. Medidas inmunológicas, en concreto:

- 5 marcadores de linajes de células T Th1 y Th2, así como análisis de FACS de diversos marcadores de células T, producción de citocinas por células T *in vitro*, proliferación de células T.

- 10 A efectos del estudio, la ausencia de respuesta a la terapia con IFN- β convencional se definió como una recurrencia de las lesiones de la IRM realizadas con medio de contraste de Gd hasta al menos la mitad de la media de las lesiones realizadas con medio de contraste de Gd mensuales de la línea basal durante 6 meses antes del inicio del tratamiento con IFN o la ausencia de respuesta primaria al tratamiento con IFN o la presencia de recaídas clínicas durante los últimos 12 meses. Los sujetos ensayados eran no respondedores primarios a la terapia con IFN- β , es decir, en ausencia de anticuerpos neutralizantes contra el IFN- β , o no respondedores secundarios, es decir, en presencia de anticuerpos neutralizantes.

B. Esbozo del estudio

- 20 Los sujetos fueron reclutados una vez finalizados todos los procedimientos de preselección (semana -8), siempre que se documentara la ausencia de respuesta a la terapia con IFN- β convencional. Tras su inscripción, los sujetos fueron sometidos a tres resonancias magnéticas con Gd a intervalos de 4 semanas antes de la primera dosis del fármaco de estudio. Los sujetos con al menos 2 lesiones o más realizadas con Gd en las 3 exploraciones de IRM del pretratamiento (un promedio de al menos 0,67 lesiones realizadas con Gd por exploración) se consideraron aptos para pasar a la fase de tratamiento del estudio. Durante la fase de tratamiento, los sujetos recibieron siete infusiones
- 25 IV de 1 mg/kg de peso corporal de subunidad α contra el receptor de la interleucina 2 (IL-2R α ; Zenapax®), el día 0, la semana 2, la semana 6, la semana 10, la semana 14, la semana 18 y la semana 22; un total de 7 dosis) durante 5,5 meses = 22 semanas, y siguieron siendo sometidos a IRM realizadas con Gd a intervalos de 4 semanas. Tras la última dosis del fármaco del estudio, los sujetos fueron controlados durante 12 semanas. Algunos sujetos siguieron recibiendo la terapia con IFN- β convencional durante todo el estudio, mientras que en otros se interrumpió.

30

B. 1 Criterios de inclusión y exclusión para la selección del pretratamiento

Los candidatos para el estudio cumplían los siguientes criterios en el momento de la inscripción (Tabla 1):

35

Tabla 1

Criterios de inclusión

- 1) Edades comprendidas entre los 18 y 65 años, ambos inclusive.
- 2) Sujetos con EM recurrente-remitente o EM progresiva secundaria que tuvieron **más de una** recaída durante los 18 meses previos a su inscripción en el estudio. Los sujetos tenían al menos 2 o más lesiones realizadas con Gd en las 3 exploraciones de IRM realizadas en el período de pretratamiento (un promedio de al menos 0,67 lesiones realizadas con Gd por exploración).
- 3) Puntuación de la escala EDSS de entre 1-6,5, ambos inclusive.
- Los sujetos no habían respondido a la terapia con IFN- β convencional. Las ausencias de respuesta al tratamiento con IFN- β se concretaban de la siguiente manera. Los pacientes que habían recibido tratamiento con IFN durante al menos 6-12 meses y que habían tenido más de un agravamiento durante el último año, que requirió un tratamiento con esteroides intravenosos. los sujetos inscritos en ese momento en un protocolo para la administración tanto de Zenapax® como de IFN- β se consideraron aptos para una prórroga bien en una fase de aumento de la dosis o en la fase de terapia solo con Zenapax® tras 5,5 meses de terapia. Aquellos sujetos que tuvieron una reducción del 75 % o superior de la actividad de las lesiones se consideraron aptos para la fase de una sola dosis de Zenapax®, mientras que aquellos sujetos que no alcanzaron una reducción del al menos 75 % en la actividad de las lesiones se consideraron aptos para la fase aumento de la dosis.

Los candidatos fueron excluidos de entrar en el estudio si existía alguno de los criterios de exclusión en el momento de la inscripción (Tabla 2):

Tabla 2

Criterios de exclusión

Historia médica

- 1) Diagnóstico de EM progresiva primaria, definida como la progresión gradual de la discapacidad desde el inicio y sin recaídas.
- 2) análisis de sangre anómalos en la selección/pretratamiento en los que se superaba cualquiera de los límites definidos a continuación:
- alanina transaminasa (ALT) o aspartato transaminasa (AST) > dos veces el límite superior del valor normal (es

Criterios de exclusión	
decir, > 2 x ULN); - recuento total de glóbulos blancos < 3.000/mm ³ ; - recuento de CD4+ < 320/mm ³ ; - recuento de plaquetas < 80.000/mm ³ ; - creatinina > 2,0 mg/dl. 3) Simultáneamente, enfermedad <i>clínicamente relevante</i> (según lo determinado por el investigador) cardíaca, inmunológica, pulmonar, neurológica, renal y/o otra enfermedad importante. 4) Cualquier contraindicación con las terapias de anticuerpos monoclonales. 5) Sujetos que eran VIH+. Si habían recibido tratamiento previo, el sujeto quedaba excluido del tratamiento durante el tiempo necesario antes de su inscripción (véase el recuadro).	
Restricciones sobre tratamientos	
Agente	Tiempo necesario sin agente antes de su inscripción
Acetato de glatiramer (Copaxone®), ciclofosfamida Cytoxan®)	26 semanas
Ig IV, azatioprina (Imuran®), metotrexato, intercambio plasmático, ciclosporina, mielina oral, cladribina, mitoxantrona	12 semanas
Corticosteroides, ACTH	8 semanas
6) Tratamiento previo con cualquier otro fármaco en investigación o procedimiento para la EM. 7) Historia de abuso de alcohol o de drogas durante los 5 años anteriores a la inscripción. 8) Varones o mujeres que no empleaban métodos anticonceptivos adecuados. 9) Mujeres que no eran posmenopáusicas o quirúrgicamente estériles que no estuvieran usando un método anticonceptivo adecuado. La aceptabilidad de los diversos métodos anticonceptivos fue a discreción del investigador. La documentación por escrito que certifique que la paciente es posmenopáusica o quirúrgicamente estéril debía estar disponible antes del inicio del estudio. 10) Falta de voluntad o incapacidad para cumplir con los requisitos de este protocolo, incluyendo la presencia de cualquier afección (física, mental o social) que influyera en el retorno del sujeto para las visitas de seguimiento en el plazo previsto. 11) Participación previa en este estudio. 12) Mujeres en período de lactancia.	

Una cohorte de sujetos introducidos en el protocolo descrito que no presentó una reducción del 75 % en la frecuencia de las lesiones con interferón y Zenapax® recibió la dosis de Zenapax® aumentada hasta 2 mg/kg con el fin de evaluar si esta dosis de Zenapax® era segura y se toleraba bien.

5

B.2 Agente de tratamiento e infusión

Los sujetos que participaron en el estudio recibieron Zenapax® en los puntos temporales designados. La formulación anti-Tac contenía 5 mg/ml de Zenapax® y 0,2 mg/ml de Polisorbato-80 en tampón de fosfato 67 mM, pH ajustado a 6,9. La formulación estaba envasada en un volumen de 5 ml de tamaño apropiado en viales de vidrio Flint. El agente se almacenó a 2-8 °C, protegido de la luz. Se diluyó la cantidad apropiada de solución de anticuerpo a 5 mg/ml con 50 ml de solución salina normal en un mini-bolsa. El anticuerpo diluido se almacenó durante 24 horas a 2-8 °C antes de la administración. La terapia se administró por vía intravenosa a una dosis de 1 mg de Zenapax® por kg, en forma de infusión intravenosa de 15 minutos. Al final de la infusión, se lavó el tubo abundantemente con 10 ml de solución salina. El momento de las administraciones y las constantes vitales se registraron en la hoja de registro de la infusión. Las constantes vitales se tomaron y se registraron antes de la infusión, inmediatamente después de la infusión y 15 minutos después de completarse la infusión. La dosis máxima del fármaco de estudio fue de 20 ml, que es el equivalente a 200 mg de anticuerpo.

Se ventilaron los viales de Zenapax® antes de retirar el contenido. En algunos casos, se insertó una aguja de ventilación, o una aguja de calibre 20-22 unida a una jeringa (sin el émbolo), en los viales. No se inyectó aire en el espacio de cabeza de los viales ni en la solución. Tras la ventilación, se retiró el contenido de cada uno de los viales en una jeringa (con una aguja de calibre 20-22) de un tamaño suficiente para contener la dosis calculada total de Zenapax®.

Se usaron una jeringa y una aguja para extraer un volumen de solución salina equivalente a la dosis calculada de Zenapax® (más cualquier exceso de llenado) de un recipiente de 150 ml de agua estéril, aunque como alternativa, se puede usar solución salina normal (USP NaCl al 0,9 %). Se inyectó en el recipiente el contenido de la jeringa que contenía Zenapax®. Se mezcló el contenido agitando suavemente el recipiente durante unos 20 segundos, de manera que el producto reconstituido quedó listo para la infusión. La solución diluida de Zenapax® se almacenó a temperatura ambiente. La solución diluida se infundió completamente en las 4 horas posteriores a la dilución.

Para asegurar la esterilidad del material de infusión, se siguió la práctica clínica convencional. El Zenapax® se administró por una línea intravenosa dedicada a una velocidad constante durante 15 minutos y tras ello, se realizó un lavado abundante con solución salina normal. Para controlar la velocidad, se usó una bomba de infusión. El volumen del lavado con solución salina no fue inferior al volumen residual de solución retenido en el tubo IV. Para cada infusión, se usó un tubo nuevo.

Los sujetos recibieron la infusión en el transcurso de 7 días de citas programadas. Los sujetos fueron examinados en cada visita del estudio antes de iniciarse la infusión. Todos los sujetos estuvieron usando métodos anticonceptivos aceptados durante los seis meses posteriores a la finalización del tratamiento, y las mujeres no estaban embarazadas.

El Zenapax® se administró en forma de infusión IV de 15 minutos de 1 mg/kg (en función del peso corporal ideal) el día 0, la semana 2, la semana 6, la semana 10, la semana 14, la semana 18 y la semana 22; para un total de 7 dosis) durante 5,5 meses = 22 semanas tras realizarse el resto de los procedimientos requeridos en cada visita. Las IRM se realizaron en el plazo de los 7 días previos al estudio de dosificación del fármaco. En algunos sujetos, se administraron dos infusiones adicionales a intervalos de 6 semanas en las semanas 28 y 34.

C. Programa de tratamiento, incluyendo ensayos y evaluaciones

El tamaño de la muestra para el estudio inicial desvelado en el presente documento, 10 sujetos tratados, se seleccionó de acuerdo con una amplia experiencia en estudios de historia natural de EM, un estudio del IFN-β1b mediante IRM y la evaluación estadística de estos datos.

Las pruebas se realizaron de acuerdo con el programa mostrado en la Tabla 3.

Tabla 3

Programa de pruebas y evaluaciones

1. Semana -8 (Visita de selección)

A menos que se especifique lo contrario, los ensayos y las evaluaciones se realizaron durante los 7 días previos a la primera IRM del sujeto para determinar la idoneidad del sujeto:

- Historia médica completa.
- Estado de vacunación.
- Examen físico completo que incluía la medición de las constantes vitales y el peso corporal.
- Radiografía de tórax.
- ECG.
- Químicas sanguíneas.
- Hematología: CBC con recuento diferencial y de plaquetas.
- Recuento de CD4+.
- Medidas inmunológicas.
- Prueba de embarazo de orina para las mujeres en edad fértil.
- Pruebas de anticuerpos contra Zenapax® (suero almacenado hasta su análisis).
- EDSS/SRS/prueba del clavijero de nueve agujeros.
- IRM (realizada una vez completados el resto de procedimientos de selección).
- Prueba cutánea con varios antígenos de recuerdo; como alternativa, realizada en la semana 4.
- Suero para la determinación de los niveles en suero de anti-IL-2Rα (almacenado hasta su análisis).
- Estado de VIH-I.

2. Semana -4

- Constantes vitales.
- Medidas inmunológicas.
- Prueba de embarazo de orina para las mujeres en edad fértil.
- EDSS/SRS/prueba del clavijero de nueve agujeros.
- IRM.
- Título de rubeola, título de EBNA (convencional).

3. Entre las semanas -4 y 0

- Punción lumbar opcional.
- Linfocitopenia.

4. Semana 0

Programa de pruebas y evaluaciones

- Constantes vitales.
- Recuento linfocitario total (los resultados estaban disponibles antes de la dosificación).
- Químicas sanguíneas.
- Hematología: CBC con recuento diferencial y de plaquetas.
- Recuento de CD4+.
- Prueba de embarazo de orina para las mujeres en edad fértil.
- EDSS/SRS/prueba del clavijero de nueve agujeros.
- IRM.
- Medidas inmunológicas.
- Pruebas de anticuerpos contra Zenapax® (suero almacenado hasta su análisis).
- Suero para la determinación de los niveles en suero de anti-IL-2R α (almacenado hasta su análisis).

El sujeto recibió la primera dosis del fármaco de estudio.

5. Semana 2

- Constantes vitales.
- Recuento linfocitario total (los resultados estaban disponibles antes de la dosificación).
- Químicas sanguíneas.
- Hematología: CBC con recuento diferencial y de plaquetas.
- Recuento de CD4+.
- Medidas inmunológicas.
- Prueba de embarazo de orina para las mujeres en edad fértil.
- EDSS/SRS/prueba del clavijero de nueve agujeros.
- IRM.
- Infusión de Zenapax®.
- Pruebas de anticuerpos contra Zenapax® (suero almacenado hasta su análisis).
- Suero para la determinación de los niveles en suero de anti-IL-2R α (almacenado hasta su análisis).

6. Semana 4

- Constantes vitales.
- EDSS.
- IRM.
- Pruebas de anticuerpos contra Zenapax® (suero almacenado hasta su análisis).
- Suero para la determinación de los niveles en suero de anti-IL-2R α (almacenado hasta su análisis).

7. Semana 6

- Constantes vitales.
- Recuento linfocitario total (los resultados estaban disponibles antes de la dosificación).
- Químicas sanguíneas.
- Hematología: CBC con recuento diferencial y de plaquetas.
- Recuento de CD4+.
- Medidas inmunológicas.
- Prueba de embarazo de orina para las mujeres en edad fértil.
- EDSS/SRS/prueba del clavijero de nueve agujeros.
- IRM.
- Infusión de Zenapax®.
- Pruebas de anticuerpos contra Zenapax® (suero almacenado hasta su análisis).
- Suero para la determinación de los niveles en suero de anti-IL-2R α (almacenados hasta su análisis).

8. Semana 10

- Constantes vitales.
- Recuento linfocitario total (los resultados estaban disponibles antes de la dosificación).
- Químicas sanguíneas.
- Hematología: CBC con recuento diferencial y de plaquetas.
- Recuento de CD4+.
- Medidas inmunológicas.
- Prueba de embarazo de orina para las mujeres en edad fértil.
- Pruebas de anticuerpos contra Zenapax®.

Programa de pruebas y evaluaciones	
	• EDSS/SRS/prueba del clavijero de nueve agujeros. • IRM. • Infusión de Zenapax®. • Pruebas de anticuerpos contra Zenapax® (suero almacenado hasta su análisis). • Suero para la determinación de los niveles en suero de anti-IL-2Rα (almacenado hasta su análisis).
9. Semana 14	• Constantes vitales. • Recuento linfocitario total (realizado de manera que los resultados estaban disponibles antes de la dosificación). • Químicas sanguíneas. • Hematología: CBC con recuento diferencial y de plaquetas. • Recuento de CD4+. • Medidas inmunológicas. • Prueba de embarazo de orina para las mujeres en edad fértil. • EDSS/SRS/prueba del clavijero de nueve agujeros. • IRM. • Infusión de Zenapax®. • Pruebas de anticuerpos contra Zenapax® (suero almacenado hasta su análisis). • Suero para la determinación de los niveles en suero de anti-IL-2Rα (almacenado hasta su análisis).
10. Semana 18	• Constantes vitales. • Recuento linfocitario total (resultados disponibles antes de la dosificación). • Químicas sanguíneas. • Hematología: CBC con recuento diferencial y de plaquetas. • Recuento de CD4+. • Medidas inmunológicas. • Prueba de embarazo de orina para las mujeres en edad fértil. • EDSS/SRS/prueba del clavijero de nueve agujeros. • IRM. • Infusión de Zenapax®. • Pruebas de anticuerpos contra Zenapax® (suero almacenado hasta su análisis). • Suero para la determinación de los niveles en suero de anti-IL-2Rα (almacenado hasta su análisis).
11. Semana 22	• Constantes vitales. • Recuento linfocitario total (resultados disponibles antes de la dosificación). • Químicas sanguíneas. • Hematología: CBC con recuento diferencial y de plaquetas. • Recuento de CD4+. • Medidas inmunológicas. • Prueba de embarazo de orina para las mujeres en edad fértil. • EDSS/SRS/prueba del clavijero de nueve agujeros. • IRM. • Infusión de Zenapax®. • Pruebas de anticuerpos contra Zenapax® (suero almacenado hasta su análisis). • Suero para la determinación de los niveles en suero de anti-IL-2Rα (almacenado hasta su análisis).
12. Semana 26	• Constantes vitales. • Químicas sanguíneas. • Hematología: CBC con recuento diferencial y de plaquetas. • Recuento de CD4+. • Prueba de embarazo de orina para las mujeres en edad fértil. • EDSS/SRS/prueba del clavijero de nueve agujeros. • IRM. • Medidas inmunológicas.

Programa de pruebas y evaluaciones	
	• Pruebas de anticuerpos contra Zenapax® (suero almacenado hasta su análisis). • Suero para la determinación de los niveles en suero de anti-IL-2Rα (almacenado hasta su análisis). • Punción lumbar opcional. • Linfocitoferesis.
13.	Entre las semanas 30 y 34
	• Medidas inmunológicas. • Otros (radiografía de tórax, ECG) • EDSS/SRS/prueba del clavijero de nueve agujeros. • IRM. • Título de rubeola, título de EBNA (convencional). • Pruebas de anticuerpos contra Zenapax® (suero almacenado hasta su análisis). • Suero para la determinación de los niveles en suero de anti-IL-2Rα (almacenado hasta su análisis).

Como se ha indicado anteriormente, unos cuantos sujetos recibieron dos infusiones más de Zenapax® en las semanas 28 y 34, y luego el mismo postratamiento de seguimiento (véase la Tabla 3, N° 12 y N° 13).

5 Ejemplo 2

Medidas de los resultados: Análisis de datos

Además de las pruebas y las evaluaciones que figuran en la Tabla 3, durante el estudio, se realizaron las siguientes evaluaciones de eficacia clínica:

1. EDSS/SRS/prueba del clavijero de nueve agujeros – medidas de discapacidad.
2. Número de recaídas. Las recaídas se definen como los síntomas neurológicos nuevos o recurrentes, no asociados con fiebre ni infección, que duran al menos 48 horas y vienen acompañados de hallazgos neurológicos objetivos descubiertos con una exploración.

La seguridad clínica se evaluó mediante el estado neurológico, el examen físico general y la medición de las constantes vitales (temperatura, frecuencia cardíaca y presión arterial). Se recogieron los sucesos adversos durante todo el estudio.

Durante el estudio, también se realizaron las siguientes evaluaciones de eficacia de laboratorio:

1. IRM cerebral con y sin contraste de gadolinio; parámetros de IRM adicionales.
2. Medidas inmunológicas.

Los parámetros de laboratorio específicos evaluados en este estudio fueron los siguientes:

1. Actividad de IRM controlada por los médicos.
2. Química sanguínea: creatinina, bilirrubina total, ALT, AST, fosfatasa alcalina y albúmina. Anticuerpos contra la rubeola y EBV-EBNA.
3. Hematología: hemograma completo con recuento diferencial y de plaquetas.

Las evaluaciones de seguridad fueron los siguientes:

1. Se realizaron análisis de subconjuntos CD4+ periféricos mediante citometría de flujo con marcadores de subconjuntos bien definidos para los linfocitos T.
2. Extracción de 4 ml de sangre completa (para obtener 2 ml de suero) para la determinación de la formación de anticuerpos contra Zenapax®.
3. Se documentó la seguridad en términos de la influencia del Zenapax® en la actividad de la enfermedad inflamatoria del SNC, controlada mediante IRM. Se definió un aumento inesperado y potencialmente de alerta de la actividad de IRM como aquel superior a un aumento del triple en los sujetos con cargas medias de lesiones realizadas con Gd en el pretratamiento de < 10 lesiones/mes. En sujetos con cargas medias de lesiones realizadas con Gd en el pretratamiento de < 3 lesiones/mes, un aumento de > 10 veces generó problemas de seguridad. El desarrollo de una sola lesión nueva de > 5 cm en cualquier diámetro, se consideró un indicio de toxicidad.

En el transcurso de estos estudios, no se produjeron sucesos adversos relacionados con el Zenapax®.

El estudio desvelado en el presente documento demostró la eficacia de la terapia con Zenapax® en sujetos con esclerosis múltiple comparando el número medio de lesiones realizadas con Gd durante el período de pretratamiento

con el del período de tratamiento. La *variable principal de eficacia* es el número de lesiones realizadas con Gd.

Los análisis de la variable principal incluyeron los siguientes:

- 5 • comparación del número medio de lesiones durante el período de pretratamiento (Semanas -8, -4, 0) con el número medio de lesiones durante el período de tratamiento (Semanas 0 a 22);
 - comparación del número medio de lesiones durante el período de pretratamiento (Semanas -8, -4, 0) con el número medio de lesiones durante las últimas 12 semanas del período de tratamiento (Semanas 10-22).
- 10 Estas comparaciones se realizaron usando una prueba t pareada o la prueba de clasificación de Wilcoxon, dependiendo de la distribución de los datos. Las medias se basaron en las evaluaciones no perdidas.

Este estudio también demostró la eficacia de la terapia con Zenapax® en sujetos con esclerosis múltiple usando las siguientes medidas:

- 15 1. Medidas de IRM
- carga de lesiones en T2,
 - volumen de las lesiones realizadas con Gd,
 - 20 • volumen de hipointensidades en T1 (opcional);
2. Medidas clínicas, en concreto:
- cambio en la escala de EDSS, SRS/ prueba del clavijero de nueve agujeros,
 - 25 • tasa de recaída;
3. Medidas inmunológicas, en concreto:
- marcadores de linajes de células T Th1 y Th2, así como análisis de FACS de diversos marcadores de células T, células B y subconjuntos de monocitos,
 - 30 • producción de citocinas por células T *in vitro*.

Carga lesiones en T2

35 Los análisis sobre la carga de lesiones en T2 incluyeron los siguientes:

- comparación del volumen medio de lesiones en T2 durante el período de pretratamiento (Semanas -8, -4, 0) con el volumen medio de lesiones en T2 durante el período de tratamiento (Semanas 0 a 22);
- 40 • comparación del volumen medio de lesiones en T2 durante el período de pretratamiento (Semanas -8, -4, 0) con el volumen medio de lesiones en T2 durante las últimas 12 semanas del período de tratamiento (Semanas 10-22).

Estas comparaciones se realizaron usando una prueba t pareada o la prueba de clasificación de Wilcoxon, dependiendo de la distribución de los datos. Las medias se basaron en las evaluaciones no perdidas.

Volumen de lesiones realizadas con Gd

Los análisis sobre el volumen de las lesiones realizadas con Gd incluyeron los siguientes:

- 50 • comparación del volumen medio de lesiones realizadas con Gd durante el período de pretratamiento (Semanas -8, -4, 0) con el volumen medio de lesiones realizadas con Gd durante el período de tratamiento (Semanas 0 a 22);
- comparación del volumen medio de lesiones realizadas con Gd durante el período de pretratamiento (Semanas -8, -4, 0) con el volumen medio de lesiones realizadas con Gd durante las últimas 12 semanas del período de
- 55 tratamiento (Semanas 10-22).

Estas comparaciones se realizaron usando una prueba t pareada o la prueba de clasificación de Wilcoxon, dependiendo de la distribución de los datos. Las medias se basaron en las evaluaciones no perdidas.

Volumen de hipointensidades en T1

Los análisis sobre el volumen de hipointensidades en T1 fueron los siguientes:

- 65 • comparación del volumen medio de hipointensidades en T1 durante el período de pretratamiento (Semanas -8, -4, 0) con el volumen medio de hipointensidades en T1 durante el período de tratamiento (Semanas 0 a 22);

- comparación del volumen medio de hipointensidades en T1 durante el período de pretratamiento (Semanas -8, -4, 0) con el volumen medio de hipointensidades en T1 durante las últimas 12 semanas del período de tratamiento (Semanas 10-22).

5 Estas comparaciones se realizaron usando una prueba t pareada o la prueba de clasificación de Wilcoxon, dependiendo de la distribución de los datos. Las medias se basaron en las evaluaciones no perdidas.

EDSS

10 Se determinó el cambio en la escala EDSS entre la línea basal (Semana 0) y las Semanas 22 y 26. También se determinó el cambio desde la línea basal hasta la Semana 22 y 26 para SRS y la prueba del clavijero de nueve agujeros.

Recaídas

15 Se comparó la frecuencia de las recaídas durante los 2 años anteriores a la recepción del fármaco de estudio con la frecuencia de las recaídas recibiendo el fármaco de estudio (Semanas 0-22).

Ejemplo 3

20 Medidas de los resultados: Parámetros inmunológicos

1. Análisis de expresión en la superficie celular de PBMC

25 Los análisis de los parámetros inmunológicos se realizaron mediante métodos convencionales. Por ejemplo, el análisis cuantitativo paralelo de marcadores importantes para el desarrollo de células T Th1/Th2, funciones efectoras de células T en la EM y marcadores para la actividad biológica del anticuerpo anti-Tac con especial énfasis en la activación de células T (es decir, determinación de la expresión de IL-2, número de células T CD3+ y CD4+ que expresan IL-2R/CD25; se realizaron respuestas de recuerdo *in vitro* (proliferación del toxoide tetánico; péptido Flu-HA 306-318) e *in vivo* (prueba cutánea) contra antígenos de recuerdo convencionales en los sujetos tratados.

Los estudios específicos incluían:

35 1. Análisis de los cambios en las subpoblaciones de glóbulos blancos (células polimorfonucleares, monocitos, células NK, LAK (células citolíticas naturales activadas por linfocitos), linfocitos, incluyendo células B, subconjuntos de células T CD4+ y CD8+, células NK-T, células T reguladoras CD4+/CD25+) tras la terapia *in vivo* con daclizumab.

40 2. Evaluación de los cambios en la expresión superficial de múltiples marcadores de activación, moléculas de adhesión, moléculas coestimuladoras, receptores de citocinas y quimiocinas, etc.: CD95, CTLA-4, CD25 (cadena α de IL-2R), CD122 (cadena β de IL-2R), CD132 (cadena γ de IL-2R), CD45RA, CD45RO, CD71, OX-40, CCR5, CXCR4, CD80, MHC de clase II (HLA-DR, DQ, DP), TCR α/β , TCR γ/δ , CD2, CD56, CD161 mediante citometría de flujo.

45 3. Evaluación de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) ante diferentes estímulos policlonales y específicos del antígeno (anti-CD3 unido a la placa, anti-CD3+ unido a la placa, anti-CD28, IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, proteína básica de la mielina (MBP), toxoide tetánico (TT) por ensayo de proliferación basado en citometría de flujo usando diacetato de 5- (y -6)-carboxifluoresceína, succinimidiléster (5(6)-CFDA, SE). Producción de citocinas (es decir, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , LT- α , el factor de crecimiento transformante (TGF)- β) de las PBMC estimuladas con estos diversos estímulos mediante ELISA de sándwich.

50 4. Se recogieron muestras de suero longitudinales de los sujetos del estudio para investigar los cambios en los subtipos de los anticuerpos, anticuerpos específicos de la mielina, complementos y marcadores relacionados con complementos, marcadores de estrés oxidativo y marcadores indicativos de la remielinización y la reparación.

Los datos obtenidos demostraron que la administración *in vivo* a largo plazo de daclizumab conduce a varios cambios inmunorreguladores. Sin quedar vinculados a teoría alguna, estos cambios probablemente contribuyen al efecto terapéutico positivo de este fármaco en la EM. Los cambios observados incluían:

60 • Reducción leve (~10 %) en el recuento de linfocitos totales (incluyendo las células T y células B CD4+ y CD8+).

65 • Aumento concomitante en la proporción de células NK y células NK-T, observándose que ambas tenían actividad altamente inmunorreguladora en varios modelos animales de autoinmunidad y en trastornos autoinmunes humanos, incluyendo EM, diabetes mellitus dependiente de la insulina (DMID) y lupus eritematoso sistémico (LES).

- Regulación positiva de CD122 (cadena β de IL-2R) en la superficie celular de las células NK, células T NK y subpoblación de linfocitos CD8+ que probablemente subyace en el aumento de la capacidad proliferativa de estas células hacia IL-2 (a través de IL-2R de afinidad intermedia - es decir CD122+CD132) y hacia IL-15 (que comparte 2 cadenas de señalización con IL-2R- es decir, CD122 y CD132).
- Disminución no significativa en la proliferación de las células T (subconjuntos tanto CD4+ como CD8+) hacia fuertes estímulos policlonales y hacia antígenos de recuerdo como TT.
- Aumento de la proliferación de las células NK, células T γ/δ , células NK-T y subpoblación de células T CD8+ hacia IL-15.

2. Análisis de expresión de micromatrices de ADNc

Se evaluó la inmunomodulación inducida por daclizumab tras la administración *in vivo* a largo plazo en sujetos con EM mediante micromatrices de ADNc realizadas en muestras de PBMC criopreservadas desde la línea basal, el tratamiento y la fase de postratamiento del estudio clínico. Los datos obtenidos indicaron que la terapia con daclizumab conduce a la regulación positiva de varios genes de interés, incluyendo: el supresor de la señalización de citocinas 5 (SOCS5), jun-D-proto-oncogén, proteína tirosina fosfatasa-de tipo receptor, tipo antígeno CD209, ciclo de división celular 14 (CDC14), subunidad reguladora 2 de la proteína quinasa CDC28 y otros. La terapia con daclizumab también conduce a la modulación negativa de varios genes estrechamente relacionados con la inmunidad proinflamatoria, como el IFN- γ y el factor de crecimiento de fibroblastos 12 (FGF-12).

3. Experimentos funcionales *in vitro*

Se realizaron estudios de muestras de PBMC criopreservadas de sujetos del estudio clínico con el fin de demostrar con más detalle los cambios observados en las muestras prospectivas longitudinales, y también añadir componentes funcionales a los cambios estructurales observados:

- Se evaluó la proliferación de PBMC mediante el ensayo de proliferación basado en citometría de flujo usando diacetato de 5- (y -6)-carboxifluoresceína, succinimidiléster (5(6)-CFDA, SE) hacia los estímulos adicionales.
- Anti-CD3 + anti-CD28 unidos a la placa, como un potente estímulo policlonal activador de células T.
- Hemocianina de lapa californiana (KLH), como antígeno para las células T CD4+ a las que los seres humanos, por lo general, no están expuestos, es decir, para investigar el efecto del daclizumab en una estimulación de células T sin tratamiento previo.
- Mezcla de proteína básica de mielina (MBP) de antígenos de mielina (146-170), PLP (139-154), MOG (35-55) y CNP (343-373) - con el fin de investigar el efecto del daclizumab en las células T autorreactivas.
- LPS - como potente activador de monocitos y también células T reguladoras CD4+/+/CD25+. Además, se sembraron PBMC con y sin la adición exógena de daclizumab para demostrar las diferencias entre los efectos agudos *in vitro* del daclizumab y los efectos prolongados *in vivo* de la terapia con daclizumab. A continuación, se transfirieron PBMC activadas con estos diversos estímulos, tras 72 h, a medios enriquecidos con IL-2 o IL-15 o IL-4 para observar si la regulación positiva observada de CD122 y CD132 en la superficie celular de estas células generó el aumento de su respuesta funcional a las citocinas que realizan la señalización a través de estas moléculas de señalización. El Día 6, se midieron la proliferación y la expansión celular, y el Día 10 se evaluó el fenotipo funcional de estas células expandidas por tinción intracelular de citocinas (midiendo la producción de IL-2, IL-4, IL-6 e IFN- γ). Además, se recogieron los sobrenadantes para evaluar las citocinas productoras de monocitos y los marcadores como IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α y NO.
- Se evaluaron más detalladamente las propiedades inmunorreguladoras de las células NK, por ejemplo, células T NK y células T reguladoras CD4+/CD25+ tras la terapia con daclizumab
- Se verificó el perfil de expresión génica de la micromatriz de ADNc mediante PCR en tiempo real y estudios funcionales.

Los resultados de estos experimentos indican que:

- Los efectos "agudos" de la administración de daclizumab *in vitro* fueron diferentes de los efectos prolongados de la administración *in vivo*. Se observó de forma aguda una inhibición más profunda de la proliferación de células T hacia diversos estímulos.
- Las dosis convencionales de daclizumab (es decir, 1 mg/kg/4 semana IV) fueron suficientes para bloquear el epítipo CD25 Tac en las células T, pero no fueron suficientes para bloquear totalmente CD25 en los monocitos activados. Sin quedar ligados a teoría alguna, se han necesitado dosis más altas de daclizumab en muchas situaciones clínicas (por ejemplo, trasplantes) debido al bloqueo insuficiente de CD25 por esta dosis. Por lo tanto, serían útiles dosis más altas en sujetos muy activos con enfermedades autoinmunes.
- El epítipo de CD25 fue bloqueado por daclizumab tras la administración *in vitro*, pero la molécula persiste en la superficie celular de las células en los mismos números. Sin embargo, tras la administración prolongada *in vivo* del daclizumab, esta molécula se moduló negativamente desde la superficie celular de células T tanto CD4+ como CD8+.
- La administración de daclizumab influyó en la estimulación de las células T: las células T CD4+ que responden al antígeno sin tratamiento previo como KLH producen cantidades más altas de IL-4 y cantidades inferiores de IFN-

y tras el tratamiento con daclizumab. Sin quedar ligados a teoría alguna, se cree que el efecto en la estimulación de las células T controla el equilibrio proinflamatorio frente al antiinflamatorio en la EM y otras enfermedades autoinmunes.

- La proliferación de las células T y su respuesta funcional a las citocinas complementarias que comparten cadenas de señalización con IL-2R (es decir, IL-15, IL-4, IL-7 y otros) se aumentó tras la terapia con daclizumab.
- Los resultados también indican que la activación de los monocitos se modula tras la terapia con daclizumab, pues los monocitos produjeron menores cantidades de citocinas y tuvieron una mayor respuesta a IL-4.
- La proliferación de células reguladoras T CD4+/CD25+ se aumentó tras la terapia con daclizumab (demostrado con LPS, que estimula este subtipo de células T a través del receptor Toll-4).

Ejemplo 4

Evaluación de los sujetos

Se analizó el número medio de lesiones realizadas con el medio de contraste entre las semanas 10 y 22 (3 meses, 4 exploraciones de IRM) en la terapia de combinación con las semanas 42-62 (5 meses, 6 exploraciones de IRM) en monoterapia. Se compararon las semanas 10-22 (3 meses, 4 exploraciones de IRM) en la terapia de combinación con todo el tiempo (semanas 24-62; 9 meses y 10 exploraciones de IRM) en monoterapia.

La respuesta al tratamiento con la terapia de solo Zenapax® se consideraba parcial si no se alcanzaba una reducción superior al 60 % de las lesiones realizadas con medio de contraste desde el tratamiento de la línea basal, es decir, cuando los sujetos solo recibían IFN-β. Si se alcanzaba una reducción superior al 0, pero inferior al 60 %, de las lesiones realizadas con medio de contraste desde el tratamiento de la línea basal, se consideraba la monoterapia con Zenapax® parcialmente activa. Si la actividad de la enfermedad retornaba a los niveles basales, se consideraba ausencia de respuesta con la monoterapia de Zenapax®. Sin embargo, no se detectó ninguno de estos resultados.

Los sujetos que entraron en la fase de la monoterapia tenían lesiones activas evaluadas mensualmente. El número de nuevas lesiones se evaluó tras cada estudio mensual. Si el número medio de lesiones durante los meses 5, 6, 7 y 8 fue del 50 % o inferior al de los 3 meses anteriores a la entrada en la monoterapia, se intentó que los sujetos continuaran con la terapia de Zenapax® hasta el mes 10 (semana 62) en monoterapia (durante un año más).

En las Fig. 1 y 2, se muestran los resultados de dos sujetos. El número de nuevas lesiones se evaluó mediante la identificación en una sola exploración del número de lesiones cerebrales que no se habían identificado previamente. Además, se evaluó el número total de las lesiones. Estas lesiones incluían lesiones realizadas con medio de contraste que persistieron durante 1-2 meses. Además, se evaluó el número supertotal de las lesiones. Estas lesiones incluían las que aparecieron en más de una exploración cerebral del sujeto, y proporcionan una medida indirecta del volumen de las lesiones, es decir, a través de la aparición de una lesión en varios sectores de la IRM (supertotal de las lesiones).

Como se indica en las Fig. 1 y 2, el tratamiento solo con Zenapax® (en ausencia de IFN-β) generó una disminución drástica del número de lesiones totales. No se detectaron nuevas lesiones durante un período de 5,5 meses en ninguno de los sujetos tratados solo con Zenapax® (en ausencia de IFN-β).

Los datos obtenidos durante los últimos cuatro meses de tratamiento se compararon con cuatro meses de tratamiento basal. Por lo tanto, para cada sujeto, los resultados obtenidos durante el período de tratamiento con solo Zenapax® (en ausencia de IFN-β) se compararon con los resultados obtenidos durante el tratamiento con Zenapax® e IFN-β. El número de nuevas lesiones realizadas con Gd se redujo en un 85,95 % ($p = 0,016$). El número total de lesiones realizadas con el medio de contraste se redujo en un 85,75 % ($p = 0,004$). El volumen de lesiones realizadas con Gd se redujo en un 87 % ($p = 0,014$). El número supertotal de lesiones realizadas con Gd se redujo en un 87,4 % ($p = 0,008$). La prueba del clavijero de nueve agujeros se redujo en un 5,36 % ($p = 0,004$). La tasa anual de recaídas (número de recaídas por sujeto al año) se redujo en un 88,9 % ($p = 0,047$). La puntuación de la escala de SRS también se redujo en un 10,61 % ($p = 0,035$). El resto de las medidas mejoró, pero sin alcanzar significación estadística. Por lo tanto, el resultado principal se mejoró significativamente al tratar a los sujetos solo con Zenapax®.

Ejemplo 5

Aumento de la dosis

Si los sujetos con la combinación de IFN-β y Zenapax® mostraron una reducción inferior al 75 % de actividad de la enfermedad en comparación con la línea basal de solo IFN-β, se aumentó su dosis de Zenapax® hasta 2 mg/kg (mensual).

Su evaluó un sujeto con aumento de la dosis tras tres meses de terapia con aumento de la dosis. No se observó toxicidad durante el período de estudio de 8,5 meses. El sujeto se trató con 2mg/kg de Zenapax® cada dos

semanas (4 veces la dosis descrita anteriormente). El sujeto respondió a la terapia con Zenapax® con una reducción superior al 60 % de las lesiones realizadas con el medio de contraste.

Ejemplo 6

Administración combinada de IFN-β y Zenapax®

El presente ejemplo ilustra los efectos de la administración combinada de interferón-β y un antagonista de IL-2R en sujetos que tienen esclerosis múltiple recurrente-remitente o esclerosis múltiple progresiva secundaria. El protocolo se muestra en general en el Ejemplo 1, y se resume a continuación.

Criterios de inclusión

Los sujetos incluidos en el estudio fueron diagnosticados bien con esclerosis múltiple recurrente-remitente o esclerosis múltiple progresiva secundaria; tenían edades comprendidas entre 16 y 65; puntuación de entre 1 y 6,5 en la escala de EDSS; no habían respondido al tratamiento solo con interferón-β como lo demostraba uno o más agravamientos producidos en los 18 meses anteriores a la inscripción, un aumento de 1 punto o más en la escala de EDSS durante 18 meses de tratamiento, o la persistencia o reaparición de lesiones realizadas con medio de contraste en la IRM cerebral con respecto al menos la mitad de la media de las lesiones realizadas con medio de contraste de la línea basal mensual durante un período de línea basal de 6 meses medido antes del comienzo de la terapia con interferón-β; y debían haber tenido al menos 3 lesiones realizadas con gadolinio en las 3 primeras exploraciones de IRM previas a la terapia de combinación.

Criterios de exclusión

Los sujetos fueron excluidos del estudio si fueron diagnosticados con esclerosis múltiple progresiva primaria; los análisis de sangre previos al tratamiento fueron anormales; fueron diagnosticados con una enfermedad importante clínicamente significativa simultánea; se observaron contraindicaciones con terapias de anticuerpos monoclonales; se determinaron como VIH positivos; habían sido tratados con acetato de glatiramer o ciclofosfamida en las 26 semanas previas al estudio, o habían sido tratados con inmunoglobulina intravenosa (IVIg), azatioprina (AZA), metotrexato (MTX), ciclosporina, ciclofosfamida (CTC), cladribina o mitox en las 12 semanas previas al estudio, o tratados con corticosteroides u hormona adrenocorticotrófica (ACTH) en las 8 semanas previas al estudio, o tratados con cualquier otro fármaco o procedimiento en investigación para la EM; no empleaban métodos anticonceptivos adecuados; o eran mujeres en período de lactancia.

Curso del tratamiento

En el estudio de la terapia de combinación participaron diez sujetos (uno más en virtud de la excepción de un solo sujeto anteriormente citado que recibió una dosis más alta). Para cada sujeto, se estableció un período de 3 meses de línea basal de tratamiento con interferón-β (Avonex® o Betaseron®). El Avonex® se administró como se indica en la información de prescripción suministrada por el fabricante a una dosis de 30 µg inyectada por vía intramuscular una vez a la semana. El Betaseron® se administró como se indica en la información de prescripción suministrada por el fabricante a una dosis de 0,25 mg inyectada por vía subcutánea cada dos días. Se realizaron cuatro exploraciones de IRM durante el período de línea basal para determinar un número de lesiones realizadas con el medio de contraste de línea basal, una al comienzo del período y luego, al final de cada mes del período de línea basal, con la cuarta justo antes de comenzar la terapia de combinación. Los sujetos también fueron evaluados en la escala de EDSS, la escala de clasificación neurológica de Scripps (NRS), y varios ensayos de deambulación y otros ensayos de habilidad motora.

La terapia de combinación se inició tras establecerse la línea basal de 3 meses. Se continuó con el tratamiento con interferón-β y, además, se administró anti-Tac (Zenapax®) durante 5,5 meses. Durante el primer mes de la administración combinada, se administró Zenapax® cada dos semanas y, posteriormente, se administró Zenapax® una vez al mes. El Zenapax® se administró por vía intravenosa en la forma descrita en la información de prescripción del fabricante a una dosis de 1 mg/kg de peso corporal. Uno de los sujetos recibió una dosis de 2 mg/kg cada dos semanas tras no mostrar respuesta a la dosis de 1 mg/kg. Se realizaron exploraciones de IRM durante el período de tratamiento combinado para determinar los cambios en el número de las lesiones realizadas con el medio de contraste, una cada dos semanas durante las primeras seis semanas de tratamiento, y posteriormente cada mes para un total de 8 exploraciones de IRM. En el mismo programa, los sujetos también fueron evaluados en cuanto a la escala de EDSS, la escala de NRS de Scripps, y varios ensayos de deambulación y otros ensayos de habilidad motora.

Resultados

La administración combinada de interferón-β y Zenapax® llevó al cese casi completo de la actividad de la enfermedad y la mejoría clínica en siete de los ocho sujetos. Como se puede ver en la Fig. 3, siete de los ocho

sujetos tuvieron menos o al menos ningún aumento de lesiones nuevas y totales realizadas con el medio de contraste con la terapia de combinación en comparación con el período de la línea basal. Como se muestra en la Fig. 4A, cuatro de los ocho sujetos también demostraron una mejoría en la escala de EDSS con la terapia de combinación en comparación con el período de línea basal. Como se muestra en la Fig. 4B, siete de los ocho sujetos demostraron una mejoría en la escala de NRS de Scripps. Haciendo referencia a la Fig. 4A, cinco de los ocho sujetos demostraron una mejor deambulación en el índice de deambulación. Como se muestra en la Fig. 5B, cinco de los ocho sujetos bien mejoraron o no tuvieron ningún cambio en el recorrido a pie de 20 m cronometrado. Como se muestra en la Fig. 6A, todos los sujetos demostraron tener mejores tiempos con su mano dominante en la prueba del clavijero de 9 agujeros. Como se muestra en la Fig. 6B, cinco de los ocho sujetos también mejoraron con la mano no dominante en la prueba del clavijero de 9 agujeros.

Ejemplo 7

Efectos en las células T en la terapia combinada

El presente ejemplo demuestra la saturación del epítipo Tac tras la terapia de combinación y la disminución en paralelo de la proliferación de células T en comparación con el período de línea basal.

La saturación del epítipo Tac se estudió mediante citometría de flujo. La administración combinada de interferón- β con 1 mg/kg de Zenapax® provocó la saturación completa del epítipo Tac en células T CD4+/CD25+ y CD8+/CD25+ (Fig. 7).

La proliferación de las células T activadas se midió mediante el marcaje de células con fluorescencia del succinimidiléster de carboxifluoresceína (CFSE) y la evaluación del número de mitosis en las células marcadas con CFSE por citometría de flujo. Como se muestra en la Fig. 8A, seis de los ocho sujetos demostraron una disminución de la proliferación de las células T CD4. Haciendo referencia a la Fig. 8B, todos los sujetos demostraron una disminución en la proliferación de células T CD8 en comparación con el período de línea basal.

Ejemplo 8

Regulación positiva de CTLA-4

El presente ejemplo demuestra la regulación positiva inesperada de CTLA-4 provocada por la administración combinada de interferón- β y un antagonista de IL-2R.

Se midió la expresión en la superficie de CTLA-4 utilizando anticuerpos contra CTLA-4 y citometría de flujo. Para cada medición de la expresión en la superficie de CTLA-4, en primer lugar, se obtuvo un tubo de 5 mililitros (ml) de sangre total en ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) de cada sujeto. A continuación, se prepararon 42 ml de solución de lisis x 1 (4,2 ml de solución de lisis 10 + 37,8 ml de H₂O) a partir de 10 x solución madre preparada disolviendo en 1 litro de agua destilada: 89,9 g de NH₄Cl, 10,0 g de KHCO₃, 370,0 mg de EDTA tetrasódico; y ajustando la solución a pH 7,3. Se transfirieron 3 ml de sangre con una pipeta a los 42 ml de 1 x solución de lisis (en tubos Falcon de 50 ml). Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 3-5 minutos. A continuación, se centrifugó a 300 x gravedad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró el sobrenadante y se volvió a suspender el sedimento en 30 ml de medios fríos X-vivo. Se centrifugó la mezcla resuspendida a 300 x gravedad durante 5 minutos a 2-8 °C, se aspiró el sobrenadante y se volvió a suspender el sedimento en 2,5 ml de solución salina tamponada con fosfato enriquecida con proteínas (PBS) (10 ml de suero de ternera fetal (FCS) en 500 ml de 1 x PBS). Se dividió esta suspensión celular en alícuotas de 200 μ l en una placa de 96 pocillos, luego se centrifugó a 300 x gravedad durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó. La tinción se realizó mediante la adición de 10 microlitros (μ l)/pocillo de mezcla preparada de anticuerpos contra CTLA-4. Se incubó la placa durante 30 minutos en hielo en un recipiente oscuro. Se lavó cada pocillo con 200 μ l de tampón de lavado frío (mezclado suavemente), y se centrifugó a 1.000 rpm. Se retiraron los sobrenadantes y se lavó cada pocillo otras 2 veces con 200 μ l de tampón de lavado. Tras el último lavado, se volvió a suspender el sedimento en 200 μ l de tampón de tinción y se analizó con un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS) Calibur. Se adquirieron al menos 10.000 sucesos en los linfocitos y 5.000 sucesos en los monocitos.

Como se muestra en la Fig. 9, siete de los ocho sujetos demostraron la regulación positiva significativa de CTLA-4 durante la terapia combinada en comparación con el período de línea basal.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad α del receptor de interleucina-2 humano, donde el anticuerpo es dacilzumab, para su uso en un método de tratamiento de un sujeto humano con esclerosis múltiple, donde el anticuerpo se administra en una forma de dosificación unitaria que contiene 50 mg/dosis a 400 mg/dosis de anticuerpo.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el sujeto tiene esclerosis múltiple remitente reincidente.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el anticuerpo se administra una vez a la semana.
- 15 4. El anticuerpo de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el anticuerpo se administra una vez al mes.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el sujeto tiene esclerosis múltiple progresiva secundaria.
- 20 6. El anticuerpo de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el anticuerpo se administra en una forma de dosificación unitaria que contiene aproximadamente 50, 100, 150 o 200 mg/dosis de anticuerpo.
- 25 7. El anticuerpo de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde el sujeto se trata al mismo tiempo con interferón beta.
8. El anticuerpo de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la terapia de anticuerpo se aplica durante un período de al menos 6 meses.
- 30 9. El anticuerpo de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la terapia de anticuerpo se aplica durante un periodo de al menos un año.

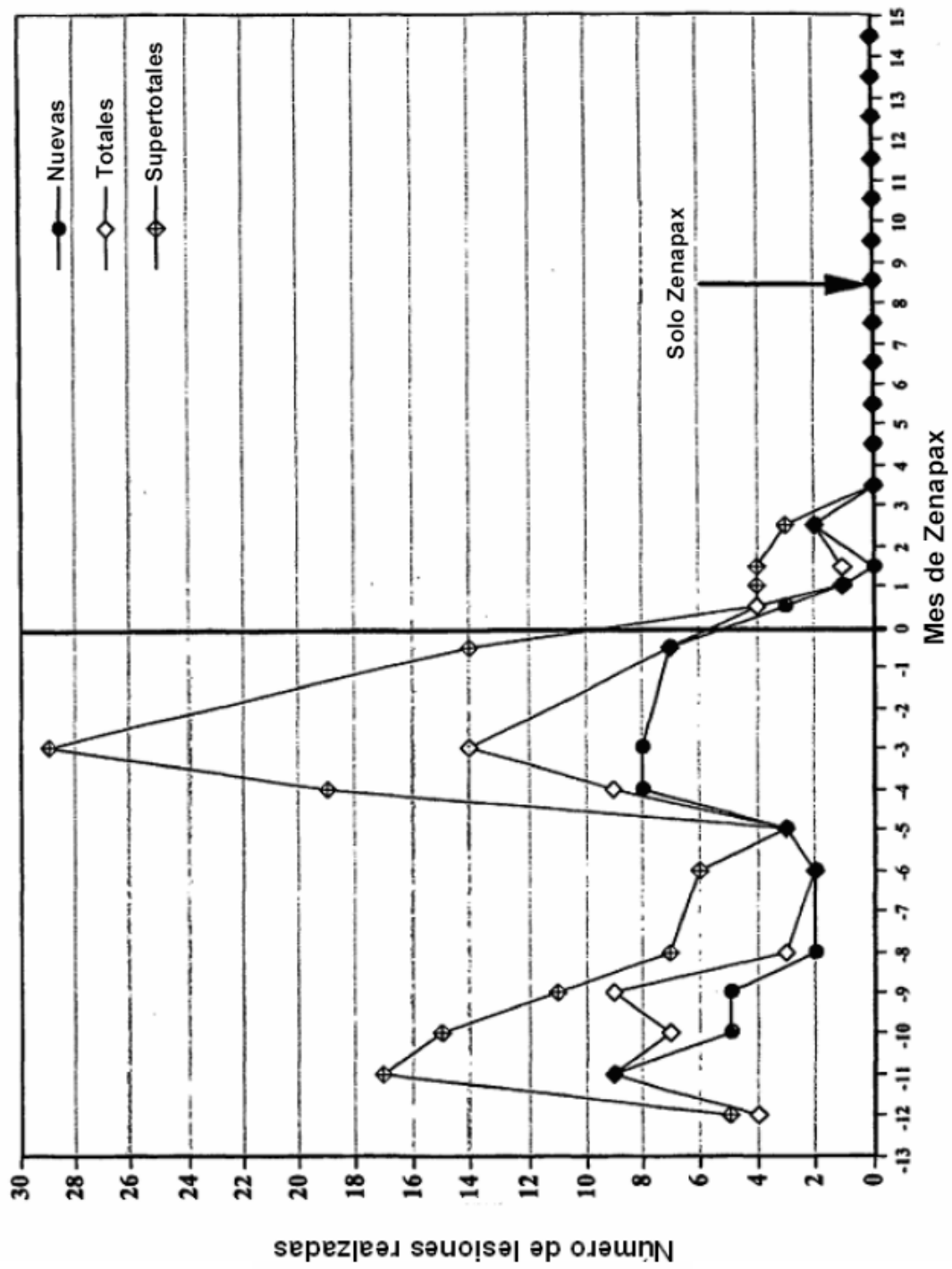


FIG. 1

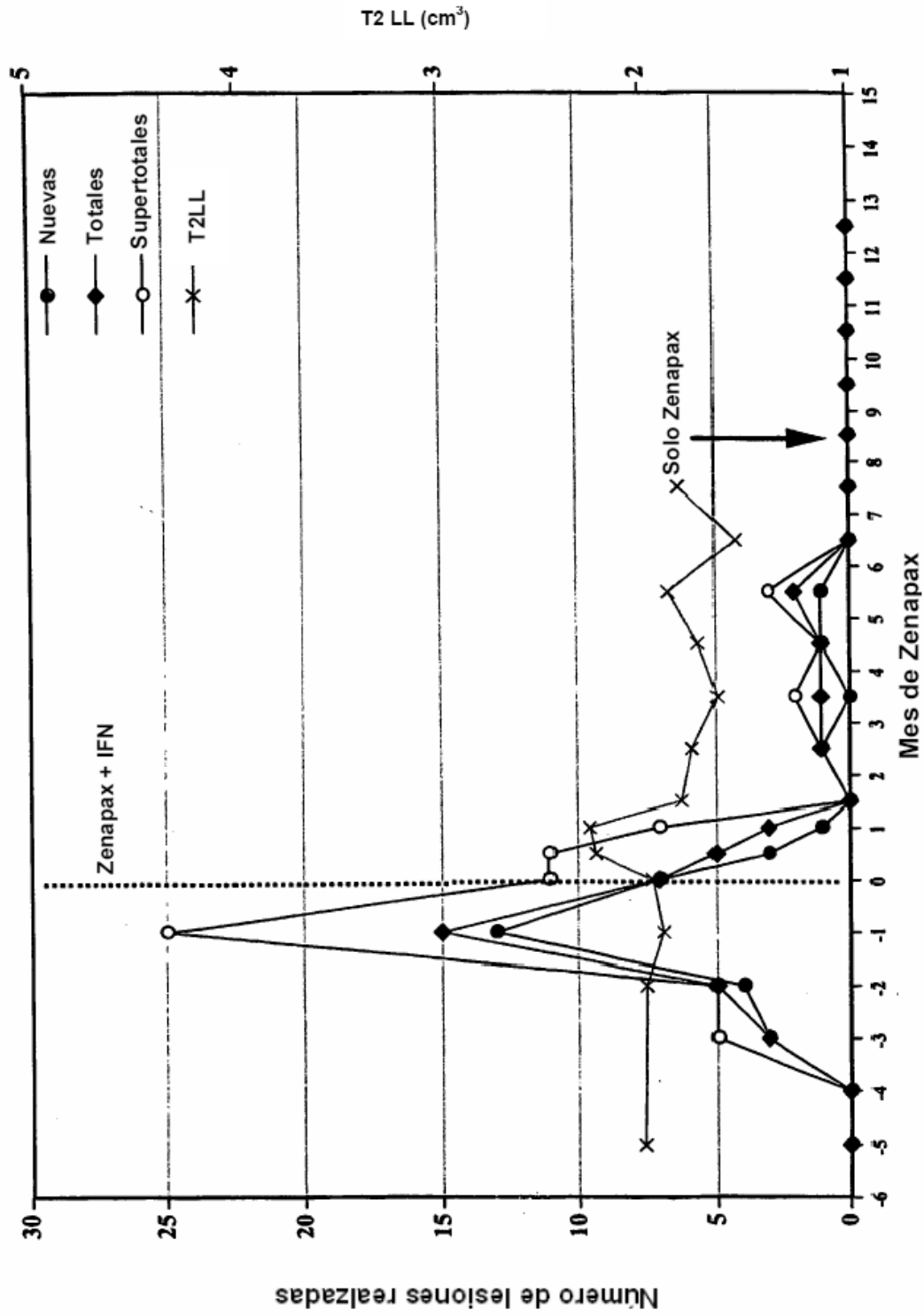


FIG. 2

Cambios en las lesiones realizadas con medio de contraste:

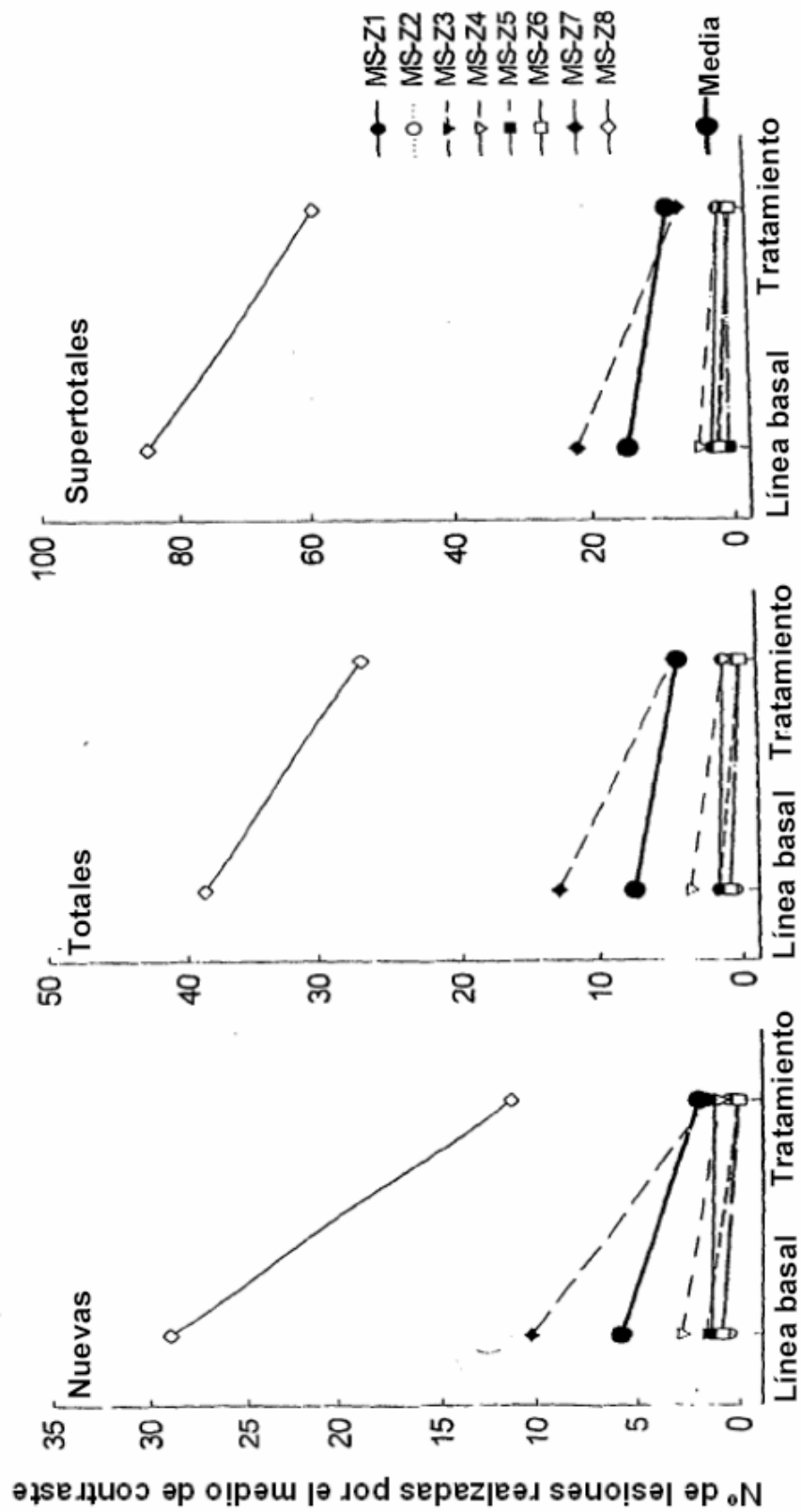


FIG. 3

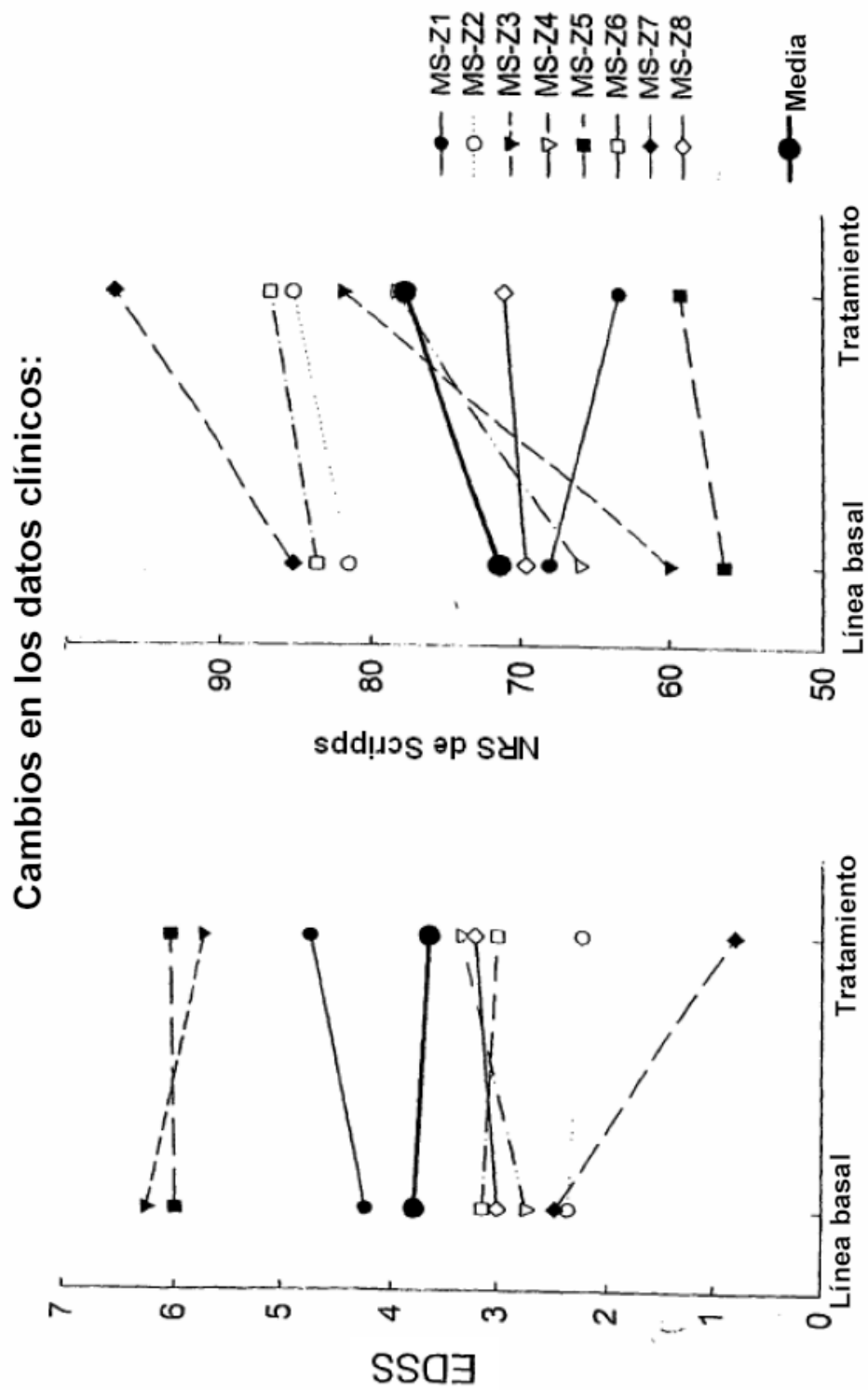


FIG. 4B

FIG. 4A

Cambios en los datos clínicos: índices de deambulación

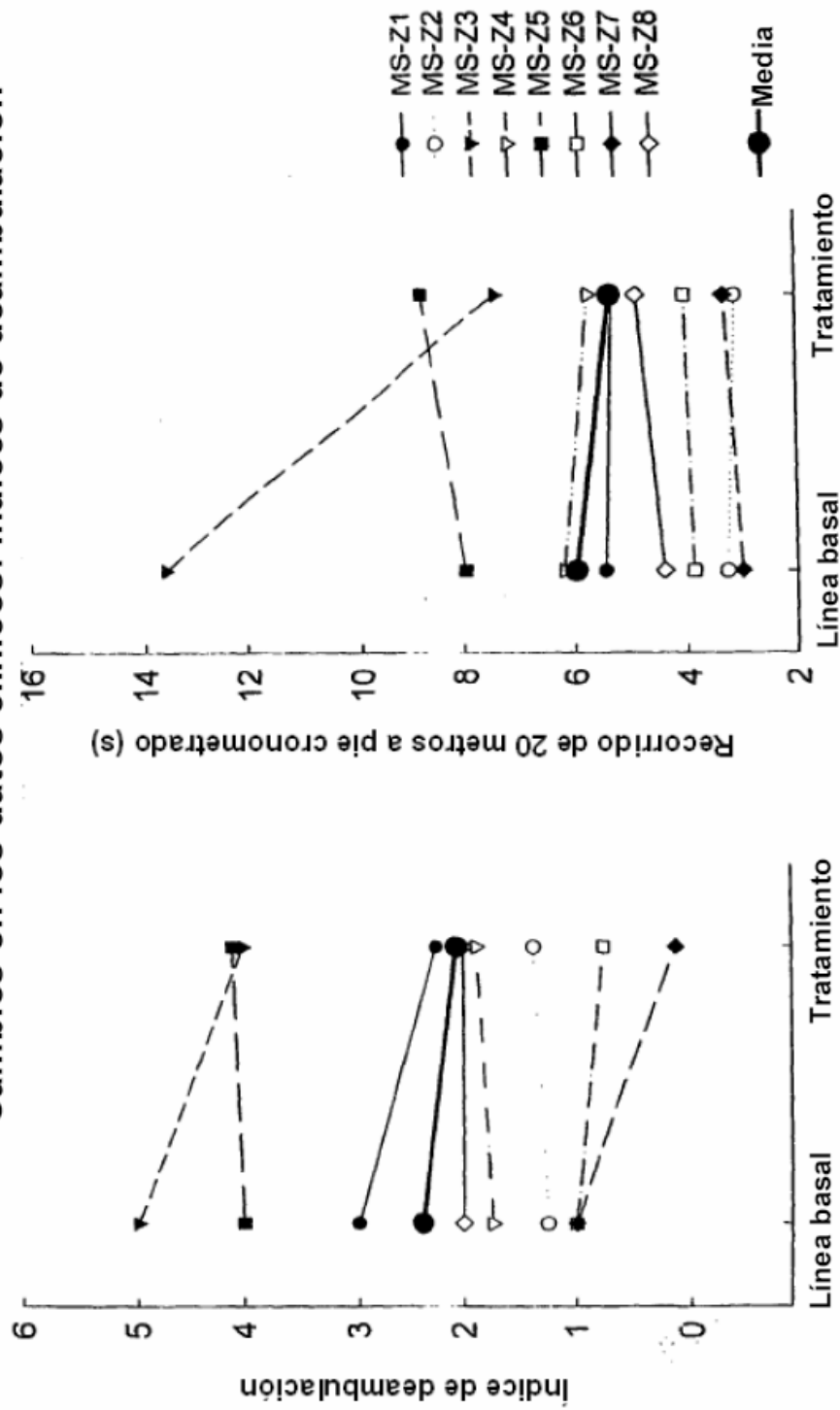


FIG. 5B

FIG. 5A

Cambios en los datos clínicos: función UE

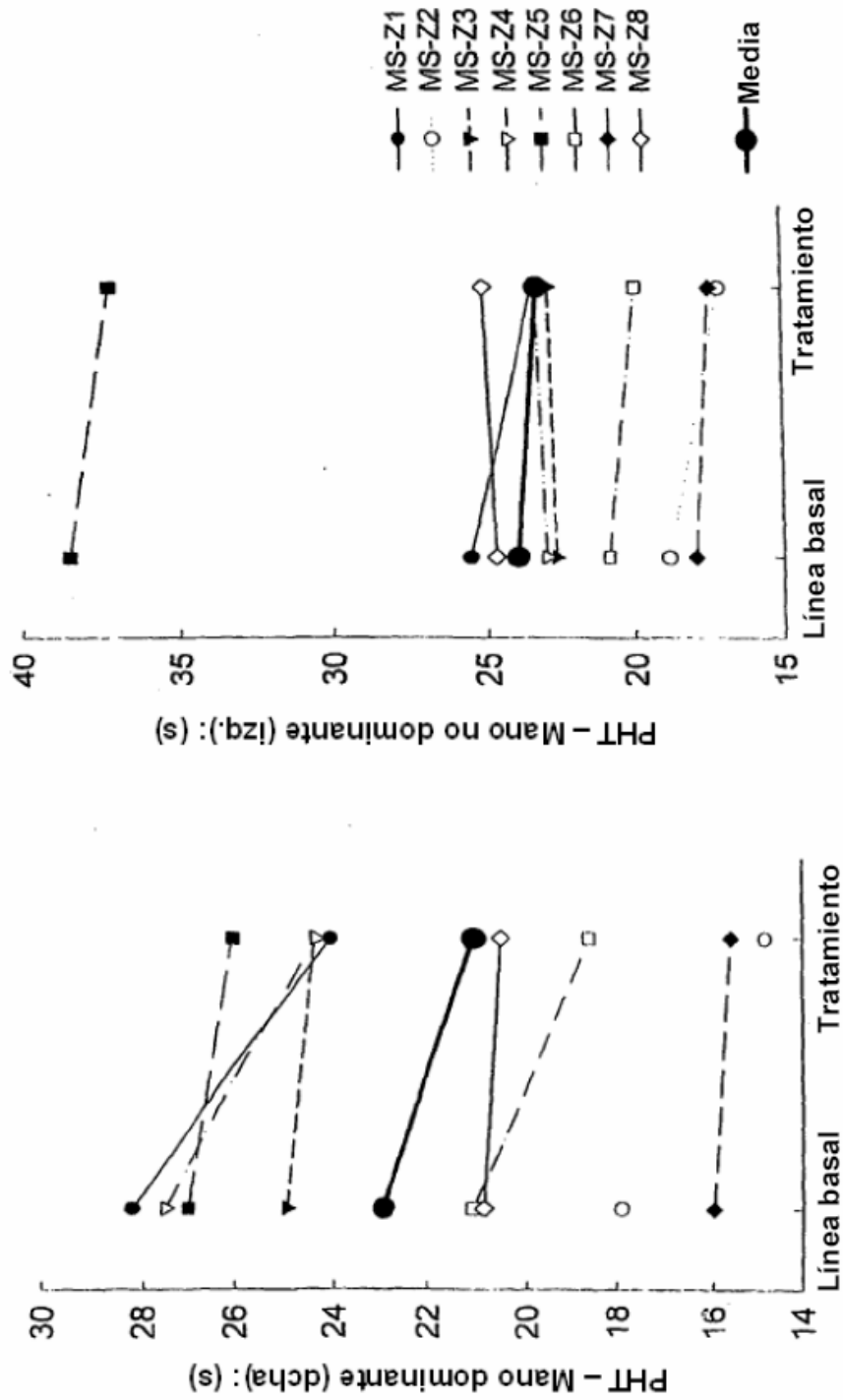


FIG. 6B

FIG. 6A

A través de los niveles de Zenapax en la pauta de dosificación actual (1 mg/kg máx. 100 mg) se satura por completo el receptor de CD25 en células T periféricas:

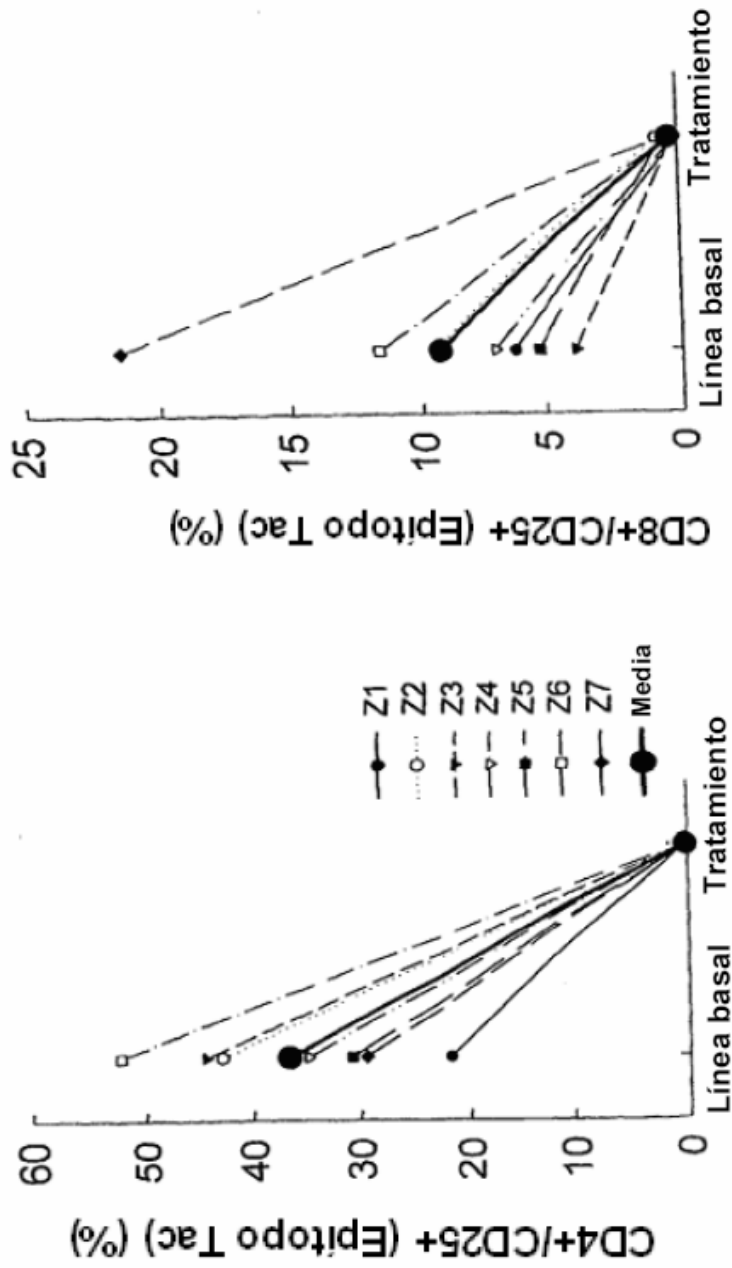


FIG. 7

En paralelo al bloqueo completo de CD25 mediante Zenapax, también se reduce la proliferación de las células T activadas *in vivo* hacia IL-2

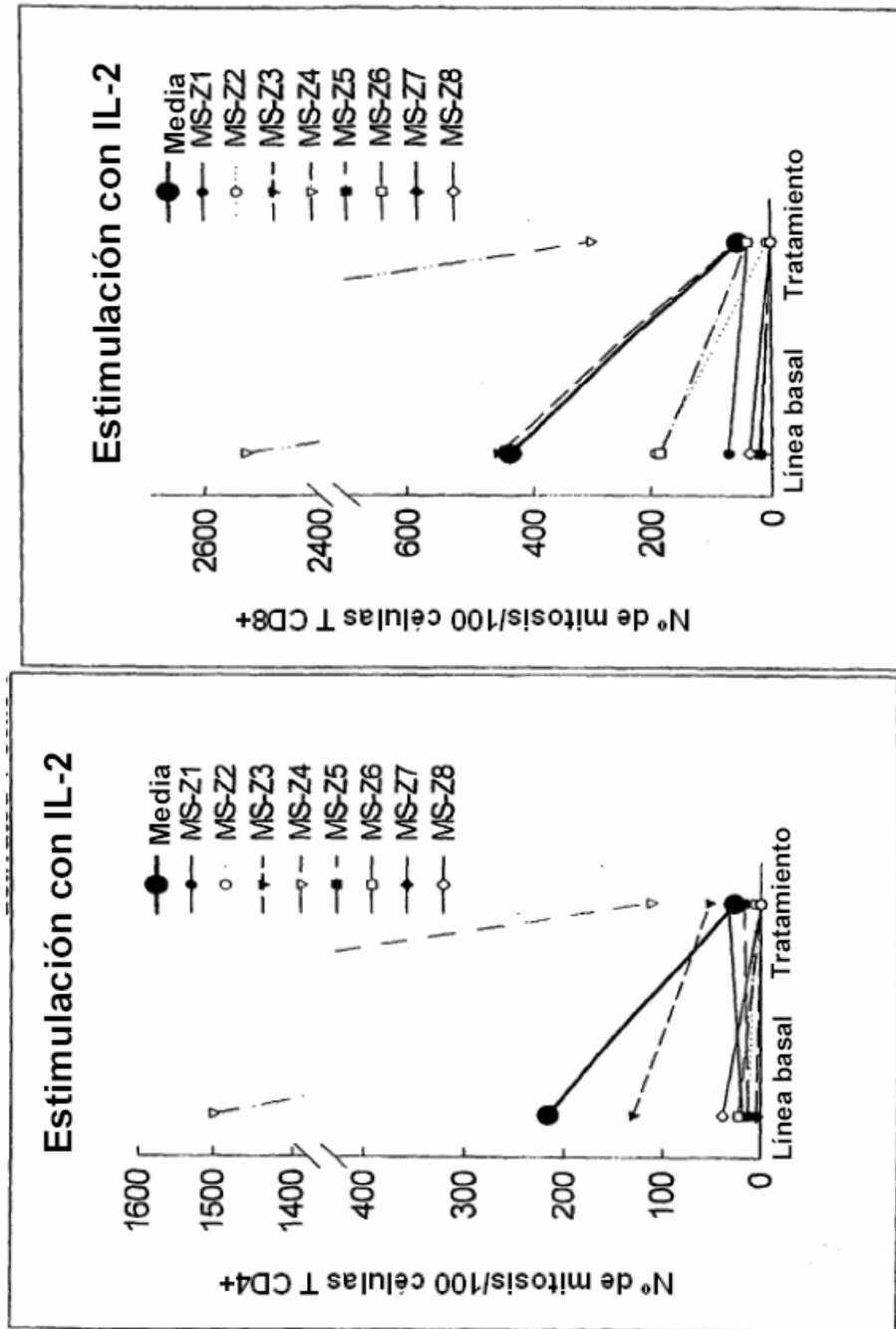


FIG. 8B

FIG. 8A

Regulación positiva de CTLA-4 en células T CD4+ durante la administración de Zenapax:

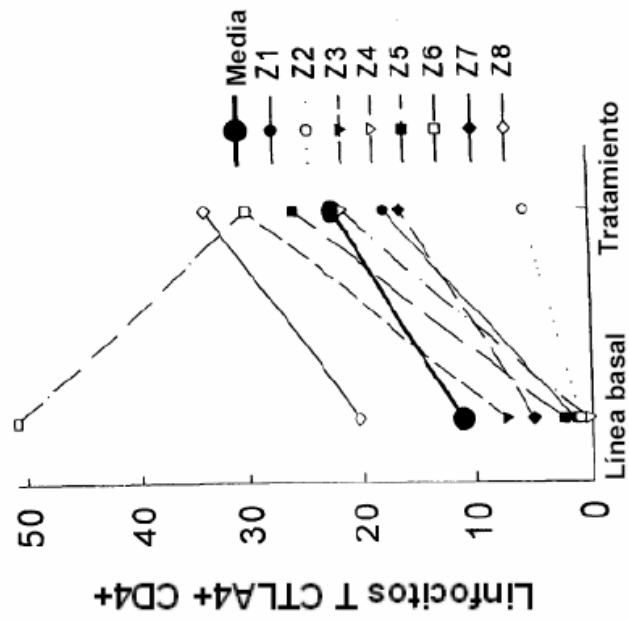


FIG. 9