

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2003.06.27</b>	(73) Titular(es): <b>THE GOV. OF THE UNITED STATES OF AMERICA, REPRESENTED BY THE SEC., DEPT. OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, NAT. INST. OF HEALTH</b> <b>OFFICE OF TECHNOLOGY TRANSFER 6011 EXECUTIVE BOULEVARD, SUITE 325 ROCKVILLE, MD 20814</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2002.06.28 US 393021 P</b> <b>2002.11.27 WO</b> <b>PCT/US02/38290</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2005.06.15</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2014.05.28</b> <b>161/2014</b>	(72) Inventor(es): <b>ROLAND MARTIN</b> <b>US</b> <b>HENRY F. MCFARLAND</b> <b>US</b> <b>BIBIANA BIELEKOVA</b> <b>US</b>
	(74) Mandatário: <b>ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA</b> <b>RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA**

(57) Resumo:

É AQUI DIVULGADO UM MÉTODO PARA TRATAMENTO DE UM SUJEITO COM ESCLEROSE MÚLTIPLA. NUMA CONCRETIZAÇÃO, É PROPORCIONADO UM MÉTODO PARA TRATAMENTO DE UM SUJEITO COM ESCLEROSE MÚLTIPLA QUE INCLUI A ADMINISTRAÇÃO AO SUJEITO DE UMA QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DE UM ANTAGONISTA DO RECEPTOR DE IL-21, EM QUE O SUJEITO NÃO CONSEGUIU RESPONDER AO TRATAMENTO COM INTERFERÃO BETA, TRATANDO DESTE MODO O SUJEITO.

RESUMO

**"Método para o tratamento de esclerose múltipla"**

É aqui divulgado um método para tratamento de um sujeito com esclerose múltipla. Numa concretização, é proporcionado um método para tratamento de um sujeito com esclerose múltipla que inclui a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista do receptor de IL-21, em que o sujeito não conseguiu responder ao tratamento com interferão beta, tratando deste modo o sujeito.

## DESCRIÇÃO

### **"Método para o tratamento de esclerose múltipla"**

#### **CAMPO**

Esta divulgação refere-se ao tratamento de doenças auto-imunes, especificamente ao tratamento de esclerose múltipla utilizando um antagonista do receptor de IL-2, tal como um anticorpo que se liga ao receptor de IL-2 (IL-2R).

#### **ANTECEDENTES**

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crónica, neurológica auto-imune, desmielinizante. A EM pode causar visão turva, perda de visão unilateral (neurite óptica), perda de equilíbrio, falta de coordenação, fala arrastada, tremores, dormência, fadiga extrema, alterações na função intelectual (tais como memória e concentração), fraqueza muscular, parestesia, e cegueira. Muitos sujeitos desenvolvem incapacidades crónicas progressivas, mas longos períodos de estabilidade clínica podem interromper períodos de deterioração. Os défices neurológicos podem ser permanentes ou evanescentes. Nos Estados Unidos existem cerca de 250000 a 400000 pessoas com EM, e todas as semanas cerca de 200 novos casos são diagnosticados. Em todo o mundo, a EM pode afectar 2,5 milhões de indivíduos. Como não é contagiosa, o que exigiria que os médicos dos EUA relatassem novos casos, e como os sintomas podem ser difíceis de detectar, a incidência da doença é apenas estimada e o número real de pessoas com EM pode ser muito maior.

A patologia da EM é caracterizada por uma resposta imunitária anormal dirigida contra o sistema nervoso central. Em particular, linfócitos T são activados contra a bainha de mielina dos neurónios do sistema nervoso central causando desmielinização. No processo de desmielinização, a mielina é destruída e substituída por cicatrizes de tecido "esclerótico" endurecido, que é conhecido como placa. Estas lesões aparecem em locais espalhados por todo o cérebro, nervo óptico e espinal-medula. A desmielinização interfere com a condução de impulsos nervosos, o que produz os sintomas

de esclerose múltipla. A maioria dos indivíduos recupera clinicamente de ataques individuais de desmielinização, produzindo o curso clássico de remissão e exacerbação da forma mais comum da doença conhecida como esclerose múltipla recidivante-remitente.

A EM desenvolve-se em indivíduos geneticamente predispostos e é provavelmente desencadeada por agentes ambientais, tais como vírus (Martin *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 10: 153-187, 1992). De acordo com hipóteses correntes, células T ajudantes CD4+ auto-reactivas activadas (células Th1) que segregam preferencialmente interferão-gama (IFN- $\gamma$ ) e factores de necrose tumoral alfa/beta (TNF- $\alpha$  /  $\beta$ ), induzem inflamação e desmielinização em EM (Martin *et al.*, *supra*). Os dados disponíveis sugerem que a predisposição para montagem de uma resposta semelhante a Th1 a vários antigénios diferentes é um aspecto importante da patogénese da doença de EM. Citocinas pró-inflamatórias (tais como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  /  $\beta$ ) e quimocinas segregadas por células Th1 contribuem para muitos aspectos do desenvolvimento de lesões, incluindo abertura da barreira hematoencefálica, recrutamento de outras células inflamatórias, activação da glia residente (micro e astroglia) e a fase efectora de danos na mielina através de radicais de azoto e oxigénio segregados por macrófagos activados (Wekerle *et al.*, *Trends Neuro Sci.* 9: 271-277, 1986) (Martin *et al.*, *supra*).

A activação periférica de linfócitos auto-reactivos através de mimetismo molecular (Wucherpfennig e Strominger, *Cell.* 80:695-705, 1995; Gran *et al.*, *Ann. Neurol.* 45:559-567, 1999) é um pré-requisito crítico para migração de células T para o compartimento do SNC (Calabresi *et al.*, *Ann. Neurol.* 41:669-674, 1998). Apenas as células T activadas expressando as moléculas de adesão necessárias são capazes de migrar através da barreira hematoencefálica. Colocou-se a hipótese de os linfócitos T em pacientes de EM, assim como em modelos para EM tal como encefalomielite alérgica experimental (EAE, em particular em ratinhos SJL, ver Encinas *et al.* *Nature Genet.* 21:158-16, 1999) diferirem dos indivíduos não susceptíveis por estarem num estado de activação diferente (Calabresi *et al.*, *supra*), uma vez que as células entram no ciclo celular mais facilmente, ficam mais tempo na fase de

crescimento, podem apresentar defeitos nas vias de apoptose (Zipp et al., *Ann. Neurol.* 43:116-120, 1998), ou são activadas *in vivo*, tal como indicado por taxas de mutação mais elevadas no gene da hipoxantina-fosforribosil-transferase em células T específicas de mielina (Allegretta et al., *Science.* 247:718-721, 1990).

O estado dos pacientes de EM pode ser avaliado através do seguimento mensal da actividade de ressonância magnética (MRI) longitudinal, no cérebro de pacientes de EM. A MRI oferece um conjunto único de medidas dos resultados para ensaios clínicos de fase I/II em pequenas coortes de pacientes, e é assim bem adequada para estabelecer dados para a prova de princípio para novas estratégias terapêuticas (p. ex., ver Harris et al., *Ann. Neurol.* 29:548-555, 1991; McFarland et al., *Ann. Neurol.* 32:758-766, 1992; Stone et al., *Ann. Neurol.* 37:611-619, 1995). Actualmente existem quatro tratamentos aprovados para EM recidivante-remitente, três tipos de IFN- $\beta$  (o "Interferon-B multiple sclerosis study group", *Neurology* 43:655-661, 1993; o "IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group", *Neurology* 45:1277-1285, 1995; Jacobs et al., *Ann. Neurol.* 39:285-294, 1996), e copolímero-1 (Johnson KP, "Group. tCMST", *J. Neurol.* 242:S38, 1995). Falhas de tratamento foram ligadas ao desenvolvimento de anticorpos anti-IFN- $\beta$  neutralizantes, embora o seu papel também não seja completamente compreendido actualmente (o "IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group", *Neurology.* 47: 889-894, 1996). A falha na resposta a IFN- $\beta$  é um evento raro, e é portanto importante identificar combinações adequadas de terapia de IFN- $\beta$  com outras modalidades de tratamento, e novos protocolos terapêuticos.

WO90/07861 e WO89/09622 descrevem anticorpos específicos para a proteína p55 Tac do receptor de IL-2, a sua utilização em bloqueio da ligação de IL-2 ao seu receptor. Bielekova et al., *Fed. Clin. Immunology Societies*, Vol 3, No 3, 320, página 5105, Junho de 2002, divulga um tratamento de combinação de pacientes de esclerose múltipla com interferão-beta e um anticorpo humanizado contra a cadeia alfa do receptor de interleucina-2.

## SUMÁRIO

O presente invento proporciona um antagonista do receptor de IL-2 que é um anticorpo que se liga especificamente a p55 do receptor de IL-2 para utilização num método de tratamento de um sujeito com esclerose múltipla, em que o método compreende a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz do referido anticorpo, em que o anticorpo é administrado na ausência de uma administração concomitante de interferão-beta, melhorando deste modo um sinal ou sintoma de esclerose múltipla e tratando o sujeito.

Assim, descrevemos a administração ao sujeito, tal como um sujeito humano, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista do receptor de IL-2 (IL-2R) na ausência de tratamento com interferão beta, melhorando assim um sintoma ou sintomas de esclerose múltipla e tratando o sujeito. Num exemplo, o sujeito não foi capaz de responder ao tratamento prévio com interferão beta. Noutro exemplo, o antagonista de IL-2R é um anticorpo monoclonal, tal como um anticorpo quimérico, humanizado ou humano, que se liga especificamente à cadeia ou p55 (Tac) do receptor de IL-2.

O anticorpo monoclonal pode ser administrado pelo menos duas vezes por semana durante um período de pelo menos dois meses. O sujeito não é tratado com interferão- durante a administração do anticorpo monoclonal. Noutro exemplo específico não limitativo, o sujeito não conseguiu anteriormente responder a tratamento com interferão- .

Em exemplos particulares, o antagonista de IL-2R é um anticorpo, tal como um anticorpo monoclonal, por exemplo um anticorpo anti-p55, tal como daclizumab.

O anterior e outras características e vantagens tornar-se-ão mais aparentes a partir da descrição detalhada de várias concretizações, que procedem com referência às figuras anexas.

### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A **Fig. 1** é um gráfico do número de lesões novas, totais, supertotais e de T2LL num sujeito tratado apenas com Zenapax® ao longo do tempo. O sujeito não respondeu a terapia anterior de combinação com Zenapax® e interferão (IFN) beta, tal como indicado na região à direita da linha vertical a cheio. O início da monoterapia de Zenapax® (na ausência de tratamento com interferão-beta) é mostrado pela seta. Não foram detectadas lesões após o início da monoterapia de Zenapax®.

A **Fig. 2** é um gráfico do número de lesões novas, totais, supertotais e de T2LL num segundo sujeito tratado apenas com Zenapax® ao longo do tempo. O sujeito não respondeu a terapia anterior de combinação com Zenapax® e interferão (IFN) beta, tal como indicado na região à direita da linha vertical tracejada. O início da monoterapia de Zenapax® (na ausência de tratamento com interferão-beta) é mostrado pela seta. Não foram detectadas novas lesões após o início da monoterapia de Zenapax®.

A **Fig. 3** é um conjunto de gráficos mostrando as mudanças em lesões de aumento de contraste novas, totais e supertotais medidas através de varrimentos de imagiologia de ressonância magnética (MRI) em sujeitos tratados com uma combinação de daclizumab e interferão-beta mostrando a diferença entre um período limiar de 3 meses de tratamento apenas com interferão-beta e após terapia de combinação em oito sujeitos.

As **Figs. 4A e 4B** são gráficos mostrando alterações no desempenho neurológico tal como medido através do desempenho na Escala Expandida de Estado de Incapacidade (EDSS) (Fig. 4A) e na Escala de Pontuação Neurológica de Scripps (NRS) (Fig. 4B) entre o período limiar e após terapia de combinação para os mesmos sujeitos que na Fig. 3.

As **Figs. 5A e 5B** são gráficos mostrando alterações no desempenho neurológico tal como medido através do desempenho no índice de deambulação (Fig. 5A) e na caminhada cronometrada de 20 m (Fig. 5B) entre o período limiar e após terapia de combinação para os mesmos sujeitos que na Fig. 3.

As **Figs. 6A e 6B** são gráficos mostrando alterações no desempenho neurológico medidas através dos tempos no teste de 9 pinos nos buracos para mãos dominantes (Fig. 6A) e não dominantes (Fig. 6B), respectivamente, entre o período limiar e após terapia de combinação para os mesmos sujeitos que na Fig. 1.

A **Fig. 7** é um conjunto de gráficos mostrando alterações na percentagem de células CD4+/CD25+ e células CD8+/CD25+ expressando o epitopo Tac entre o período limiar e após terapia de combinação para sete dos sujeitos da Fig. 3.

As **Figs. 8A e 8B** são gráficos mostrando alterações no número de mitoses de células T CD4 por cem células (Fig. 8A) e mitoses de células T CD8 por cem células (Fig. 8B) entre o período limiar e após terapia de combinação para os mesmos sujeitos que na Fig. 3.

A **Fig. 9** é um gráfico mostrando alterações no número de células T CD4 expressando o antigénio 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) à sua superfície medido através de separação de células activada por fluorescência de amostras de sangue entre o período limiar e após terapia de combinação para os mesmos sujeitos que na Fig. 3.

## DESCRIÇÃO DETALHADA

### *I. Abreviaturas*

**CDR:** região determinante de complementaridade  
**CBC:** hemograma completo  
**CNP:** nucleótido-3'-fosfodiesterase cíclica  
**EDSS:** escala expandida de estado de incapacidade  
**FR:** região estrutural  
**Gd:** gadolínio  
**HIV:** vírus da imunodeficiência humana  
**HV:** região hipervariável  
**IFN:** interferão  
**Ig:** imunoglobulina  
**IL-2:** interleucina 2  
**IL-2R:** receptor de interleucina 2  
**kg:** quilograma



**KLH:** hemocianina da lapa  
**LPS:** lipopolissacárido  
**MBP:** proteína básica da mielina  
**mg:** miligrama  
**mm:** milímetro  
**MOG:** glicoproteína de mielina/oligodendrócito  
**MRI:** imagiologia de ressonância magnética  
**EM:** esclerose múltipla  
**NK:** assassinas naturais  
**NO-:** óxido nítrico  
**PBMC:** células mononucleares do sangue periférico  
**PLP:** proteína proteolipídica de mielina  
**SRS:** Escala de Pontuação Neurológica de Scripps  
**TGF:** factor de crescimento transformante  
**TNF:** factor de necrose tumoral  
**VH:** pesada variável  
**VL:** leve variável

## *II. Termos*

A menos que observado em contrário, os termos técnicos são utilizados de acordo com a utilização convencional. As definições de termos comuns em biologia molecular podem ser encontradas em 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); e Robert A. Meyers (ed.), *"Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference"*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). As definições e informação adicional conhecidas de um perito na técnica em imunologia podem ser encontradas, por exemplo, em *"Fundamental Immunology"*, W.E. Paul, ed., quarta edição, Lippincott-Raven Publishers, 1999.

Para facilitar a revisão das várias concretizações desta divulgação, são proporcionadas as seguintes explicações dos termos específicos:

**Efeitos Adversos:** Quaisquer sinais indesejáveis, incluindo as manifestações clínicas de resultados laboratoriais anormais, ou diagnósticos médicos observados

pelo pessoal médico, ou sintomas relatados pelo sujeito que pioraram. Eventos adversos incluem, mas não estão limitados a, eventos de perigo de vida, um evento que prolongue a hospitalização, ou um evento que resulte em intervenção médica ou cirúrgica para evitar um resultado indesejável.

**Antagonista de um Receptor de IL-2 (IL-2R):** Um agente que se liga especificamente ao IL-2R, ou a um componente deste, e inibe uma função biológica do receptor de IL-2 ou do componente. Exemplos de funções que podem ser inibidas são a ligação de IL-2 ao IL-2R, a transmissão intracelular de um sinal a partir da ligação de IL-2, e a proliferação e/ou ativação de linfócitos tais como células T em resposta a IL-2. Numa forma de realização, antagonistas de IL-2R de utilização nos métodos aqui divulgados inibem pelo menos uma destas funções. Alternativamente, o antagonista de IL-2R de utilização nos métodos aqui divulgados pode inibir mais do que uma ou todas estas funções.

Num exemplo, um antagonista do receptor de IL-2 é um anticorpo que se liga especificamente a Tac (p55), tal como Zenapax® (ver abaixo). Outros agentes anti-p55 incluem o anticorpo quimérico basiliximab (Simulect®), BT563 (ver Baan *et al. Transplant. Proc.* 33:224-2246, 2001), e 7G8. Basiliximab tem sido relatado como sendo benéfico na prevenção da rejeição de aloenxertos (Kahan *et al. Transplantation* 67:276-84, 1999), e tratamento de psoríase (Owen & Harrison, *Clin. Exp. Dermatol.* 25:195-7, 2000). Um anticorpo anti-p55 humano exemplar de uso nos métodos da invenção é HuMax-TAC, a ser desenvolvido pela Genmab. Noutro exemplo, um antagonista do receptor de IL-2 é um anticorpo que se liga especificamente a p75 ou à subunidade do IL-2R.

Anticorpos adicionais que se ligam especificamente ao receptor de IL-2 são conhecidos na técnica. Por exemplo, ver Patente U.S. No. 5011684; Patente U.S. No. 5152980; Patente U.S. No. 5336489; Patente U.S. No. 5510105; Patente U.S. No. 5571507; Patente U.S. No. 5587162; Patente U.S. No. 5607675; Patente U.S. No. 5674494; Patente U.S. No. 5916559. O anticorpo mik- é um antagonista que se liga especificamente à cadeia beta do IL-2R humano.

Noutro exemplo, um antagonista do receptor de IL-2 é um antagonista peptídico que não é um anticorpo. São também conhecidos antagonistas peptídicos do receptor de IL-2, incluindo antagonistas de Tac (p55) e p75 (IL-2R ). Por exemplo, antagonistas peptídicos para p55 e p75 são divulgados na Patente U.S. No. 5635597. Estes péptidos são também utilizáveis nos métodos aqui divulgados.

Noutro exemplo, um antagonista do receptor de IL-2 é um composto químico ou uma pequena molécula que se liga especificamente ao receptor de IL-2 e inibe uma função biológica do receptor.

**Fragmento de anticorpo (fragmento com ligação específica ao antígeno):** Foram definidos vários fragmentos de anticorpos, incluindo Fab, (Fab')<sub>2</sub>, Fv, e Fv de cadeia simples (scFv). Estes fragmentos de anticorpo são definidos como se segue: (1) Fab, o fragmento que contém um fragmento de ligação ao antígeno monovalente de uma molécula de anticorpo através de digestão do anticorpo inteiro com a enzima papaína para produzir uma cadeia leve intacta e uma porção de uma cadeia pesada ou equivalentemente através de engenharia genética; (2) Fab', o fragmento de uma molécula de anticorpo obtido através de tratamento do anticorpo inteiro com pepsina, seguido de redução, para produzir uma cadeia leve intacta e uma porção da cadeia pesada; são obtidos dois fragmentos Fab' por molécula de anticorpo; (3) (Fab')<sub>2</sub>, o fragmento do anticorpo obtido através de tratamento do anticorpo inteiro com a enzima pepsina sem subsequente redução ou equivalentemente através de engenharia genética; (4) F(Ab')<sub>2</sub>, um dímero de dois fragmentos FAb' mantidos juntos através de ligações dissulfureto; (5) Fv, um fragmento geneticamente modificado contendo a região variável da cadeia leve e a região variável da cadeia pesada expressa como duas cadeias; e (6) anticorpo de cadeia simples ("SCA"), uma molécula geneticamente modificada contendo a região variável da cadeia leve, a região variável da cadeia pesada, ligada através de um ligador polipeptídico adequado tal como uma molécula de cadeia simples fundida geneticamente. Os métodos de produção destes fragmentos são rotina na técnica.

**Distúrbio auto-imune:** Um distúrbio em que o sistema imunitário produz uma resposta imunitária (p. ex. uma resposta de células B ou células T) contra um antigénio endógeno, com consequente lesão dos tecidos.

**Interferão beta:** Qualquer interferão beta incluindo interferão-beta 1a e interferão-beta 1b.

O interferão-beta 1a é uma glicoproteína de 166 aminoácidos com um peso molecular previsto de aproximadamente 22500 daltons. O interferão-beta 1a conhecido como Avonex® é produzido através de tecnologia de ADN recombinante utilizando células de mamífero (células de Ovário de Hamster Chinês) nas quais o gene do interferão-beta humano foi introduzido. A sequência de aminoácidos de Avonex® é idêntica à do interferão-beta humano natural. Produtos génicos e marcadores induzidos pelo interferão, incluindo 2',5'-oligoadenilato-sintase,  $\beta_2$ -microglobulina, e neopterin, foram medidos nas fracções sérica e celular de sangue colhido de pacientes tratados com Avonex®. Avonex® foi aprovado em 1996 e é comercializado por Biogen, Inc. Foi demonstrado que Avonex® diminui o número de lesões aumentadas por gadolínio (Gd) em sujeitos a quem foi administrado o fármaco durante dois anos em até 13% e melhora aproximadamente 22% das pontuações da Escala Expandida de Estado de Incapacidade (EDSS) dos sujeitos.

Outro interferão-beta 1a foi aprovado em 2002 e é conhecido como Rebif®, comercializado por Serono, Inc. O interferão-beta 1a conhecido como Rebif® foi recentemente aprovado para tratamento de EM recidivante-remitente. A principal diferença entre Avonex® e Rebif® é o método de administração aprovado - injeção intramuscular para o primeiro e injeção subcutânea para o último. De acordo com Samkoff, *Hosp. Phys.*, pág. 21-7 (2002), Rebif® pode reduzir taxas de recidiva em 33% em sujeitos tomando o fármaco.

O interferão-beta 1b é uma proteína altamente purificada que possui 165 aminoácidos e um peso molecular aproximado de 18500 daltons. Um interferão-beta 1b conhecido como Betaseron® foi aprovado como tratamento para EM em 1993 e é comercializado por Berlex Laboratories, Inc. Betaseron® é

fabricado através de fermentação bacteriana de uma estirpe de *Escherichia coli* que possui um plasmídeo geneticamente modificado contendo o gene para o interferão-beta humano. O gene nativo foi obtido a partir de fibroblastos humanos e alterado para substituir o resíduo de cisteína por serina que se encontra na posição 17. De acordo com a *Physicians' Desk Reference* (1996), demonstrou-se que Betaseron® reduz a taxa de exacerbação em sujeitos tomando o fármaco em cerca de 31%. Os mecanismos pelos quais o interferão-beta 1b exerce as suas acções na esclerose múltipla não são claramente compreendidos. No entanto, sabe-se que as propriedades de modificação da resposta biológica do interferão-beta 1b são mediadas pelas suas interacções com receptores celulares específicos. A ligação do interferão-beta 1b a estes receptores induz a expressão de vários produtos de genes induzidos por interferão (p. ex., 2',5'-oligoadenilato-sintase, proteína-cinase, e indoleamina-2,3-dioxigenase) que se acredita serem os mediadores das acções biológicas do interferão beta-1b.

**Região determinante de complementaridade (CDR):** As CDR são três regiões hipervariáveis dentro de cada uma das regiões leve variável (VL) e pesada variável (VH) de uma molécula de anticorpo que formam a superfície de ligação ao antígeno que é complementar à estrutura tridimensional do antígeno ligado. Procedendo a partir do terminal N de uma cadeia pesada ou leve, estas regiões determinantes de complementaridade são indicadas como "CDR1", "CDR2" e "CDR3", respectivamente. As CDR estão envolvidas na ligação do anticorpo ao antígeno, e a CDR3 compreende uma região única específica para a ligação antígeno-anticorpo. Um local de ligação ao antígeno, por conseguinte, pode incluir seis CDR, compreendendo as regiões CDR de cada uma da região V de cadeia leve e pesada. A alteração de um único aminoácido numa região CDR pode destruir a afinidade de um anticorpo para um antígeno específico (ver Abbas *et al.*, *Cellular and Molecular Immunology*, 4ª ed. 143-5, 2000). As localizações das CDR foram definidas com precisão, p. ex., por Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunologic Interest", U.S. Department of Health and Humano Services, 1983.

**Epitopo:** O local num antígeno reconhecido por um anticorpo tal como determinado pela especificidade da sequência de aminoácidos. Diz-se que dois anticorpos se ligam ao mesmo epitopo se cada um inibir competitivamente (bloquear) a ligação do outro ao antígeno tal como medido num ensaio de ligação competitiva (ver, p. ex., Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 50: 1495-1502, 1990). Alternativamente, dois anticorpos têm o mesmo epitopo se a maioria das mutações de aminoácidos no antígeno que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzem ou eliminam a ligação do outro. Diz-se que dois anticorpos têm epitopos sobreponíveis se cada um inibir parcialmente a ligação do outro ao antígeno, e/ou se algumas mutações de aminoácidos que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzem ou eliminam a ligação do outro.

**Região estrutural (FR):** Sequências relativamente conservadas flanqueando as três regiões determinantes de complementaridade (CDR) altamente divergentes dentro das regiões variáveis das cadeias pesada e leve de um anticorpo. Assim, a região variável de uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo consiste numa FR e três CDR. Alguns resíduos de FR podem entrar em contacto com o antígeno ligado; no entanto, as FR são primariamente responsáveis pela dobragem da região variável no local de ligação ao antígeno, em particular os resíduos de FR directamente adjacentes às CDR. Sem estar preso à teoria, a região estrutural de um anticorpo serve para posicionar e alinhar as CDR. As sequências das regiões estruturais de diferentes cadeias leves ou pesadas são relativamente conservadas dentro de uma espécie. Uma região estrutural "humana" é uma região estrutural que é substancialmente idêntica (cerca de 85% ou mais, habitualmente 90-95% ou mais) à região estrutural de uma imunoglobulina humana de ocorrência natural.

**Imunoglobulina:** Uma proteína incluindo um ou mais polipéptidos substancialmente codificados por genes de imunoglobulina. Os genes de imunoglobulina reconhecidos incluem os genes das regiões constantes de capa, lambda, alfa (IgA), gama (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>), delta (IgD), épsilon (IgE) e mu (IgM), bem como a miríade de genes de regiões variáveis de imunoglobulina. As cadeias leves de

imunoglobulina inteira têm geralmente cerca de 25 Kd ou 214 aminoácidos de comprimento. As cadeias pesadas de imunoglobulina inteira têm geralmente cerca de 50 Kd ou 446 aminoácidos de comprimento. As cadeias leves são codificadas por um gene de região variável no terminal NH<sub>2</sub> (cerca de 110 aminoácidos de comprimento) e um gene de região constante de capa ou lambda no terminal COOH. As cadeias pesadas são codificadas de forma semelhante por um gene de região variável (cerca de 116 aminoácidos de comprimento) e um dos outros genes de região constante.

A unidade estrutural básica de um anticorpo é geralmente um tetrâmero que consiste em dois pares idênticos de cadeias de imunoglobulina, tendo cada par uma cadeia leve e uma pesada. Em cada par, as regiões variáveis de cadeia leve e pesada ligam-se a um antigénio, e as regiões constantes medeiam funções efectoras. As imunoglobulinas existem também numa variedade de outras formas incluindo, por exemplo, Fv, Fab, e (Fab')<sub>2</sub>, bem como anticorpos híbridos bifuncionais e cadeias simples (p. ex., Lanzavecchia *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 17:105, 1987; Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:5879-5883, 1988; Bird *et al.*, *Science* 242:423-426, 1988; Hood *et al.*, *Immunology*, Benjamin, N.Y., 2<sup>a</sup> ed., 1984; Hunkapiller e Hood, *Nature* 323:15-16, 1986).

Uma região variável de cadeia leve ou pesada de imunoglobulina inclui uma região estrutural interrompida por três regiões hipervariáveis, também chamadas regiões determinantes de complementaridade (CDR) (ver, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", E. Kabat *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, 1983). Tal como observado acima, as CDR são principalmente responsáveis pela ligação a um epítipo de um antigénio.

Os anticorpos quiméricos são anticorpos cujos genes de cadeia leve e pesada foram construídos, tipicamente através de engenharia genética, a partir de genes da região variável e constante de imunoglobulinas pertencentes a diferentes espécies. Por exemplo, os segmentos variáveis dos genes de um anticorpo monoclonal de ratinho podem ser unidos a segmentos constantes humanos, tais como capa e gama 1 ou gama 3. Num exemplo, um anticorpo quimérico terapêutico é assim uma

proteína híbrida constituída pelo domínio variável ou de ligação ao antigénio de um anticorpo de ratinho e o domínio constante ou efector de um anticorpo humano (p. ex., o No. de Acesso ATCC CRL 9688 segrega um anticorpo quimérico anti-Tac), embora possam ser utilizadas outras espécies de mamífero, ou a região variável possa ser produzida através de técnicas moleculares. Os métodos de produção de anticorpos quiméricos são bem conhecidos na técnica, p. ex., ver Patente U.S. No. 5807715.

Uma imunoglobulina "humanizada" é uma imunoglobulina incluindo uma região estrutural humana e uma ou mais CDR de uma imunoglobulina não humana (tal como de ratinho, rato ou sintética) imunoglobulina. A imunoglobulina não humana proporcionando as CDR é designada uma imunoglobulina "dadora" e a imunoglobulina humana proporcionando a estrutura é designada uma "aceitadora". Numa concretização, todas as CDR são da imunoglobulina dadora numa imunoglobulina humanizada. Não precisam de estar presentes regiões constantes, mas se estiverem, têm de ser substancialmente idênticas às regiões constantes da imunoglobulina humana, i.e., pelo menos cerca de 85-90%, tal como cerca de 95% idênticas ou mais. Assim, todas as partes de uma imunoglobulina humanizada, excepto possivelmente as CDR, são substancialmente idênticas às correspondentes partes de sequências da imunoglobulina humana natural. Um "anticorpo humanizado" é um anticorpo compreendendo uma imunoglobulina de cadeia leve humanizada e de cadeia pesada humanizada. Um anticorpo humanizado liga-se ao mesmo antigénio que o anticorpo dador que proporciona as CDR. A estrutura aceitadora de uma imunoglobulina ou anticorpo humanizado pode ter um número limitado de substituições por aminoácidos tomados a partir de uma estrutura dadora. Anticorpos monoclonais humanizados ou outros podem ter substituições de aminoácidos conservativas adicionais que não tenham substancialmente efeito na ligação ao antigénio ou noutras funções da imunoglobulina. Substituições conservativas exemplares são aquelas tais como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; e phe, tyr (ver Patente U.S. No. 5585089). As imunoglobulinas humanizadas podem ser construídas por meio de engenharia genética, p. ex., ver Patente U.S. No. 5225539 e Patente U.S. No. 5585089.



Um anticorpo humano é um anticorpo em que os genes de cadeia leve e pesada são de origem humana. Os anticorpos humanos podem ser gerados utilizando métodos conhecidos na técnica. Anticorpos humanos podem ser produzidos através da imortalização de uma célula B humana segregando o anticorpo de interesse. A imortalização pode ser conseguida, por exemplo, através de infecção por EBV ou através de fusão de uma célula B humana com uma célula de mieloma ou hibridoma para produzir uma célula de trioma. Anticorpos humanos podem também ser produzidos por métodos de apresentação em fagos (ver, p. ex., Dower *et al.*, Publicação PCT No. W091/17271; McCafferty *et al.*, Publicação PCT No. W092/001047; e Winter, Publicação PCT No. W092/20791) ou seleccionados a partir de uma biblioteca combinatória de anticorpos monoclonais humanos (ver sítio da internet Morphosys). Anticorpos humanos podem também ser preparados através da utilização de animais transgénicos possuindo um gene de imunoglobulina humana (p. ex., ver Lonberg *et al.*, Publicação PCT No. W093/12227; e Kucherlapati, Publicação PCT No. W091/10741).

**Interleucina 2 (IL-2):** Uma proteína de 133 aminoácidos (15,4 kDa), com um pI ligeiramente básico que não apresenta homologia de sequência com quaisquer outros factores. A IL-2 de murídeo e humana apresentam uma homologia de aproximadamente 65%. A IL-2 é sintetizada como uma proteína precursora de 153 aminoácidos, com os primeiros 20 aminoácidos amino-terminais funcionando como uma sequência sinal de secreção hidrófoba. A proteína contém uma única ligação dissulfureto (posições Cys58/105) essencial para a actividade biológica. O gene de IL-2 humano contém quatro exões e está mapeado no cromossoma 4q26-28 humano (cromossoma 3 de murídeo).

As actividades biológicas de IL-2 são mediadas por um receptor membranar que é expresso em células T activadas, mas não em repouso, e células assassinas naturais (NK). As células B activadas e leucócitos mononucleares em repouso também raramente expressam este receptor.

**Receptor de IL-2:** Um receptor celular que se liga a IL-2 e medeia os seus efeitos biológicos. Distinguem-se três tipos

diferentes de receptores de IL-2 que são expressos diferencialmente e independentemente. O receptor de IL-2 de elevada afinidade ( $K_d = 10$  pM) constitui aproximadamente 10% de todos os receptores de IL-2 expressos pelas células. Este receptor é um complexo receptor membranar consistindo nas duas subunidades: IL-2R-alfa (também conhecida como antigénio de activação de células T (TAC) ou p55) e IL-2R-beta (também conhecida como p75 ou CD122). Um receptor de IL-2 de afinidade intermédia ( $K_d = 100$  pM) consiste na subunidade p75 e uma cadeia gama, enquanto um receptor de baixa afinidade ( $K_d = 10$  nM) é formado apenas por p55.

p75 tem 525 aminoácidos de comprimento. Possui um domínio extracelular de 214 aminoácidos e um domínio citoplasmático de 286 aminoácidos. O gene de p75 está mapeado no cromossoma humano 22q11.2-q12, contém 10 exões e possui um comprimento de aproximadamente 24 kb. p55 tem 251 aminoácidos de comprimento com um domínio extracelular de 219 aminoácidos e um domínio citoplasmático muito curto de 13 aminoácidos. O gene codificando p55 está mapeado no cromossoma 10p14-p15 humano.

p75 é expresso constitutivamente em linfócitos T em repouso, células NK, e vários outros tipos de células, enquanto a expressão de p55 é normalmente apenas observada após activação. Os linfócitos activados segregam continuamente um fragmento de 42 kDa de p55 (antigénio TAC). Este fragmento circula no soro e no plasma e funciona como um receptor de IL-2 solúvel (ver Smith, *Ann. Rev. Cell Biol.* 5:397-425, 1989; Taniguchi e Minami, *Cell* 73:5-8, 1993).

p55 tem um comprimento de 251 aminoácidos com um domínio extracelular de 219 aminoácidos e um domínio citoplasmático curto de 13 aminoácidos. O gene de p55 está mapeado no cromossoma 10p14-p15 humano. A expressão de p55 é regulada por uma proteína nuclear chamada RPT-1.

Uma terceira subunidade de 64 kDa do receptor de IL-2, designada gama, foi descrita. Esta subunidade é necessária para a geração de receptores de IL-2 de afinidade alta e intermédia mas não se liga a IL-2 por si só. O gene que codifica a subunidade gama do receptor de IL2 está mapeada no

cromossoma Xq13 humano, abrange aproximadamente 4,2 kb e contém oito exões.

**Imagiologia de Ressonância Magnética:** Uma técnica de diagnóstico não invasiva que produz imagens computadorizadas de tecidos internos do corpo e se baseia em ressonância magnética nuclear de átomos no interior do corpo induzida pela aplicação de ondas de rádio.

A MRI do cérebro é uma ferramenta importante para a compreensão da patologia dinâmica da esclerose múltipla. A MRI do cérebro ponderada a  $T_2$  define lesões com elevada sensibilidade em esclerose múltipla e é utilizada como medida da carga da doença. No entanto, tal elevada sensibilidade ocorre à custa de especificidade, uma vez que as alterações do sinal de  $T_2$  podem reflectir áreas de edema, desmielinização, gliose e perda de axónios. Crê-se que áreas de aumento de gadolínio (Gd) demonstradas em MRI do cérebro ponderada a  $T_1$  reflectem a ruptura da barreira hematoencefálica subjacente a partir de inflamação perivascular activa. Tais áreas de aumento são transientes, tipicamente com uma duração <1 mês. A MRI do cérebro ponderada a  $T_1$  com aumento de gadolínio é portanto utilizada para avaliar a actividade da doença. A maioria das lesões ponderadas a  $T_2$  ( $T_2$ ) na substância branca central de sujeitos com esclerose múltipla começa com um período variável de aumento de gadolínio (Gd) ponderado a  $T_1$  ( $T_1$ ) e esse aumento de Gd a  $T_1$  e as lesões a  $T_2$  representam estádios de um único processo patológico. As técnicas de MRI do cérebro para avaliação de lesões de aumento de GD a  $T_1$  e  $T_2$  são padrão (p. ex., ver Lee *et al.*, *Brain* 122 (Pt 7): 1211-2 de 1999).

**Anticorpo monoclonal:** Um anticorpo produzido por um único clone de linfócitos B ou por uma célula na qual foram transfectados os genes de cadeia leve e pesada de um único anticorpo. Os anticorpos monoclonais são produzidos através de métodos conhecidos dos peritos na técnica, por exemplo através da produção de células formadoras de anticorpos híbridos a partir de uma fusão de células de mieloma com células imunitárias do baço.

**Esclerose múltipla:** Uma doença auto-imune classicamente descrita como um distúrbio da substância branca do sistema nervoso central disseminada no tempo e no espaço que se apresenta como uma doença recidivante-remitente em 80-85% dos pacientes. O diagnóstico pode ser feito através de imagiologia de ressonância magnética (MRI) do cérebro e da espinal-medula, análise de potenciais somatossensoriais evocados, e análise do líquido cefalorraquidiano para detectar quantidades maiores de imunoglobulina ou bandas oligoclonais. A MRI é uma ferramenta de diagnóstico particularmente sensível. Anomalias em MRI indicando a presença ou progressão de EM incluem sinais híper-intensos de substância branca em imagens ponderadas a T2 e imagens de recuperação de inversão atenuada de fluído, aumento de gadolínio de lesões activas, "buracos negros" hipo-intensivos (representando gliose e patologia dos axónios) e atrofia do cérebro em estudos ponderados a T1. Estudos de MRI em série podem ser usados para indicar progressão da doença.

A esclerose múltipla recidivante-remitente é um curso clínico de EM que se caracteriza por ataques agudos claramente definidos com recuperação completa ou parcial e sem progressão da doença entre os ataques.

A esclerose múltipla progressiva secundária é um curso clínico de EM que inicialmente é recidivante-remitente, e em seguida torna-se progressivo a uma taxa variável, possivelmente com uma recaída ocasional e menor remissão.

A esclerose múltipla progressiva primária apresenta-se inicialmente na forma progressiva.

**Polipéptido:** Um polímero em que os monómeros são resíduos de aminoácidos que estão unidos entre si através de ligações amida. Quando os aminoácidos são alfa-aminoácidos, pode ser usado o isómero óptico L ou o isómero óptico D, sendo preferidos os isómeros L. Os termos "polipéptido" ou "proteína", tal como aqui utilizados destinam-se a englobar qualquer sequência de aminoácidos e incluem sequências modificadas tais como glicoproteínas. O termo "polipéptido" pretende cobrir especificamente proteínas de ocorrência

natural, bem como as que são produzidas de forma recombinante ou sinteticamente.

O termo "fragmento" refere-se a uma porção de um polipéptido que tem pelo menos 8, 10, 15, 20 ou 25 aminoácidos de comprimento. O termo "fragmentos funcionais de um polipéptido" refere-se a todos os fragmentos de um polipéptido que mantêm uma actividade do polipéptido (p. ex., a ligação de um antigénio). Os fragmentos biologicamente funcionais, por exemplo, podem variar em tamanho de um fragmento polipeptídico tão pequeno como um epitopo capaz de se ligar a uma molécula de anticorpo até um grande polipéptido capaz de participar na indução ou programação característica de modificações fenotípicas dentro de uma célula. O termo "solúvel" refere-se a uma forma de um polipéptido que não é inserida dentro de uma membrana celular.

**Agente farmacêutico ou fármaco:** Um composto químico ou composição capaz de induzir um efeito terapêutico ou profiláctico desejado, quando administrado correctamente a um sujeito.

**Transportadores farmacêuticamente aceitáveis:** Os veículos farmacêuticamente aceitáveis úteis nos métodos aqui divulgados são convencionais. "Remington Pharmaceutical Sciences", por E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª edição (1975), descreve composições e formulações adequadas para distribuição farmacêutica dos antagonistas do receptor de IL-2 aqui divulgados.

Em geral, a natureza do transportador dependerá do modo particular de administração a empregar. Por exemplo, formulações parentéricas compreendem habitualmente fluidos injectáveis que incluem fluidos farmacêuticamente e fisiologicamente aceitáveis, tais como água, soro fisiológico, soluções salinas equilibradas, dextrose aquosa, glicerol ou semelhantes como veículo. Para composições sólidas (p. ex., formas em pó, pílula, comprimido ou cápsula), os transportadores sólidos não-tóxicos convencionais podem incluir, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, ou estearato de magnésio. Além de

transportadores biologicamente neutros, as composições farmacêuticas a administrar podem conter substâncias auxiliares não-tóxicas, tais como agentes molhantes ou emulsionantes, conservantes, sais, aminoácidos, e agentes de tamponamento do pH e semelhantes, por exemplo cloreto de sódio ou de potássio ou fosfato, Tween, acetato de sódio ou monolaurato de sorbitano.

**Purificado:** O termo purificado não requer pureza absoluta ou isolamento; em vez disso, pretende-se como um termo relativo. Assim, por exemplo, uma preparação de proteína purificada ou isolada é uma em que a proteína é mais enriquecida do que quando a proteína está no seu ambiente generativo, por exemplo dentro de uma célula ou numa câmara de reacção bioquímica. De preferência, uma preparação de proteína é purificada de modo a que a proteína represente pelo menos 50% do teor proteico total da preparação. Para produtos farmacêuticos, pode ser utilizada uma pureza "substancial" de 90%, 95%, 98% ou mesmo 99% ou superior do agente activo.

**Identidade de sequências:** A semelhança entre duas sequências de ácido nucleico, ou duas sequências de aminoácidos, é expressa em termos de semelhança entre as sequências, de outro modo referida como identidade de sequências. A identidade de sequências é frequentemente medida em termos de percentagem de identidade (ou semelhança ou homologia); quanto mais elevada a percentagem, mais semelhantes são as duas sequências. Os homólogos ou ortólogos dos anticorpos de IL-2R ou fragmentos de ligação ao antígeno, e a correspondente sequência de ADNc, possuirão um grau relativamente elevado de identidade de sequências quando alinhados utilizando métodos padrão. Esta homologia será mais significativa quando as proteínas ortólogas ou ADNc são derivados de espécies que estão mais intimamente relacionadas, em comparação com espécies mais distantemente relacionados (p. ex., sequências humanas e de murídeo).

Os métodos de alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na técnica. Vários programas e algoritmos de alinhamento estão descritos em Smith e Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981; Needleman e Wunsch, *J. Mol. Biol.*

48:443, 1970; Pearson e Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins e Sharp, *Gene* 73:237-244 9, 1988); Higgins e 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; e Pearson et al., *Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994. Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990, apresenta uma análise detalhada dos métodos de alinhamento de sequências e cálculos de homologia.

**Agente de ligação específica:** Um agente que se liga a apenas substancialmente um alvo definido. Assim, um agente de ligação específico do receptor de IL-2 liga-se substancialmente apenas ao receptor de IL-2 ou a um componente deste. Tal como aqui utilizado, o termo "agente de ligação específico do receptor de IL-2" inclui anticorpos anti-receptor de IL-2 e outros agentes que se ligam a apenas substancialmente um receptor de IL-2 ou um componente deste (p. ex., p55, p75).

Anticorpos anti-receptor de IL-2 podem ser produzidos utilizando procedimentos padrão descritos em numerosos textos, incluindo Harlow e Lane (*Using Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1999, ISBN 0-87969-544-7). Além disso, certas técnicas podem aumentar a produção de anticorpos neutralizantes (Patente U.S. No. 5843454; Patente U.S. No. 5695927; Patente U.S. No. 5643756; e Patente U.S. No. 5013548). A determinação de que um determinado agente se liga a apenas substancialmente um componente do receptor de IL-2 pode ser facilmente realizada utilizando ou adaptando procedimentos de rotina. Um ensaio *in vitro* adequado faz uso do procedimento de transferência Western (descrito em muitos textos padrão, incluindo Harlow e Lane, 1999). A transferência Western pode ser utilizada para determinar que um dado agente de ligação a proteína, tal como um anticorpo monoclonal anti-receptor de IL-2, se liga apenas substancialmente ao receptor de IL-2. Anticorpos para o receptor de IL-2 são bem conhecidos na técnica.

Fragmentos mais curtos de anticorpos podem também servir como agentes de ligação específicos. Por exemplo, Fab, Fv, e Fv de cadeia simples (scFv) que se ligam a um receptor de IL-2 seriam agentes de ligação específicos do receptor de IL-2.

**Sujeito:** Um humano ou animal não humano. Numa concretização, o sujeito tem esclerose múltipla.

Um sujeito que tenha esclerose múltipla que tenha falhado um protocolo terapêutico (tal como administração de interferão-beta) é um sujeito que não responde ou não responde adequadamente à terapia, de tal forma que a sua condição não melhorou o suficiente, não mudou, ou deteriorou-se em resposta a tratamento com uma quantidade terapêuticamente eficaz do fármaco. Um sujeito que falhou um protocolo terapêutico pode exigir doses crescentes do fármaco para alcançar um efeito desejado.

Num exemplo, a falha de um sujeito com EM em responder a um agente terapêutico, tal como interferão-beta, pode ser medida como uma recorrência de lesões de MRI contrastando com Gd até pelo menos metade da média de um limiar de lesões mensais de contraste ao longo de seis meses. Noutros exemplos, um sujeito com EM que não responde a um agente terapêutico, tal como tratamento com interferão-beta, é identificado por o sujeito experimentar uma ou mais exacerbações num período de 18 meses de terapia de interferão-beta, exibindo um aumento de 1 ponto ou mais na EDSS ao longo de 18 meses de tratamento, ou possuindo persistência ou recorrência de lesões de aumento do contraste em varrimentos de MRI do cérebro até pelo menos metade da média de um limiar de lesões mensais de aumento de contraste estabelecidas ao longo de um período limiar de 6 meses medidas antes do início da terapia de interferão-beta.

Sem estar preso à teoria, um sujeito pode não responder a tratamento de IFN, devido ao desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, embora uma falha de resposta a tratamento de IFN possa também ser detectada na ausência de anticorpos neutralizantes (falha primária). Num exemplo, um sujeito que falha o tratamento com interferão-beta é um sujeito que desenvolve anticorpos neutralizantes que se ligam especificamente a interferão-beta, de modo que são necessárias doses crescentes para ver um efeito, ou para alterar um sinal ou sintoma de EM.



**Sintoma e sinal:** Qualquer evidência subjectiva de doença ou de uma condição do sujeito, ou seja, tal evidência como percebida pelo sujeito; uma mudança notável na condição de um sujeito indicativa de um estado físico ou mental. Um "sinal" é qualquer anomalia indicativa de doença, detectável em exame ou avaliação de um sujeito. Um sinal é geralmente uma indicação objectiva de doença. Sinais incluem, mas não se limitam a quaisquer parâmetros mensuráveis tais como testes para o estado imunológico ou a presença de lesões num sujeito com esclerose múltipla.

**Quantidade terapêuticamente eficaz:** Uma dose suficiente para evitar o avanço, ou causar a regressão da doença, ou que é capaz de reduzir os sintomas causados pela doença, tal como esclerose múltipla.

**Zenapax® (daclizumab):** Um determinado anticorpo monoclonal humanizado recombinante do isotipo IgG1 humano que se liga especificamente a Tac (p55). Os genes recombinantes codificando Zenapax® são um composto de sequências de anticorpo humano (cerca de 90%) e de murídeo (cerca de 10%). O anticorpo dador anti-Tac de murídeo é um anticorpo monoclonal IgG2a que se liga especificamente à proteína IL-2R Tac e inibe respostas biológicas de células linfóides mediadas por IL-2. O anticorpo anti-Tac de murídeo foi "humanizado" através da combinação das regiões determinantes de complementaridade e outros resíduos seleccionados do anticorpo anti-TAC de murídeo com as regiões estruturais e constantes do anticorpo IgG1 humano. O anticorpo anti-Tac humanizado, daclizumab está descrito e a sua sequência é exposta na Patente U.S. No. 5530101, ver SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 7 para as regiões variáveis de cadeia pesada e leve, respectivamente. A Patente U.S. No. 5530101 e Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1029-1033, 1989 são ambas aqui referidas. Daclizumab inibe a proliferação de células T induzida por antigénio dependente de IL-2 e a resposta linfocitária mista (MLR) (Junghans et al., *Cancer Research* 50: 1495-1502, 1990), tal como outros anticorpos de utilização nos métodos aqui divulgados.

Zenapax® foi aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) para a profilaxia de rejeição aguda de

órgãos em sujeitos que receberam transplantes renais, como parte de um regime imunossupressor que inclui ciclosporina e corticosteróides. Foi mostrado que Zenapax® é activo no tratamento de mielopatia/paraparesia espástica tónica associada a vírus linfotrófico de células T humanas de tipo 1 (HAM/TSP, ver Lehky et al., *Ann. Neuro.*, 44: 942-947, 1998). A utilização de Zenapax® para tratar uveíte posterior foi também descrita (ver Nussenblatt et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 7462-7466, 1999).

A menos que explicado de outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que o normalmente entendido por um vulgar perito na técnica à qual pertence esta divulgação. Os termos no singular "um", "uma", e "o", "a" incluem referentes plurais a menos que o contexto claramente indique o contrário. Semelhantemente, a palavra "ou" destina-se a incluir "e" a menos que o contexto claramente indique o contrário. Deve entender-se ainda que todos os tamanhos de bases ou tamanhos de aminoácidos e todos os valores de peso molecular ou massa molecular, dados para ácidos nucleicos ou polipéptidos são aproximados, e são proporcionados para descrição. Embora possam ser utilizados na prática ou testes desta divulgação métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos, são descritos abaixo métodos e materiais adequados. O termo "compreende" significa "inclui". Em caso de conflito, o presente fascículo, incluindo explicações dos termos, prevalecerá. Além disso, os materiais, métodos, e exemplos são apenas ilustrativos e não se pretende que sejam limitantes.

### **Métodos para Tratamento de um Sujeito com Esclerose Múltipla**

Um antagonista do receptor de IL-2 é aqui proporcionado para tratamento de sujeitos que tenham esclerose múltipla. Numa concretização, o sujeito tem esclerose múltipla recidivante-remitente. No entanto, os antagonistas aqui divulgados podem também ser utilizados para o tratamento de sujeitos com outras formas de esclerose múltipla, tais como esclerose múltipla progressiva secundária ou primária.

Em certas concretizações, o antagonista do receptor de IL-2 é utilizado para tratar sujeitos que não tenham respondido adequadamente a tratamento com interferão-beta sozinho. A ausência de resposta ao tratamento com interferão-beta sozinho é, em alguns exemplos, demonstrada por o sujeito experimentar uma ou mais exacerbações num período de terapia de interferão-beta de 18 meses, um aumento de 1 ponto ou mais na EDSS ao longo de 18 meses de tratamento, ou persistência ou recorrência de lesões de aumento de contraste em varrimentos de MRI do cérebro até pelo menos metade da média de um limiar de lesões mensais de aumento de contraste estabelecido ao longo de um período limiar de 6 meses medido antes do início da terapia com interferão-beta. Outros indicadores de progressão ou actividade de doença conhecidos dos peritos na técnica podem também ser usados para determinar se um sujeito não respondeu a terapia com interferão-beta. A terapia com interferão-beta pode ser tratamento com interferão-beta 1b, interferão-beta 1a, ou ambos os tipos de interferão.

Numa concretização específica, a quantidade terapêuticamente eficaz de um antagonista do receptor de IL-2 (IL-2R) é administrada ao sujeito sem a administração concomitante de interferão-beta. Pode ser utilizado um único antagonista de IL-2R, ou pode ser utilizada uma combinação de antagonistas de IL-2R no tratamento de esclerose múltipla. O antagonista de IL-2R é um agente que se liga ao IL-2R em linfócitos T activados e inibe a actividade do receptor.

O antagonista do receptor de IL-2 é um anticorpo, tal como um anticorpo monoclonal, p. ex., um anticorpo monoclonal quimérico, humanizado ou humano. Um exemplo específico de um anticorpo monoclonal humanizado que se liga especificamente a p55 é daclizumab, que é descrito e a sua sequência é exposta na Patente U.S. No. 5530101, e em Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:1029-1033, 1989. Assim, o anticorpo pode ser uma imunoglobulina humanizada possuindo regiões determinantes de complementaridade (CDR) de uma imunoglobulina dadora e estruturas de região variável de cadeia pesada e leve de estruturas de cadeia pesada e leve de uma imunoglobulina humana aceitadora, em que a imunoglobulina humanizada se liga especificamente a um receptor humano de interleucina-2 com

uma constante de afinidade de pelo menos  $10^8 \text{ M}^{-1}$ . A sequência da estrutura da região variável de cadeia pesada da imunoglobulina humanizada pode ser pelo menos 65% idêntica à sequência da estrutura da região variável de cadeia pesada da imunoglobulina dadora. Um exemplo específico da região variável do anticorpo anti-Tac é exposto como SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 3 da Patente U.S. No. 5520101 (cadeia leve e pesada, respectivamente), e a região variável do anticorpo anti-Tac humanizado, daclizumab é exposta como SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 7 (cadeia pesada e leve, respectivamente) da Patente U.S. No. 5530101.

O anticorpo pode incluir dois dímeros de cadeia leve/cadeia pesada, e liga-se especificamente a p55 (tal como o anticorpo anti-Tac) ou p75. Antagonistas de IL-2R úteis incluem agentes que se ligam especificamente a p55 (também conhecida como a cadeia alfa ou a subunidade Tac) do IL-2R humano. Num exemplo, o agente é um anticorpo monoclonal, tal como daclizumab, basiliximab, BT563, e 7G8 ou as suas formas quiméricas ou humanizadas. O agente pode também ser um anticorpo humano, ou um anticorpo humanizado com CDR sintéticas que se liga especificamente a p55. Os anticorpos que se ligam ao mesmo epitopo (ou que se sobrepõem) que daclizumab ou basiliximab podem também ser utilizados nos métodos aqui divulgados. Noutras concretizações, o anticorpo terá elevada identidade de sequência com daclizumab ou basiliximab, pelo menos 90 ou 95%, tal como pelo menos uma identidade de sequência de 98% ou 99%, embora mantendo as propriedades funcionais do anticorpo, isto é, as suas propriedades antagonistas para o IL-2R. O anticorpo pode ser de qualquer isotipo, mas em várias concretizações esse anticorpo é uma IgG, incluindo mas não se limitando a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Noutras concretizações, o anticorpo é basilimab, comercializado como Simulect® por Novartis Pharma AG. Simulect® é um anticorpo monoclonal quimérico (de murídeo/humano) (IgG<sub>1</sub>), produzido através de tecnologia de ADN recombinante, que funciona como um agente imunossupressor, que se liga especificamente e bloqueia a cadeia alfa de IL-2R à superfície de linfócitos T activados. Simulect® é uma glicoproteína obtida a partir da fermentação

de uma linha celular de mieloma de ratinho estabelecida geneticamente modificada para expressar plasmídeos contendo os genes de região constante de cadeia pesada e leve humanos e genes de região variável de cadeia pesada e leve de ratinho codificando o anticorpo RFT5 que se liga selectivamente a IL-2R (alfa). Com base na sequência de aminoácidos, o peso molecular calculado da proteína é de 144 quilodaltons.

Também descrevemos que o antagonista de IL-2R é uma molécula que se liga a outras subunidades do receptor de IL-2, tais como Mik- 1 ou Mik- 2 ou as suas ~~versões~~ quimérica ou humanizada, que se ligam à cadeia beta do IL-2R humano, ou outro anticorpo que se ligue especificamente a p75 (ver Patente U.S. No. 5530101). O antagonista de IL-2R pode também ser um fragmento de um anticorpo (p. ex., um anticorpo quimérico, humanizado, ou humano) tal como um Fab, (Fab')<sub>2</sub>, Fv, ou scFv. Mais, o fragmento pode ser peguado para aumentar a sua semivida.

Nalguns exemplos, o antagonista de IL-2R é uma combinação de agentes anti-IL-2R. Por exemplo, Zenapax® e Simulect® são administrados em conjunto como uma mistura ou os agentes são alternados no esquema de administração.

O antagonista de IL-2R, tal como um anticorpo humanizado que se liga especificamente ao IL-2R, pode ser utilizado em combinação com outros anticorpos, particularmente anticorpos monoclonais humanos reactivos com outros marcadores em células responsáveis por uma doença. Por exemplo, marcadores de células T adequados podem incluir aqueles agrupados nos chamados "Grupos de Diferenciação", (antigénios CD, ver "First International Leukocyte Differentiation Workshop, Leukocyte Typing", Bernard et al., Eds., Springer-Verlag, N.Y., 1984). Noutro exemplo, o outro anticorpo liga-se e inibe uma linfocina, tal como IFN-gama, ou um receptor de linfocina. Num exemplo, o outro anticorpo liga-se à integrina 5 1 (VLA-5), da qual um anticorpo exemplar particularmente preferido é Antegren® (Elan Pharmaceuticals e Biogen, Inc.).

O antagonista de IL-2R pode ser administrado por via parentérica, isto é, por via subcutânea, intramuscular ou intravenosa ou por meio de um dispositivo de injeção sem

agulha. As composições para administração parentérica incluirão geralmente uma solução do antagonista de IL-2R (p. ex., o anticorpo) num transportador farmacêuticamente aceitável, tal como descrito acima. A concentração de anticorpo nas formulações pode variar amplamente, i.e., de menos de cerca de 0,5%, normalmente a ou pelo menos cerca de 1% até tanto como 15 ou 20% em peso ou de 1 mg/ml a 100 mg/ml. A concentração é seleccionada principalmente com base em volumes dos líquidos, viscosidades, etc., de acordo com o modo de administração particular seleccionado.

Métodos para preparação de composições farmacêuticas são conhecidos dos peritos na técnica (ver "Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980).

Anticorpos úteis nos métodos aqui divulgados podem ser congelados ou liofilizados para armazenamento e reconstituídos num transportador adequado antes da utilização. Um perito na técnica pode facilmente conceber técnicas apropriadas de liofilização e reconstituição.

O antagonista de IL-2R pode ser administrado para tratamentos terapêuticos de um sujeito com esclerose múltipla. Assim, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição é administrada a um indivíduo sofrendo já de EM, numa quantidade suficiente para melhorar um sinal ou um sintoma do distúrbio. Geralmente, uma dose adequada de Zenapax® (daclizumab) é de cerca de 0,5 miligramas por quilograma (mg/kg) a cerca de 3 mg/kg, tal como uma dose de cerca de 1 mg/kg, cerca de 1,5 mg/kg, cerca de 2 mg/kg, ou cerca de 2,5 mg/kg administrada por via intravenosa ou subcutânea. Formas de dosagem unitárias são também possíveis, por exemplo 50 mg, 100 mg, 150 mg ou 200 mg, ou até 400 mg por dose. No entanto, outras dosagens mais elevadas ou inferiores podem também ser utilizadas, tais como de cerca de 0,5 a cerca de 8 mg/kg. Foi sugerido que níveis séricos de 5 a 10 g/ml são necessários para saturação da subunidade Tac dos receptores de IL-2 para bloquear as respostas de linfócitos T activados. Um perito na técnica será capaz de construir um regime de administração para manter os níveis séricos dentro desse intervalo, embora possa ser usada uma

administração resultando em níveis séricos mais elevados ou mais baixos. É provável que as doses de Simulect® sejam inferiores, por exemplo de 0,25 mg/kg a 1 mg/kg, p. ex., 0,5 mg/kg, ou doses unitárias de 10, 20, 40, 50 ou 100 mg. O princípio geral de manter o IL-2R saturado pode ser também utilizado para orientar a escolha dos níveis de dose de outros antagonistas de IL-2R tais como outros anticorpos monoclonais.

Administrações únicas ou múltiplas das composições de antagonista de IL-2R podem ser realizadas com os níveis de dose e os padrões sendo seleccionados pelo médico assistente. Geralmente, são administradas doses múltiplas. Em vários exemplos, são utilizadas múltiplas administrações de Zenapax® (daclizumab) ou outros anticorpos de IL-2R, tal como administração mensal, bimensal, a cada 6 semanas, a cada duas semanas, semanalmente ou duas vezes por semana. Um protocolo exemplar para administração de Zenapax® (daclizumab), também aplicável a outros anticorpos de IL-2R, é descrito na secção de exemplos abaixo.

O antagonista de IL-2R é administrado sem administração concomitante de um interferão-beta, tal como interferão-beta 1a ou interferão-beta 1b. Num exemplo específico, não limitante, Zenapax® (daclizumab) é administrado sem administração concomitante de um interferão-beta, tal como interferão-beta-1<sup>a</sup> ou interferão-beta-1b. Noutro exemplo específico, não limitante, Zenapax® (daclizumab) é administrado sem a administração concomitante de outros agentes farmacêuticos adicionais para tratar esclerose múltipla, tais como outros agentes imunossuppressores.

O antagonista de IL-2R pode também ser utilizado em combinação com um ou mais outros fármacos que podem ser activos em tratamento de esclerose múltipla. Estes incluem, mas não se limitam a, Copaxone®, corticosteróides tais como prednisona ou metilprednisolona; agentes imunossuppressores, tais como ciclosporina (ou outros inibidores da calcineurina, tais como Prograf®), azatioprina, Rapamune® e Cellcept®; anti-metabolitos tais como metotrexato; e agentes antineoplásicos, tais como mitoxantrona.

O tratamento com o antagonista de IL-2R, sozinho ou em combinação com outros agentes, reduzirá em média o número de lesões em MRI com aumento de gadolínio em pelo menos 30%. Numa concretização, as lesões de aumento de gadolínio em MRI são reduzidas em pelo menos cerca de 50% ou em pelo menos cerca de 70%, tal como uma redução de cerca de 80%, cerca de 90%, ou em mais de 95%, em comparação com medições limiares para os mesmos sujeitos ou com medição em sujeitos de controlo (p. ex. sujeitos não recebendo o antagonista de IL-2R). Semelhantemente, o tratamento com o antagonista de IL-2R, sozinho ou em combinação com outros agentes, reduzirá o número médio de exacerbações de EM por sujeito num dado período (p. ex., 6, 12, 18 ou 24 meses) em pelo menos cerca de 25%, tal como pelo menos cerca de 40% ou pelo menos cerca de 50%. Numa concretização, o número de exacerbações de EM é reduzido em pelo menos cerca de 80%, tal como pelo menos cerca de 90%, em comparação com sujeitos de controlo. Os sujeitos de controlo podem ser sujeitos não tratados ou sujeitos não recebendo o antagonista de IL-2R (p. ex., sujeitos recebendo outros agentes). O tratamento com o antagonista de IL-2R, sozinho ou em combinação com outros agentes, pode também reduzir a taxa média de aumento da pontuação de incapacidade do sujeito durante um certo período (p. ex., 6, 12, 18 ou 24 meses), p. ex., tal como medido através da pontuação de EDSS, em pelo menos cerca de 10% ou cerca de 20%, tal como em pelo menos cerca de 30%, 40% ou 50%. Numa concretização, a redução na taxa média de aumento na pontuação ESS é pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 75%, ou pelo menos cerca de 90%, ou pode mesmo conduzir a uma melhoria real na pontuação de incapacidade, em comparação com sujeitos de controlo, tal como sujeitos não tratados ou sujeitos não recebendo o antagonista de IL-2R mas recebendo possivelmente outros agentes. Estes benefícios podem ser demonstrados em um ou mais ensaios clínicos aleatórios, controlados com placebo, duplamente cegos, de Fase II ou III e serão estatisticamente significativos (p. ex.,  $p < 0,05$ ).

A presente divulgação é ilustrada pelos seguintes Exemplos não limitantes.



## EXEMPLOS

### Exemplo 1

#### **Protocolo para a Utilização de um Anticorpo de IL-2R Humanizado (Zenapax®) para Tratar Esclerose Múltipla**

##### *A. Objectivos*

Foi conduzido um estudo para determinar a eficácia da terapia de Zenapax® em sujeitos com esclerose múltipla que falharam a terapia padrão de IFN- $\gamma$  comparando o número médio de lesões de aumento de Gd durante o período pré-tratamento com o do período de tratamento. Neste estudo foi também demonstrada a segurança e tolerabilidade de Zenapax® em sujeitos com esclerose múltipla utilizando medidas clínicas, de MRI, e imunológicas.

Para avaliar a eficácia da terapia de Zenapax® em sujeitos com esclerose múltipla que falharam a terapia de IFN- $\gamma$  padrão foram utilizadas as seguintes medições:

1. Medidas de MRI
  - Carga de lesões a T2,
  - Volume de lesões de aumento de Gd,
  - Volume de hipo-intensidades a T1 (opcional);
2. Medidas clínicas, especificamente,
  - Alteração em EDSS, alteração em SRS (Escala de Pontuação Neurológica de Scripps)
  - Taxa de recidiva; teste de 9 buracos e pinos
3. Medidas imunológicas, especificamente,
  - Marcadores das linhagens de células T, Th1 e Th2 T, bem como análise FACS de vários marcadores de células T,
  - Produção de citocinas por células T *in vitro*,
  - Proliferação de células T

Para fins do estudo, a falha em responder a terapia padrão de IFN- $\gamma$  foi definida como uma recorrência de lesões de contraste de Gd em MRI até pelo menos metade da média do limiar lesões de contraste de Gd mensais ao longo de 6 meses antes do início do tratamento de IFN ou incapacidade de resposta primária a tratamento de IFN ou da presença de

recidivas clínicas durante pelo menos 12 meses. Os sujeitos testados foram não respondedores primários a IFN- $\gamma$ , i.e., na ausência de anticorpos neutralizantes contra IFN- $\gamma$ , ou não respondedores secundários, i.e., na presença de anticorpos neutralizantes.

#### *B. Esquema do Estudo*

Os sujeitos foram recrutados após a conclusão de todos os procedimentos pré-triagem (Semana -8) desde que a falha à terapia de IFN- $\gamma$  padrão estivesse documentada. Após recrutamento, os sujeitos foram submetidos a três MRI de Gd aumentado a intervalos de 4 semanas antes da primeira dose do fármaco de estudo. Os sujeitos com pelo menos 2 lesões de aumento de Gd ou mais nos 3 varrimentos de MRI pré-tratamento (uma média de pelo menos 0,67 lesões de aumento de Gd por varrimento) eram elegíveis para prosseguir para a fase de tratamento do estudo. Durante a fase de tratamento, os sujeitos receberam sete infusões IV de 1 mg/kg de peso corporal de anti-subunidade alfa do receptor da interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ; Zenapax, dia 0, semana 2, semana 6, semana 10, semana 14, semana 18 e semana 22; total de 7 doses) durante 5,5 meses = 22 semanas, e continuaram a ser submetidos a MRI de aumento de Gd a intervalos de 4 semanas. Após a última dose do fármaco de estudo, os sujeitos foram monitorizados durante 12 semanas. Alguns sujeitos continuaram a receber terapia de IFN- $\gamma$  padrão através do ensaio, enquanto a terapia de IFN- $\gamma$  foi descontinuada nalguns sujeitos.

#### *B. 1 Critérios de Inclusão e Exclusão para Triagem Pré-Tratamento*

Os candidatos para o estudo satisfizeram os seguintes critérios no momento do recrutamento (Tabela 1):

**Tabela 1****CrITÉRIOS de Inclusão**

- |   |
|---|
| <p>1) Entre as idades de 18 e 65 anos, inclusive.</p> <p>2) Sujeitos com EM recidivante-remitente ou progressiva secundária que tiveram <b>mais de um</b> relapso dentro de 18 meses antes do recrutamento para o estudo. Os sujeitos tinham pelo menos 2 lesões de aumento de Gd ou mais nos 3 varrimentos de MRI pré-tratamento (uma média de pelo menos 0,67 lesões de aumento de Gd por varrimento).</p> <p>3) Pontuação de EDSS entre 1 - 6,5, inclusive.</p> <p>- Os sujeitos que falharam a terapia de IFN- <del>padrão</del>. As falhas no tratamento de IFN- foram especificadas como se seg: Os indivíduos que tinham recebido tratamento de IFN durante pelo menos 6-12 meses e tinham tido mais do que uma exacerbação durante o ano anterior que requereu tratamento por esteróides intravenosos. Os sujeitos actualmente recrutados num protocolo para a administração de ambos Zenapax® e IFN- foram elegíveis para passagem para uma fase de aumento da dose ou a fase de terapia simples de Zenapax® após 5,5 meses de terapia. Os sujeitos que tiveram uma diminuição de 75% ou mais na actividade das lesões foram elegíveis para a fase de dose simples de Zenapax®, enquanto os sujeitos que não alcançaram pelo menos uma redução de 75% na actividade das lesões foram elegíveis para a fase de aumento da dose.</p> |
|---|

Os candidatos foram excluídos de entrada no estudo se existisse qualquer um dos critérios de exclusão no momento do recrutamento (Tabela 2):

**Tabela 2****CrITÉRIOS de ExclusÃO***História Médica*

1) Diagnóstico de EM progressiva primária, definida como progressão gradual de incapacidade desde o aparecimento sem recidivas.

2) Testes de pesquisa/pré-tratamento anormais excedendo qualquer um dos limites definidos abaixo:

- Alanina-transaminase (ALT) ou aspartato-transaminase (AST) > duas vezes o limite superior do normal (i.e., >2×ULN)
- Contagem de glóbulos brancos totais <3000/mm<sup>3</sup>
- Contagem de CD4<sup>+</sup> <320/mm<sup>3</sup>
- Contagem de plaquetas <80000/mm<sup>3</sup>
- Creatinina >2,0 mg/dl

3) Doença cardíaca, imunológica, pulmonar, neurológica, renal, e/ou outra principal concomitante, *cl clinicamente significativa* (tal como determinado pelo investigador).

4) Qualquer contra-indicação para terapias de anticorpos monoclonais.

5) Sujeitos que eram HIV+.

*História de Tratamento*

5) Se tinha sido recebido tratamento anterior, o sujeito era retirado do tratamento durante o período necessário para recrutamento (ver inserção).

**Restrições a Tratamentos**

Agente	Tempo Necessário fora do Agente Antes do Recrutamento
Acetato de glatirâmero (Copaxone®), ciclofosfamida (Cytosan®)	26 semanas
Ig IV, azatioprina (Imuran®), metotrexato, mudança de plasma, ciclosporina, mielina oral, cladribina, mitoxantrona	12 semanas
Corticosteróides, ACTH	8 semanas

6) Tratamento prévio com qualquer outro fármaco de investigação ou procedimento para EM.

7) História de abuso de álcool ou de drogas dentro dos cinco anos anteriores ao recrutamento.

8) Sujeitos do sexo masculino e feminino não praticando contracepção adequada.

9) Sujeitos do sexo feminino que não estejam em pós-menopausa ou cirurgicamente estéreis que não estejam a utilizar um método aceitável de contracepção. A aceitabilidade dos diversos métodos de contracepção estará à discricção do investigador. Documentação escrita de que o sujeito está em pós-menopausa ou cirurgicamente estéril deve estar disponível antes do início do estudo.

10) Falta de vontade ou incapacidade para cumprir os requisitos deste protocolo incluindo a presença de qualquer condição (física, mental ou social) que possa afectar a volta do sujeito para visitas de seguimento programadas.

11) Participação prévia neste estudo.

12) Sujeitos a amamentar.

Uma coorte de sujeitos que entraram no protocolo descrito que não conseguiram mostrar uma redução de pelo menos 75% na frequência de lesões a interferão e Zenapax® teve a dose de Zenapax® aumentada para 2 mg/kg para avaliar se esta dose de Zenapax® é segura e bem tolerada.

### *B.2 Agente de Tratamento e Infusão*

Os sujeitos recrutados no estudo receberam Zenapax® em momentos designados. A formulação anti-Tac contém 5 mg/ml de Zenapax® e 0,2 mg/ml de Polissorbato-80 em tampão fosfato 67 mM, pH ajustado a 6,9. A formulação foi embalada num volume de 5 ml de tamanho apropriado em frascos de vidro de sílex. O agente foi armazenado a 2-8°C ao abrigo da luz. A quantidade apropriada de solução de anticorpo a 5 mg/ml foi diluída com 50 ml de solução salina normal num mini-saco. O anticorpo diluído foi armazenado durante 24 horas a 2-8°C antes da administração. A terapia foi administrada por via intravenosa a uma dose de 1 mg de Zenapax® por kg, como uma infusão intravenosa de 15 minutos. No final da infusão, a linha foi lavada com 10 ml de solução salina. O tempo das administrações e os sinais dos frascos foram registados na folha de infusões. Os sinais vitais foram tomados e registados pré-infusão, imediatamente após a infusão, e 15 minutos após a infusão estar concluída. A dose máxima do fármaco do estudo foi de 20 ml, o que é o equivalente a 200 mg de anticorpo.

Os frascos de Zenapax® foram ventilados antes da remoção do conteúdo. Uma agulha de purga, ou uma agulha de 20-22 G ligada a uma seringa (sem o êmbolo) foi, nalguns casos, inserida nos frascos. O ar não foi injectado no espaço superior dos frascos nem na solução. Após ventilação, o conteúdo foi retirado de cada um dos frascos para uma seringa

(com uma agulha de 20-22 G) suficientemente grande para conter a dose total calculada de Zenapax®.

Foi utilizada uma seringa e uma agulha para remover um volume de solução salina equivalente à dose calculada de Zenapax® (mais qualquer excesso) a partir de um recipiente de 150 ml de água estéril, embora alternativamente possa ser utilizada solução salina normal (NaCl a 0,9% USP). O conteúdo da seringa contendo Zenapax® foi injectado no recipiente. O conteúdo foi misturado abanando gentilmente o recipiente durante cerca de 20 segundos, de modo a que o produto reconstituído ficasse pronto para infusão. A solução de Zenapax® diluída foi armazenada à temperatura ambiente. A solução diluída foi completamente infundida dentro de 4 horas após a diluição.

Foi seguida a prática clínica padrão para assegurar a esterilidade do material de infusão. Zenapax® foi administrado através de uma linha intravenosa dedicada a uma velocidade constante ao longo de 15 minutos e foi seguido por uma lavagem com solução salina normal. Para controlar a velocidade, foi utilizada uma bomba de infusão. O volume da lavagem de solução salina não foi inferior à do volume residual da solução retida no tubo de IV. Foi utilizado um tubo novo para cada infusão.

Os sujeitos foram obrigados a receber a sua infusão em 7 dias de compromissos agendados. Os sujeitos foram examinados em cada visita do estudo antes do início da infusão. Todos os sujeitos utilizaram métodos de controlo de natalidade aceites durante seis meses após a conclusão do tratamento, e os sujeitos do sexo feminino não estavam grávidos.

Zenapax® foi administrado como uma infusão IV de 15 minutos a 1 mg/kg (com base no peso corporal ideal) no dia 0, semana 2, semana 6, semana 10, semana 14, semana 18 e semana 22, total de 7 doses) durante 5,5 meses = 22 semanas após todos os outros procedimentos necessários em cada visita estarem realizados. Os MRI ocorreram dentro de 7 dias antes da administração do fármaco do estudo. Nalguns sujeitos, duas infusões adicionais a intervalos de 6 semanas foram dadas nas semanas 28 e 34.

### *C. Programa de tratamento, incluindo testes e avaliações*

O tamanho da amostra para o estudo inicial aqui divulgado, 10 sujeitos tratados, foi escolhido de acordo com vasta experiência durante estudos da história natural da EM, um estudo de MRI de IFN- 1b e a avaliação estatística destes dados.

Os testes foram realizados de acordo com o esquema mostrado na Tabela 3.

**Tabela 3**

#### **Programa dos Testes e Avaliação**

##### 1. Semana -8 (Visita de Rastreio)

A menos que indicado em contrário, os testes e as avaliações foram efetuados dentro de 7 dias antes do primeiro MRI do sujeito para determinar a elegibilidade do sujeito:

- Uma história médica completa.
- Estado vacinal.
- Um exame físico completo, incluindo medição dos sinais vitais e do peso corporal.
- Radiografia do tórax.
- ECG
- Análise química sanguínea.
- Hematologia: hemograma com contagem diferencial e de plaquetas.
- Contagem de CD4<sup>+</sup>.
- Medidas imunológicas.
- Teste de gravidez na urina para mulheres em idade fértil.
- Testes para anticorpos para Zenapax® (soro armazenado até à análise).
- Teste EDSS/SRS/9 buracos e pinos
- MRI (realizada após todos os outros procedimentos de pesquisa estarem concluídos).
- Teste cutâneo com vários antígenos de recordação; alternativamente, realizado na semana -4
- Soro para determinação de níveis séricos de anti-IL-2Ra (armazenado até à análise)
- Estado de HIV-I

##### 2. Semana -4

- Sinais vitais.
- Medidas imunológicas.
- Teste de gravidez na urina para mulheres em idade fértil.
- Teste EDSS/SRS/9 buracos e pinos
- MRI
- Título de rubéola, título de EBNA (padrão).

### 3. Entre as Semanas -4 e 0

- Punção lombar opcional.
- Linfocitofereze

### 4. Semana 0

- Sinais vitais.
- Contagem de linfócitos totais (os resultados estavam disponíveis antes da administração).
- Análise química sanguínea.
- Hematologia: hemograma com contagem diferencial e de plaquetas.
- Contagem de CD4<sup>+</sup>.
- Teste de gravidez na urina para mulheres em idade fértil.
- Teste de EDSS/SRS/9 buracos e pinos.
- MRI.
- Medidas imunológicas.
- Teste para anticorpos para Zenapax® (soro armazenado até à análise).
- Soro para determinação de níveis séricos de anti-IL-2R (armazenado até à análise).

O sujeito recebeu a primeira dose do fármaco do estudo.

### 5. Semana 2

- Sinais vitais.
- Contagem de linfócitos totais (os resultados estavam disponíveis antes da administração).
- Análise química sanguínea.
- Hematologia: hemograma com contagem diferencial e de plaquetas.
- Contagem de CD4<sup>+</sup>.
- Medidas imunológicas.
- Teste de gravidez na urina para mulheres em idade fértil.
- Teste de EDSS/SRS/9 buracos e pinos.
- MRI.
- Infusão de Zenapax®
- Teste para anticorpos para Zenapax® (soro armazenado até à análise).
- Soro para determinação de níveis séricos de anti-IL-2R (armazenado até à análise)

### 6. Semana 4

- Sinais vitais
- EDSS
- MRI
- Teste para anticorpos para Zenapax® (soro armazenado até à análise).
- Soro para determinação de níveis séricos de anti-IL-2R (armazenado até à análise)

### 7. Semana 6

- Sinais vitais.
- Contagem de linfócitos totais (os resultados estavam disponíveis antes da administração).
- Análise química sanguínea.
- Hematologia: hemograma com contagem diferencial e de plaquetas.
- Contagem de CD4<sup>+</sup>.
- Medidas imunológicas.
- Teste de gravidez na urina para mulheres em idade fértil.
- Teste de EDSS/SRS/9 buracos e pinos.
- MRI.
- Infusão de Zenapax®.
- Teste para anticorpos para Zenapax® (soro armazenado até à análise).
- Soro para determinação de níveis séricos de anti-IL-2R (armazenado até à análise)



## 8. Semana 10

- Sinais vitais.
- Contagem de linfócitos totais (os resultados estavam disponíveis antes da administração).
- Análise química sanguínea.
- Hematologia: hemograma com contagem diferencial e de plaquetas.
- Contagem de CD4<sup>+</sup>.
- Medidas imunológicas.
- Teste de gravidez na urina para mulheres em idade fértil.
- Teste para anticorpos para Zenapax®
- Teste de EDSS/SRS/9 buracos e pinos.
- MRI.
- Infusão de Zenapax®.
- Teste para anticorpos para Zenapax® (o soro será armazenado até à análise).
- Soro para determinação de níveis séricos de anti-IL-2R (armazenado até à análise)

## 9. Semana 14

- Sinais vitais.
- Contagem de linfócitos totais (tirados de modo a que os resultados estivessem disponíveis antes da administração).
- Análise química sanguínea.
- Hematologia: hemograma com contagem diferencial e de plaquetas.
- Contagem de CD4<sup>+</sup>.
- Medidas imunológicas.
- Teste de gravidez na urina para mulheres em idade fértil.
- Teste de EDSS/SRS/9 buracos e pinos.
- MRI.
- Infusão de Zenapax®.
- Teste para anticorpos para Zenapax® (soro armazenado até à análise).
- Soro para determinação de níveis séricos de anti-IL-2R (armazenado até à análise)

## 10. Semana 18

- Sinais vitais.
- Contagem de linfócitos totais (os resultados estavam disponíveis antes da administração).
- Análise química sanguínea.
- Hematologia: hemograma com contagem diferencial e de plaquetas.
- Contagem de CD4<sup>+</sup>.
- Medidas imunológicas.
- Teste de gravidez na urina para mulheres em idade fértil.
- Teste de EDSS/SRS/9 buracos e pinos.
- MRI.
- Infusão de Zenapax®.
- Teste para anticorpos para Zenapax® (soro armazenado até à análise).
- Soro para determinação de níveis séricos de anti-IL-2R (armazenado até à análise)

## 11. Semana 22

- Sinais vitais.
- Contagem de linfócitos totais (os resultados estavam disponíveis antes da administração).
- Análise química sanguínea.
- Hematologia: hemograma com contagem diferencial e de plaquetas.

- Contagem de CD4<sup>+</sup>.
  - Medidas imunológicas.
  - Teste de gravidez na urina para mulheres em idade fértil.
  - Teste de EDSS/SRS/9 buracos e pinos.
  - MRI.
  - Infusão de Zenapax®.
  - Teste cutâneo com múltiplos antigénios (ver Apêndice I)
  - Teste para anticorpos para Zenapax® (soro armazenado até à análise).
  - Soro para determinação de níveis séricos de anti-IL-2R (armazenado até à análise)
12. Semana 26
- Sinais vitais.
  - Análise química sanguínea.
  - Hematologia: hemograma com contagem diferencial e de plaquetas.
  - Contagem de CD4<sup>+</sup>.
  - Teste de gravidez na urina para mulheres em idade fértil.
  - Teste de EDSS/SRS/9 buracos e pinos.
  - MRI.
  - Medidas imunológicas.
  - Teste para anticorpos para Zenapax® (soro armazenado até à análise).
  - Soro para determinação de níveis séricos de anti-IL-2R (armazenado até à análise)
  - Punção lombar opcional.
  - Linfocitofereze.
13. Entre as Semanas 30 e 34
- Medidas imunológicas
  - Outros (radiografia ao tórax, ECG)
  - Teste de EDSS/SRS/9 buracos e pinos.
  - MRI
  - Título de rubéola/título de EBNA (padrão).
  - Teste para anticorpos para Zenapax® (soro armazenado até à análise).
  - Soro para determinação de níveis séricos de anti-IL-2R (armazenado até à análise)

Tal como indicado acima, alguns sujeitos receberam mais duas ou mais infusões de Zenapax® nas semanas 28 e 34 e depois o mesmo seguimento pós-tratamento (ver Tabela 3, #12 e #13).

## **Exemplo 2**

### **Medidas dos Resultados: Análise de Dados**

Para além dos testes e avaliações listados na Tabela 3, as seguintes avaliações de eficácia clínica foram realizadas durante o estudo:

1. Teste de EDSS/SRS/9 buracos e pinos - medidas de incapacidade
2. Número de recidivas. As recidivas são definidas como sintomas neurológicos novos ou recorrentes, não associados a

febre ou infecção, durando pelo menos 48 horas e acompanhados por descobertas neurológicas objectivas após exame.

A segurança clínica foi avaliada através do estado neurológico, exame físico geral, medição dos sinais vitais (temperatura, frequência cardíaca e pressão arterial). Os eventos adversos foram recolhidos ao longo do estudo.

Foram também realizadas durante o estudo as seguintes avaliações de eficácia laboratoriais:

1. MRI do cérebro com e sem aumento de gadolínio; parâmetros de MRI adicionais
2. Medidas imunológicas.

Os parâmetros laboratoriais específicos avaliados neste estudo foram os seguintes:

1. Actividade de MRI como monitorizada pelos médicos
2. Química sanguínea: creatinina, bilirrubina total, ALT, AST, fosfatase alcalina e albumina. Anticorpos anti-rubéola, EBV e EBNA.
3. Hematologia: hemograma completo com contagem diferencial e de plaquetas.

As avaliações de segurança foram como se segue:

1. A análise de subconjuntos de CD4<sup>+</sup> periféricos foi efectuada utilizando citometria de fluxo com marcadores de subconjunto bem definidos para linfócitos T.

2. Recolha de 4 ml de sangue inteiro (para obter 2 ml de soro) para determinação da formação de anticorpos para Zenapax®.

3. A segurança em termos de influência de Zenapax® na actividade de doença inflamatória do SNC foi documentada e seguida através de MRI. Um aumento inesperado e potencialmente de alerta na actividade de MRI foi definido como um aumento superior a um aumento de 3 vezes em sujeitos com cargas médias de lesões de Gd pré-tratamento de <10 lesões/mês. Em sujeitos com cargas médias de lesões de Gd pré-tratamento <3 lesões/mês, um aumento > dez vezes levantou preocupações de segurança. Se se desenvolvesse uma única nova lesão com >5 cm em qualquer diâmetro, isto era considerado como um sinal de toxicidade.

Não surgiram preocupações quanto a eventos adversos relacionados com Zenapax® durante o curso destes estudos.

O estudo aqui divulgado demonstrou a eficácia da terapia de Zenapax® em sujeitos com esclerose múltipla, através da comparação do número médio de lesões de Gd durante o período pré-tratamento com o do período de tratamento. O *ponto final primário de eficácia* é o número de lesões de aumento de Gd.

As análises no ponto final primário incluíram o seguinte:

- comparação do número médio de lesões durante o período pré-tratamento (Semanas -8, -4, 0) com o número médio de lesões durante o período de tratamento (Semanas 0 a 22)
- comparação do número médio de lesões durante o período pré-tratamento (Semanas -8, -4, 0) com o número médio de lesões durante as últimas 12 semanas do período de tratamento (Semanas 10-22).

Estas comparações foram feitas utilizando um teste t emparelhado ou o teste não paramétrico de Wilcoxon, dependendo da distribuição dos dados. As médias foram baseadas em avaliações que não estivessem em falta.

Este estudo demonstra também a eficácia da terapia de Zenapax® em sujeitos com esclerose múltipla utilizando as seguintes medidas:

1. Medidas de MRI
  - Carga de lesões a T2,
  - Volume de lesões de aumento de Gd,
  - Volume de hipo-intensidades a T1 (opcional);
2. Medidas clínicas, especificamente,
  - Alteração no teste EDSS/SRS/9 buracos e pinos
  - Taxa de recidivas;
3. Medidas imunológicas, especificamente,
  - Marcadores de linhagens de células T, Th1 e Th2, bem como análise FACS de vários marcadores do subconjunto de células T, células B e monócitos,
  - Produção de citocinas por células T *in vitro*

### *Carga de lesões a T2*

As análises sobre a carga de lesões a T2 incluíram o seguinte:

- comparação do volume médio de lesões a T2 durante o período pré-tratamento (Semanas -8, -4, 0) com o volume médio de lesões a T2 durante o período de tratamento (Semanas 0-22)
- comparação do volume médio de lesões a T2 durante o período pré-tratamento (Semanas -8, -4, 0) com o volume médio de lesões a T2 durante as últimas 12 semanas do período de tratamento (Semanas 10-22)

Estas comparações foram realizadas utilizando um teste t emparelhado ou o teste não paramétrico de Wilcoxon, dependendo da distribuição dos dados. As médias basearam-se em avaliações que não estavam em falta.

### *Volume das Lesões de aumento de Gd*

As análises sobre o volume de lesões de aumento de Gd incluíram o seguinte:

- comparação do volume médio de lesões de aumento de Gd durante o período pré-tratamento (Semanas -8, -4, 0) com o volume médio de lesões de aumento de Gd durante o período de tratamento (Semanas 0-22)
- comparação do volume médio de lesões de aumento de Gd durante o período pré-tratamento (Semanas -8, -4, 0) com o volume médio de lesões de aumento de Gd durante as últimas 12 semanas do período de tratamento (Semanas 10-22)

Estas comparações foram realizadas utilizando um teste t emparelhado ou o teste não paramétrico de Wilcoxon, dependendo da distribuição dos dados. As médias basearam-se em avaliações que não estavam em falta.

### *Volume de Hipo-intensidades a T1*

A análise sobre o volume de hipo-intensidades a T1 incluíram o seguinte:

- comparação do volume médio de hipo-intensidades a T1 durante o período pré-tratamento (Semanas -8, -4, 0) com o

volume médio de hipo-intensidades a T1 durante o período de tratamento (Semanas 0-22)

- comparação do volume médio de hipo-intensidades a T1 durante o período pré-tratamento (Semanas -8, -4, 0) com o volume médio das hipo-intensidades a T1 durante as últimas 12 semanas do período de tratamento (Semanas 10-22)

Estas comparações foram realizadas utilizando um teste t emparelhado ou o teste não paramétrico de Wilcoxon, dependendo da distribuição dos dados. As médias basearam-se em avaliações que não estavam em falta.

#### *EDSS*

Foi determinada a alteração da EDSS limiar (Semana 0) para a Semana 22 e Semana 26. Além disso, a alteração do limiar para a semana 22 e 26 para SRS e teste de 9 buracos e pinos.

#### *Recidivas*

A frequência de recidivas ao longo de 2 anos antes de receber o fármaco do estudo foi comparada com a frequência de recidivas com o fármaco do estudo (Semanas 0 a 22).

### **Exemplo 3**

#### **Medidas dos Resultados: Parâmetros Imunológicos**

##### *1. Análises da Expressão à Superfície Celular de PBMC*

As análises para os parâmetros imunológicos foram realizadas utilizando métodos padrão. Por exemplo, foi realizada análise quantitativa em paralelo de marcadores importantes do desenvolvimento de células T Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>, funções efectoras das células T de EM e marcadores para a actividade biológica do anticorpo anti-Tac com particular destaque para a activação de células T (ou seja, a determinação da expressão de IL-2, número de células T CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup> expressando IL-2R/CD25; respostas de recordação a antigénios de recordação padrão *in vitro* (proliferação ao toxóide do

tétano; péptido 306-318 de Flu-HA) e *in vivo* (teste cutâneo)) em sujeitos tratados.

Estudos específicos incluíram:

1. Análise de alterações em subpopulações de glóbulos brancos (células polimorfonucleares, monócitos, células NK, LAK (células assassinas activadas por linfócitos), linfócitos - incluindo células B, subconjuntos de células T CD4+ e CD8+, células NK-T, células T reguladoras CD4+/CD25+) após terapia *in vivo* com daclizumab.

2. Avaliação de alterações na expressão à superfície de múltiplos marcadores de activação, moléculas de adesão, moléculas co-estimuladoras, receptores de citocinas e quimocinas, etc: CD95, CTLA-4, CD25 (cadeia de IL-2R), CD122 (cadeia de IL-2R), CD132 (cadeia de IL-2R), CD45RA, CD45RO, CD71, OX-40, CCR5, CXCR4, CD80, MHC de classe II (HLA-DR, DQ, DP), TCR / TCR / , CD2, CD56, CD163 através de citometria de fluxo.

3. Avaliação da proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a diferentes estímulos policlonais e específicos de antígenos (anti-CD3 ligado à placa, anti-CD3 + anti-CD28 ligado à placa, IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, proteína básica da mielina (MBP), toxóide do tétano (TT) através de ensaio de proliferação baseado em citometria de fluxo utilizando diacetato de 5-(e-6)-carboxifluoresceína, éster de succinimidilo (5(6)-CFDA, SE). Produção de citocinas (i.e. IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- , factor de necrose tumoral (TNF)- , LT- , factor de crescimento transformante (TGF)- ) de PBMC estimulados com estes vários estímulos através de ELISA em sanduíche.

4. Amostras séricas longitudinais foram colhidas de sujeitos no ensaio para investigar as alterações em subtipos de anticorpo, anticorpos específicos de mielina, marcadores do complemento e relacionados com o complemento, marcadores de stresse oxidativo e marcadores indicativos de remielinização e reparação.

Os dados obtidos demonstraram que a administração *in vivo* a longo prazo de daclizumab leva a várias alterações imunorreguladoras. Sem estar preso à teoria, estas mudanças contribuem provavelmente para o efeito terapêutico positivo deste fármaco em EM. As alterações observadas incluíram:

- Diminuição suave ( 10%) na contagem total de linfócitos (incluindo células T CD4+ e CD8+ e células B).

- Aumento concomitante na proporção de células NK e células NK-T - mostrou-se que ambas têm elevada actividade imunorreguladora em vários modelos animais de autoimunidade e em distúrbios auto-imunes humanos incluindo EM, diabetes mellitus insulínica dependente (DMID) e lúpus eritematoso sistémico (LES).

- Sobre-regulação de CD122 (cadeia de IL-2R) na superfície celular de células NK, células T NK e subpopulação de linfócitos CD8+ que provavelmente está subjacente à maior capacidade proliferativa destas células para IL-2 (através de IL-2R de afinidade intermédia - isto é CD122 + CD132) e para IL-15 (que partilha 2 cadeias de sinalização com IL-2R - i.e. CD122 e CD132).

- Sem diminuição significativa na proliferação de células T (ambos os subconjuntos CD4+ e CD8+) para fortes estímulos policlonais e para antigénios de recordação como TT.

- Aumento da proliferação de células NK, células T / , células T NK e subpopulação de células T CD8+ para IL-15.

## 2. Análises de expressão de microarrays de ADNC

A imunomodulação induzida por daclizumab após administração *in vivo* de longo prazo em sujeitos com EM foi avaliada através de *microarrays* de ADNC realizada em amostras de PBMC criopreservadas da fase limiar, tratamento e pós-tratamento do ensaio clínico. Os dados obtidos indicaram que a terapia de daclizumab conduz a sobre-regulação de vários genes de interesse, incluindo: supressor da sinalização de citocinas 5 (SOCS5), jun-D-proto-oncogene, proteína tirosina-fosfatase-tipo receptor, semelhante ao antigénio CD209, ciclo da divisão celular 14 (CDC14), subunidade reguladora 2 da proteína-quinase CDC28, e outros. A terapia de daclizumab leva também a sub-modulação de vários genes intimamente relacionados com imunidade pró-inflamatória, factor de crescimento semelhante a IFN- e de fibroblastos 12 (FGF-12).



### 3. *Experiências funcionais in vitro*

Estudos de amostras criopreservadas de PBMC de sujeitos em ensaios clínicos foram realizados para demonstrar em maior detalhe as alterações observadas em amostras prospectivas longitudinais e também adicionar componentes funcionais às mudanças estruturais observadas:

a. A proliferação de PBMC foi avaliada através de ensaio de proliferação baseado em citometria de fluxo, utilizando diacetato de 5-(e-6)-carboxifluoresceína, éster de succinimidilo (5(6)-CFDA, SE) a estímulos adicionais:

b. Anti-CD3 + anti-CD28 ligados à placa - como um potente estímulo de activação de células T policlonais.

c. Hemocianina da lapa (KLH) - como um antigénio para células T CD4+ ao qual os humanos não estão normalmente expostos, isto é, para investigar o efeito de daclizumab em iniciação de células T ingénuas

d. Mistura dos antigénios de mielina proteína básica de mielina (MBP) (146-170), PLP (139-154), MOG (35-55) e CNP (343-373) - para investigar o efeito de daclizumab em células T auto-reactivas.

e. LPS - como um potente activador de monócitos e também de células T reguladoras CD4+/CD25+. Além disso, PBMC foram semeados com e sem adição exógena de daclizumab para demonstrar as diferenças entre efeitos agudos *in vitro* de daclizumab e efeitos prolongados *in vivo* da terapia de daclizumab. Os PBMC activados com estes vários estímulos foram então transferidos após 72 h para meio enriquecido em IL-2 ou IL-15 ou IL-4 para observar se a sobre-regulação observada de CD122 e CD132 à superfície celular destas células resultava na sua maior resposta funcional a citocinas que sinalizam através destas moléculas sinalizadoras. A proliferação e a expansão de células foram medidas no Dia 6 e o fenótipo funcional destas células expandidas foi avaliado através de coloração de citocinas intracelulares no Dia 10 (medindo a produção de IL-2, IL-4, IL-6 e IFN- $\gamma$ ). ~~Em~~ <sup>Além</sup> disso, os sobrenadantes foram colhidos para avaliação de citocinas produtoras de monócitos e marcadores tais como IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e NO.

f. As propriedades imunomoduladoras de células NK foram avaliadas em maior detalhe, p. ex., células T NK e células T reguladoras CD4+/CD25+ após terapia de daclizumab

g. O perfil de expressão génica a partir do *microarray* de ADNc foi verificado através de PCR em tempo real e estudos funcionais.

Os resultados destas experiências indicam que:

- Os efeitos "agudos" da administração *in vitro* de daclizumab eram diferentes dos efeitos prolongados da administração *in vivo*. Uma inibição mais profunda da proliferação de células T a vários estímulos foi notada de forma aguda.

- Doses padrão de daclizumab (ou seja, 1 mg/kg/4 semanas IV) foram suficientes para bloquear o epitopo Tac de CD25 em células T, mas não foram suficientes para bloquear totalmente CD25 em monócitos activados. Sem estar preso à teoria, foram necessárias doses mais elevadas de daclizumab em muitas situações clínicas (p. ex., transplante) devido a bloqueio insuficiente de CD25 por esta dose. Assim, doses mais elevadas seriam úteis em sujeitos muito activos com doenças auto-imunes.

- O epitopo de CD25 foi bloqueado por daclizumab após administração *in vitro*, mas a molécula persiste à superfície celular das células no mesmo número. No entanto, após administração prolongada *in vivo* de daclizumab, esta molécula é sub-regulada da superfície celular de células T tanto CD4+ como CD8+.

- A administração de daclizumab influenciou a iniciação de células T: células T CD4+ respondendo a antigénio ingénuo semelhante a KLH produzem maiores quantidades de IL-4 e menores quantidades de IFN- $\gamma$  após o tratamento de daclizumab. Sem estar preso à teoria, crê-se que o efeito na iniciação de células T controla o equilíbrio pró-inflamatório *versus* anti-inflamatório em EM e outras doenças auto-imunes.

- A proliferação de células T e a sua resposta funcional a citocinas complementares partilhando cadeias de sinalização com IL-2R (i. e., IL-15, IL-4, IL-7 e outras) foi reforçada após terapia de daclizumab.

- Os resultados indicam também que a activação de monócitos é modulada após terapia de daclizumab uma vez que os monócitos produziram quantidades inferiores de citocinas e tiveram uma maior resposta a IL-4.

- A proliferação de células reguladoras CD4+/CD25+ foi aumentada após terapia de daclizumab (demonstrado com LPS, o

que estimula este subtipo de células T através do receptor Toll-4).

#### **Exemplo 4**

##### **Avaliação dos Sujeitos**

O número médio de lesões de aumento do contraste entre as semanas 10-22 (3 meses, 4 varrimentos de MRI) em terapia de combinação com as semanas 42-62 (5 meses, 6 varrimentos de MRI) em monoterapia, foi analisado. As semanas 10-22 (3 meses, 4 varrimentos de MRI) em terapia de combinação foram comparadas com o tempo total (semanas 24-62; 9 meses e 10 varrimentos de MRI) em monoterapia.

A resposta ao tratamento com terapia de apenas Zenapax® foi considerada parcial se não fosse alcançada uma redução das lesões de aumento de contraste de >60% a partir do tratamento limiar, i.e. quando os sujeitos estavam apenas a IFN- $\gamma$ . Se fosse alcançada uma redução das lesões de aumento do contraste >0, mas <60% do limiar, a monoterapia de Zenapax® era considerada parcialmente activa. Se a actividade de doença regressasse aos níveis limiares, a monoterapia de Zenapax® era considerada como tendo falhado. No entanto, não foi detectado nenhum destes resultados.

Os sujeitos que entraram na fase de terapia simples tiveram a actividade das lesões avaliada mensalmente. O número de novas lesões era avaliado mensalmente a cada mês do estudo. Se a média de número de lesões ao longo dos meses 5, 6, 7 e 8 era de 50% ou menos do que os 3 meses anteriores à entrada em monoterapia, eram feitos esforços para continuar os sujeitos em terapia de Zenapax® até ao mês 10 (semana 62) em monoterapia (por mais um ano).

Os resultados de dois sujeitos são mostrados na Fig. 1 e 2. O número de novas lesões foi avaliado através da identificação de um único varrimento do número de lesões cerebrais que não foram previamente identificadas. Além disso foi avaliado o número total de lesões. Estas lesões incluíram lesões de aumento de contraste que persistiram por 1-2 meses. Além disso, foi avaliado o número de lesões supertotal. Isto

incluiu lesões que apareceram em mais de um varrimento do cérebro do sujeito, e proporciona uma medida indirecta do volume da lesão, i.e. através do aparecimento de uma lesão fatias em múltiplas secções de MRI (supertotal de lesões).

Tal como indicado nas Figs. 1 e 2, o tratamento apenas com Zenapax® (na ausência de IFN- ) resultou numa redução dramática no número de lesões totais. Não foram detectadas novas lesões ao longo de um período de 5,5 meses em nenhum sujeito tratado apenas com Zenapax® (na ausência de IFN- ).

Os dados obtidos durante os últimos quatro meses de tratamento foram comparados com quatro meses de tratamento limiar. Assim, para cada sujeito, os resultados obtidos durante o período de tratamento apenas com Zenapax® (na ausência de IFN- ) foram comparados com os resultados obtidos durante tratamento com Zenapax® e IFN- . O número de novas lesões de Gd foi diminuído em 85,95% ( $p=0,016$ ). O número total de lesões de aumento de contraste foi reduzido em 85,75% ( $p=0,004$ ). O volume das lesões de Gd foi reduzido em 87% ( $p=0,014$ ). O número supertotal de lesões de aumento de Gd foi reduzido em 87,4% ( $p=0,008$ ). O teste de 9 buracos e pinos foi reduzido em 5,36% ( $p=0,004$ ). A taxa de recidiva anual (número de recidivas por sujeito por ano) foi reduzida em 88,9% ( $p=0,047$ ). A SRS foi também reduzida em 10,61% ( $p=0,035$ ). Todas as outras medidas melhoradas não atingiram significância estatística. Assim, o resultado primário foi significativamente melhorado quando os sujeitos foram tratados com Zenapax® sozinho.

### **Exemplo 5**

#### **Aumento da Dose**

Se os sujeitos na combinação de IFN- e Zenapax® mostrassem uma redução inferior a 75% da actividade da doença em comparação com o limiar a IFN- sozinho, a sua dose de Zenapax® era aumentada para 2 mg/kg (por mês).

Um sujeito entrando no aumento da dose foi avaliado após três meses de terapia na dose aumentada. Nenhuma toxicidade foi observada durante um período de ensaio de 8,5 meses. O

sujeito foi tratado com 2 mg/kg de Zenapax® a cada duas semanas (4 vezes a dose descrita acima). O sujeito respondeu a terapia de Zenapax® com uma redução >60% das lesões de aumento de contraste.

### **Exemplo 6**

#### **Administração combinada de IFN- e Zenapax**

Este exemplo ilustra os efeitos da administração combinada de interferão-beta e um antagonista de IL-2R em sujeitos possuindo esclerose múltipla recidivante-remitente ou progressiva secundária. O protocolo é geralmente mostrado no Exemplo 1, e está resumido abaixo.

#### *Critérios de inclusão*

Os sujeitos incluídos no ensaio foram diagnosticados com esclerose múltipla recidivante-remitente ou progressiva secundária; estavam entre as idades de 16-65; registaram entre 1 e 6,5 na EDSS; não responderam ao tratamento apenas com interferão-beta tal como demonstrado por uma ou mais exacerbações nos 18 meses anteriores ao recrutamento, um aumento de 1 ponto ou mais na EDSS ao longo de 18 meses de tratamento, ou persistência ou recorrência de lesões aumentando o contraste em MRI de cérebro para pelo menos metade da média das lesões de aumento de contraste mensais do limiar ao longo de um período limiar de 6 meses medido antes do início da terapia com interferão-beta; e deviam ter tido pelo menos 3 lesões de aumento de gadolínio nos 3 primeiros varrimentos de MRI pré-terapia de combinação.

#### *Critérios de exclusão*

Os sujeitos eram excluídos do ensaio se tivessem sido diagnosticados com EM progressiva primária; os testes sanguíneos pré-tratamento fossem anormais; diagnosticados com uma doença importante clinicamente significativa concomitante; fossem observadas contra-indicações para terapias de anticorpos monoclonais; determinados como sendo positivos para HIV; tratados com acetato de glatirâmero ou ciclofosfamida nas 26 semanas antes do ensaio, ou tratados

com imunoglobulina intravenosa (IVIg), azatioprina (AZA), metotrexato (MTX), ciclosporina, ciclofosfamida (CTC), cladribina, ou mitox nas 12 semanas antes do ensaio, ou tratados com corticosteróides ou hormona adrenocorticotrófica (ACTH) nas 8 semanas antes do ensaio, ou tratados com qualquer outro fármaco de investigação ou procedimento para EM; não pratiquem contracepção adequada; ou a amamentar.

### *Curso de Tratamento*

Dez sujeitos (um adicional um sob a isenção do único sujeito acima mencionado com uma dose mais elevada) participaram no ensaio da terapia de combinação. Para cada sujeito foi estabelecido um período limiar de 3 meses de tratamento com interferão-beta (Avonex® ou Betaseron®). Avonex® foi administrado tal como indicado na bula fornecida pelo fabricante numa dose de 30 g injectada por via intramuscular, uma vez por semana. Betaseron® foi administrado tal como indicado na bula fornecida pelo fabricante a uma dose de 0,25 mg injectados por via subcutânea em dias alternados. Quatro varrimentos de MRI foram realizados durante o período limiar para determinar um número limiar de lesões de aumento de contraste, um no início do período e depois no final de cada mês do período limiar com o quarto pouco antes do início da terapia de combinação. Os sujeitos foram também avaliados na EDSS, a Escala de Pontuação Neurológica de Scripps (NRS), e vários testes de deambulação e outros de capacidade motora.

A terapia combinada começou após o limiar de 3 meses ter sido estabelecido. O tratamento com interferão-beta foi continuado e, além disso, foi administrado anti-Tac (Zenapax®) durante 5,5 meses. Durante o primeiro mês da administração combinada, Zenapax® foi administrado a cada duas semanas e posteriormente o Zenapax® foi administrado uma vez por mês. O Zenapax® foi administrado intravenosamente do modo descrito na bula do fabricante a uma dose de 1 mg/kg de peso corporal. Um sujeito recebeu uma dose de 2 mg/kg a cada duas semanas após não ter mostrado resposta à dose de 1 mg/kg. Os varrimentos de MRI foram realizados durante o período de tratamento combinado para determinar as alterações no número de lesões de aumento de contraste, a cada duas

semanas durante as primeiras seis semanas de tratamento, e posteriormente mensalmente durante um total de 8 varrimentos de MRI. No mesmo programa os sujeitos foram também avaliados na EDSS, na NRS de Scripps, e em vários testes de deambulação e outros de capacidade motora.

### *Resultados*

A administração combinada de interferão-beta e Zenapax® levou à cessação quase completa da actividade da doença e à melhoria clínica em sete de oito sujeitos. Tal como pode ser observado na Fig. 3, sete dos oito sujeitos tinham menor ou, pelo menos nenhum aumento nas lesões de aumento de contraste tanto novas como totais sob a terapia de combinação em comparação o período limiar. Tal como mostrado na Fig. 4A, quatro dos oito sujeitos demonstraram também melhoria na EDSS sob a terapia de combinação em comparação com o período limiar. Tal como mostrado na Fig. 4B, sete dos oito sujeitos demonstraram melhoria na NRS de Scripps. Em relação à Fig. 4A, cinco dos oito sujeitos demonstraram melhor deambulação no índice de deambulação. Tal como mostrado na Fig. 5B, cinco dos oito sujeitos melhoraram ou não tiveram qualquer alteração numa caminhada cronometrada de 20 m. Tal como mostrado na Fig. 6A, todos os sujeitos demonstraram melhores tempos com a sua mão dominante no teste de buracos e pinos. Tal como mostrado na Fig. 6B, cinco dos oito sujeitos também melhoraram com a sua mão não dominante no teste de buracos e pinos.

## **Exemplo 7**

### **Efeitos nas células T em Terapia de Combinação**

Este exemplo demonstra a saturação do epitopo Tac após terapia de combinação e a diminuição paralela na proliferação de células T em comparação com o período limiar.

A saturação do epitopo Tac foi estudada através de citometria de fluxo. A administração combinada de interferão-beta com 1 mg/kg de Zenapax® causou saturação completa do epitopo Tac em células T CD4+/CD25+ e CD8+/CD25+ (Fig. 7).

A proliferação de células T activadas foi medida através de marcação das células com fluorescência com éster succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE) e avaliação do número de mitoses em células marcadas com CFSE através de citometria de fluxo. Tal como mostrado na Fig. 8A, seis dos oitos sujeitos demonstraram menor proliferação de células T CD4. Em relação à Fig. 8B, todos os sujeitos demonstraram uma diminuição na proliferação de células T CD8 em comparação com o período limiar.

### **Exemplo 8**

#### **Sobre-regulação de CTLA-4**

Este exemplo demonstra a sobre-regulação inesperada de CTLA-4 causada pela administração combinada de interferão-beta e um antagonista de IL-2R.

A expressão à superfície de CTLA-4 foi medida através da utilização de anticorpos contra CTLA-4 e citometria de fluxo. Para cada medição da expressão à superfície de CTLA-4, primeiro, um tubo de 5 mililitros (ml) de sangue inteiro em ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) foi obtido a partir de cada sujeito. Em seguida, 42 ml de solução de lise 1× (4,2 ml de solução de lise 10 + 37,8 ml de H<sub>2</sub>O) foram preparados a partir de reserva 10× preparada através de dissolução em 1 litro de água destilada: 89,9 g de NH<sub>4</sub>Cl, 10,0 g de KHCO<sub>3</sub>, 370,0 mg de EDTA tetrassódico; e ajuste da solução a pH 7,3. 3 ml de sangue foram transferidos através de pipeta para os 42 ml de solução de lise 1× (em tubos Falcon de 50 ml). A mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 3-5 minutos. Em seguida foi centrifugada a 300 × a gravidade durante 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e o sedimento foi ressuspense em 30 ml de meio X-vivo frio. A mistura ressuspensa foi centrifugada a 300 × a gravidade durante 5 minutos a 2-8°C, o sobrenadante foi aspirado e o sedimento foi ressuspense em 2,5 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) enriquecida em proteína (10 ml de soro fetal de vitelo (FCS) em 500 ml de PBS 1×). Esta suspensão de células foi dividida em alíquotas de 200 1 numa placa de 96 poços, em seguida centrifugada a 300 × a gravidade durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. A



coloração foi realizada através da adição de 10 microlitros ( 1)/poço de mistura de anticorpos anti-CTLA-4 preparada. A placa foi então incubada durante 30 minutos em gelo num recipiente escuro. Cada poço foi lavado com 200 1 de tampão de lavagem frio - misturado suavemente, e centrifugado a 1000 rpm. Os sobrenadantes foram removidos e cada poço lavado outras duas vezes com 200 1 de tampão de lavagem. Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspenso em 200 1 de tampão de coloração e analisado através de Separação de Células Activadas com Fluorescência (FACS)-Calibur. Foram adquiridos pelo menos 10000 eventos retiros em linfócitos e 5000 eventos retidos em monócitos.

Tal como mostrado na Fig. 9, sete dos oito sujeitos demonstraram sobre-regulação significativa de CTLA-4 durante a terapia combinada em comparação com o período limiar.

Lisboa, 2014-08-01

### REIVINDICAÇÕES

1. Antagonista do receptor de IL-2 que é um anticorpo que se liga especificamente a p55 do receptor de IL-2 para utilização num método de tratamento de um sujeito com esclerose múltipla, em que o método compreende:

- a administração ao sujeito de uma quantidade terapêuticamente eficaz do referido anticorpo, em que o anticorpo é administrado na ausência de administração concomitante do interferão beta,
- melhoria deste modo de um sinal ou sintoma de esclerose múltipla e tratamento do sujeito.

2. Anticorpo da reivindicação 1 para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo não é administrado com outro agente farmacêutico para tratar esclerose múltipla.

3. Anticorpo da reivindicação 1 para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

4. Anticorpo da reivindicação 3 para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal quimérico, humanizado ou humano.

5. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações anteriores para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo é daclizumab.

6. Anticorpo da reivindicação 5 para utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o anticorpo é administrado numa dose de 1 a 3 miligramas por quilograma.

7. Anticorpo da reivindicação 5 ou reivindicação 6 para utilização de acordo com a reivindicação 5 ou reivindicação 6, em que o anticorpo é administrado a uma dose de 1 miligrama por quilograma a 2 miligramas por quilograma.

8. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações anteriores para utilização de acordo com qualquer uma das

reivindicações anteriores, em que o anticorpo é administrado duas vezes por semana.

9. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 7 para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que o anticorpo é administrado mensalmente.

10. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações anteriores para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o tratamento do sujeito resulta num menor número de lesões de aumento de contraste avaliadas através de Imagiologia de Ressonância Magnética.

11. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações anteriores para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o sujeito falhou em responder a tratamento anterior com interferência beta.

12. Anticorpo da reivindicação 11 para utilização de acordo com a reivindicação 11, em que o sujeito falhou em responder a tratamento anterior com interferência-beta 1a, ou tratamento com interferência-beta 1b, ou ambos.

13. Anticorpo da reivindicação 5 para utilização de acordo com a reivindicação 5:

- em que o anticorpo é administrado numa forma de dose unitária contendo cerca de 50 mg/dose a cerca de 400 mg/dose ou
- contendo cerca de 50, 100, 150 ou 200 mg/dose.

14. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações anteriores para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o sujeito tem esclerose múltipla recidivante-remitente.

15. Anticorpo da reivindicação 11 para utilização de acordo com a reivindicação 11, em que o anticorpo é administrado pelo menos duas vezes por semana durante um período de pelo menos dois meses.

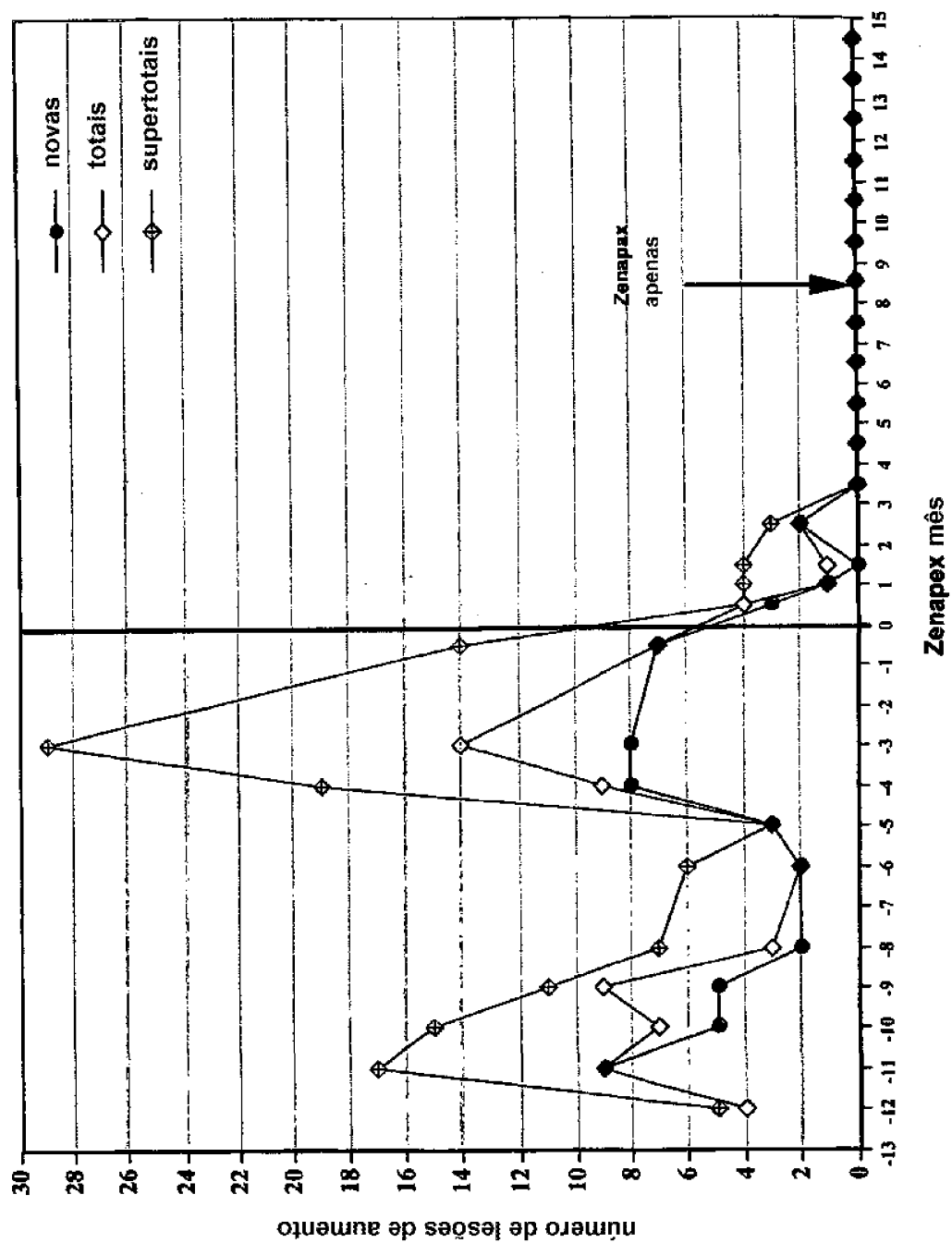
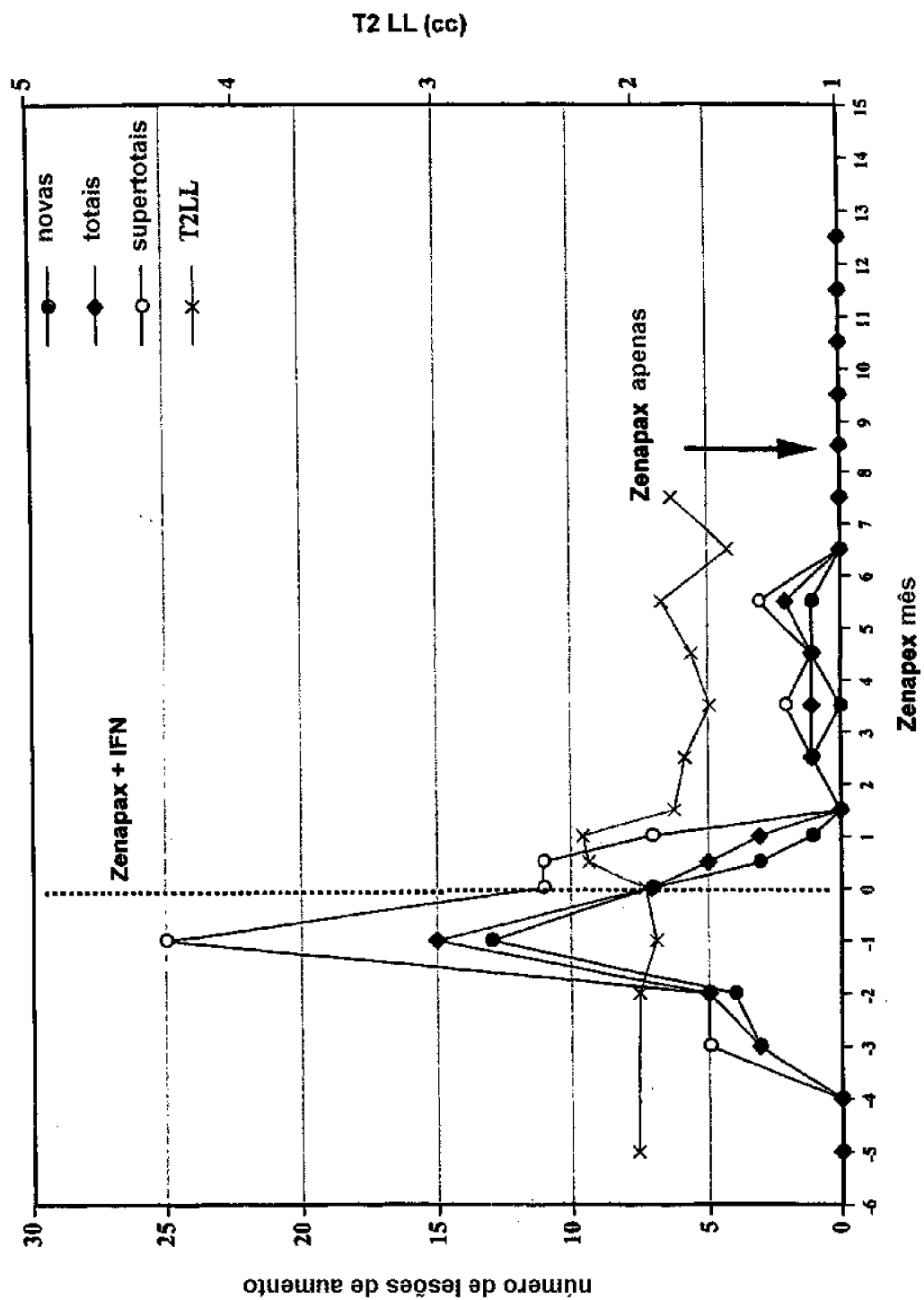


FIG. 1



Alterações em lesões de aumento de contraste

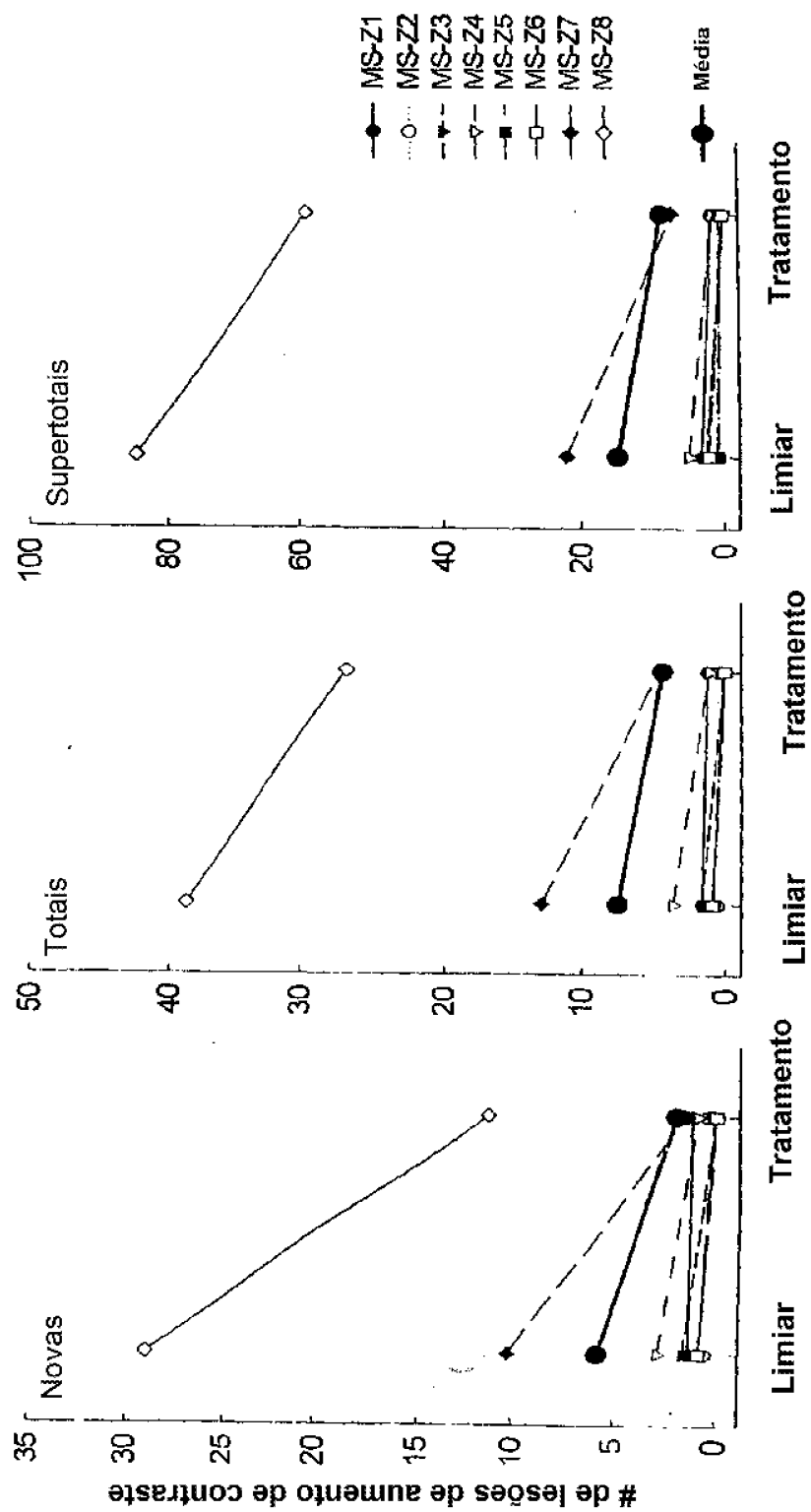


FIG. 3

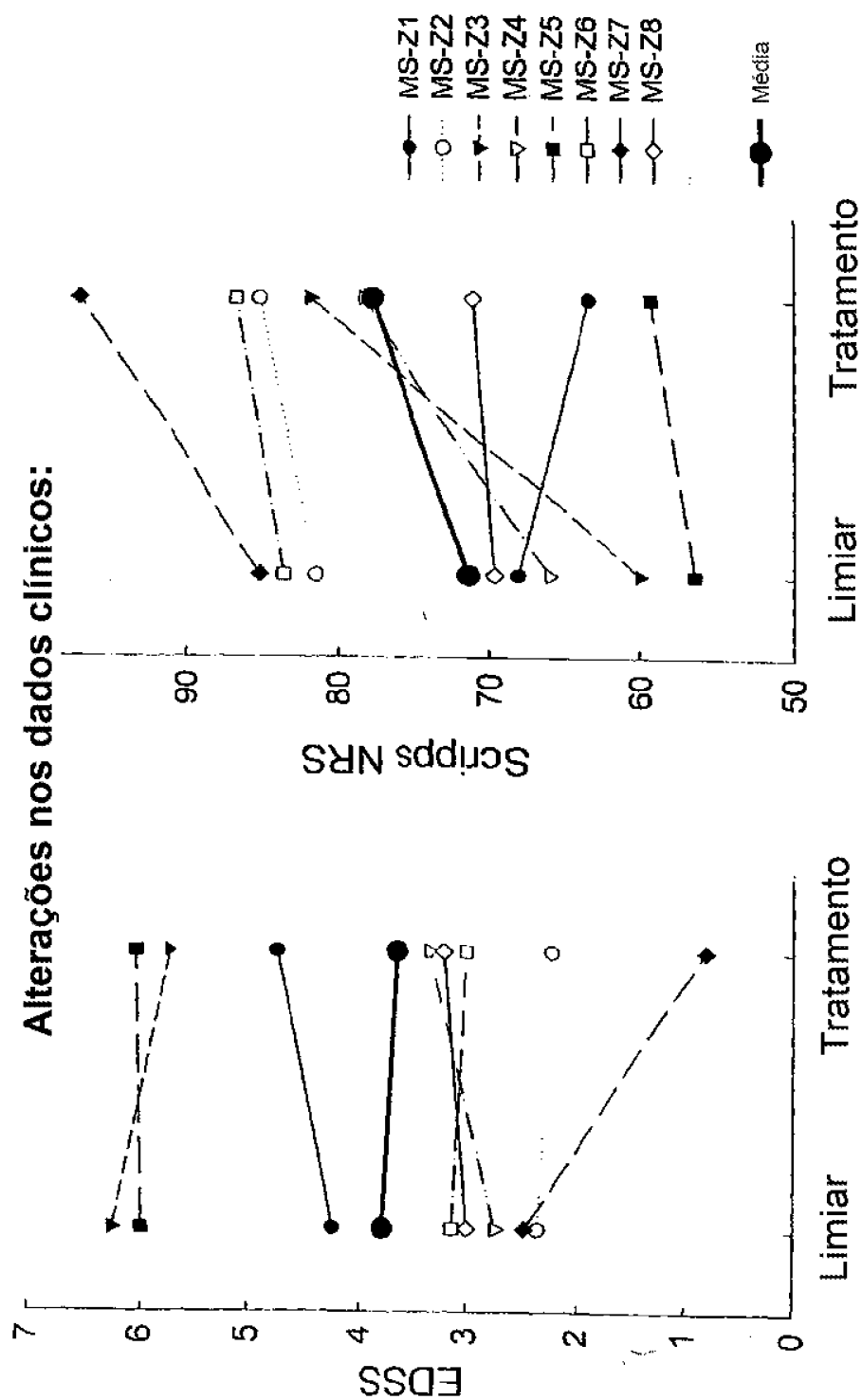


FIG. 4A

FIG. 4B

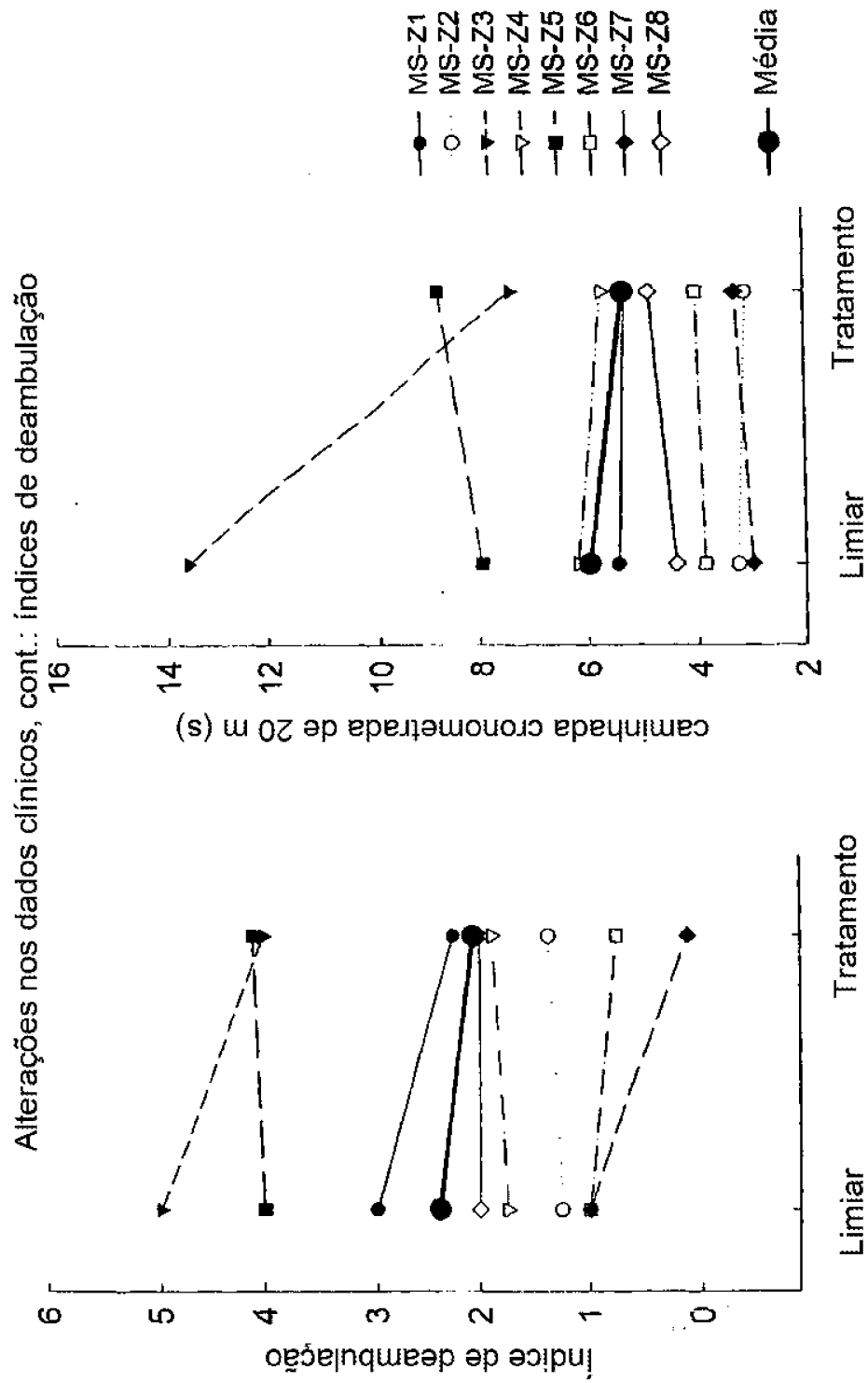


FIG. 5B

FIG. 5A



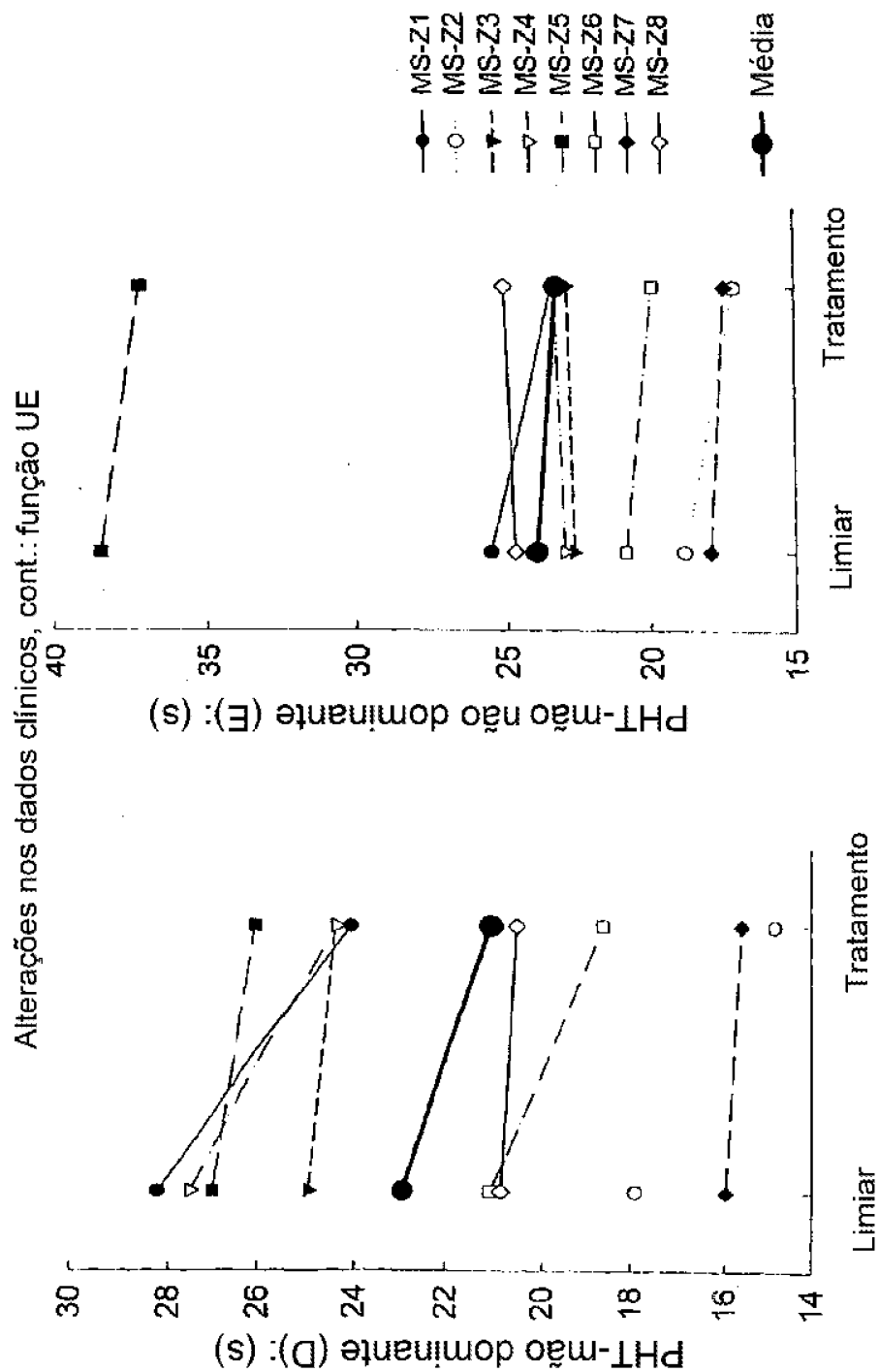


FIG. 6B

FIG. 6A

Os níveis mínimos de Zenapax no presente regime de dosagem (1 mg/kg máx 100 mg) saturaram completamente o receptor de CD25 nas células T periféricas

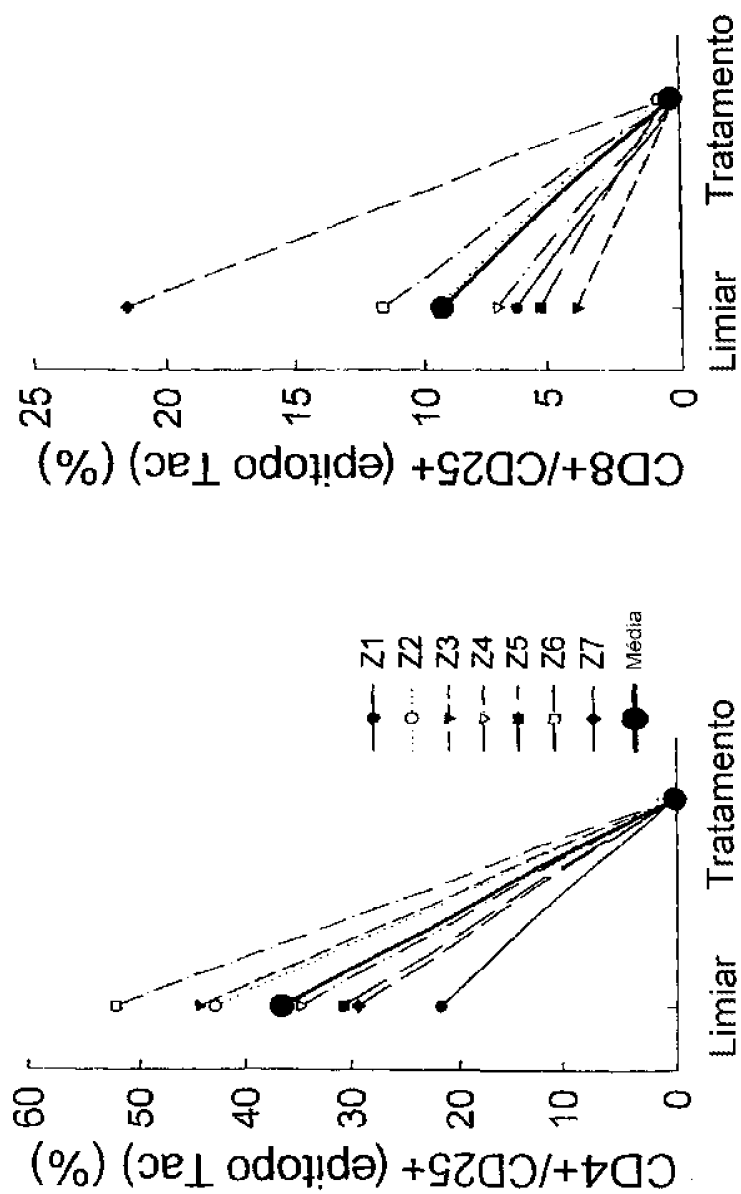


FIG. 7

Paralelo para o bloqueio completo de CD25 através de Zenapax, também a proliferação de células T activadas *in vivo* para IL-2 diminui

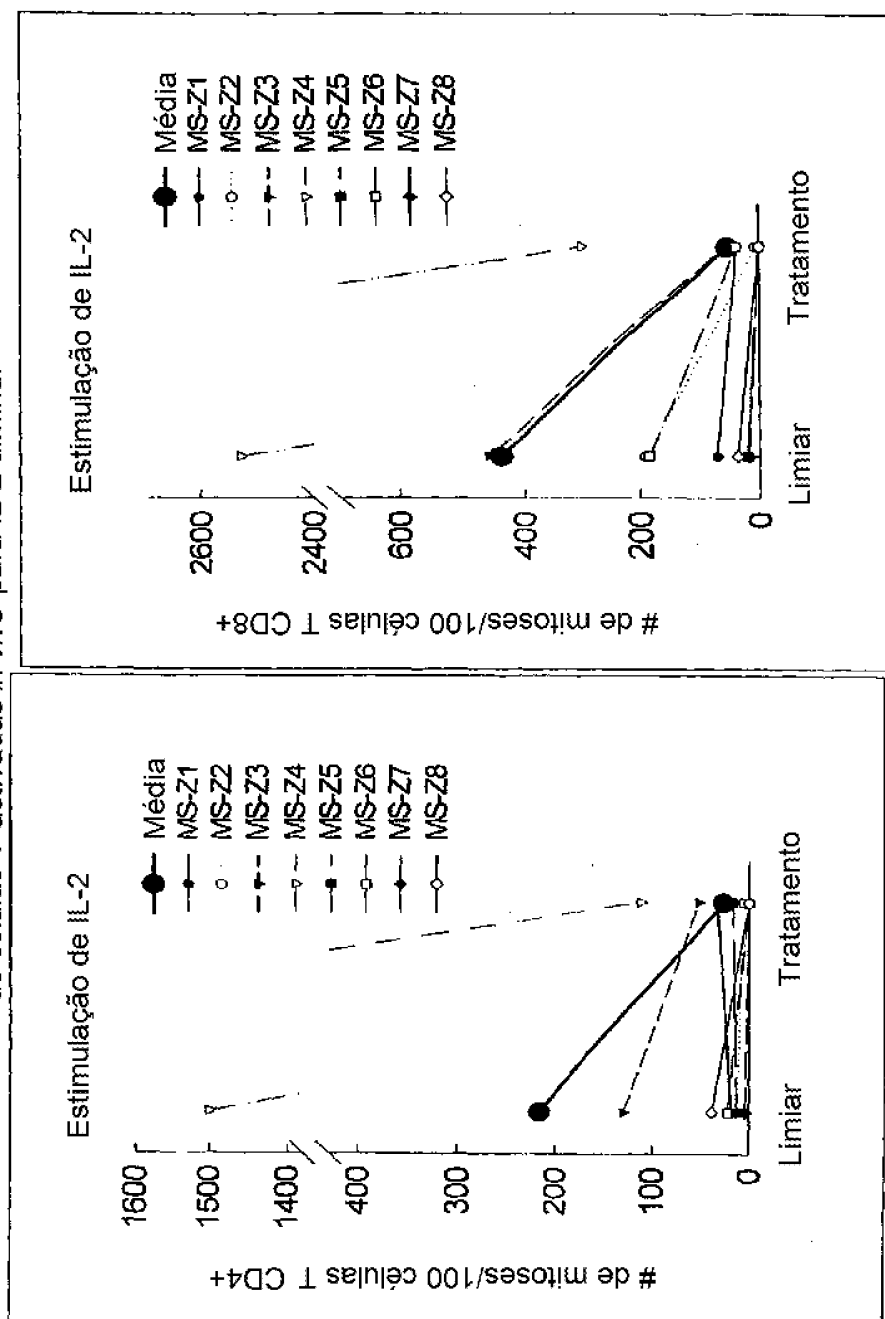


FIG. 8A

FIG. 8B

Sobre-regulação de CTLA-4 em células T CD4+ durante administração de Zenapaz:

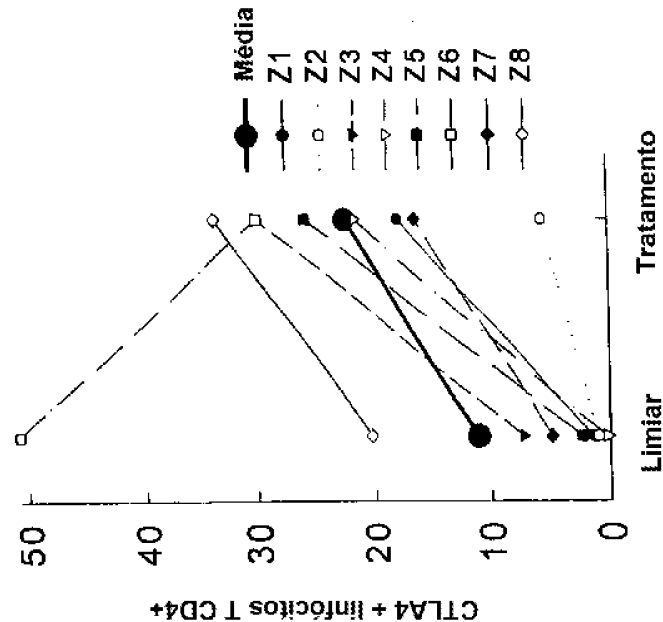


FIG. 9