

320
318

Figura 69: Una gráfica de Kaplan-Meier de la proporción acumulativa de sujetos quienes descontinuaron por alguna razón durante los primeros 12 meses del estudio, como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

5 Figura 70: Una gráfica de Kaplan-Meier de la proporción acumulativa de sujetos quienes descontinuaron debido a una falta de eficacia durante los primeros 12 meses del estudio, como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

10 Figura 71A: Una gráfica que muestra las respuestas ACR el día 180 para pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

15 Figura 71B: Una gráfica que muestra los intervalos de confianza del 95 por ciento para diferencias en las respuestas de la ACR el día 180 para pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

20 Figura 72A: Una gráfica que muestra las respuestas de ACR el día 360 para pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

25 Figura 72B: Una gráfica que muestra los intervalos de confianza de 95 por ciento para las diferencias en respuestas a ACR el día 360 para pacientes administrados con metotrexato

~~341~~ 321

solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 73A: Una gráfica que resume la respuesta de ACR 20 por visita durante un intervalo de un año para pacientes 5 administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 73B: Una gráfica que resume la respuesta de ACR 50 por visita durante un intervalo de un año para pacientes 10 administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 73C: Una gráfica que resume la respuesta de ACR 70 por visita durante un intervalo de un año para pacientes 15 administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 74: Una gráfica que muestra la ACR-N media sobre un intervalo de tiempo de un año para pacientes 20 administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 75: Una gráfica que muestra la proporción de nuevas articulaciones activas en el día 180 para pacientes 25 administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2

ND 322

o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 76A: Una gráfica que muestra la Frecuencia de nuevas articulaciones sensibles por sujeto en el día 180 para
5 pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 76B: Una gráfica que muestra la Frecuencia de nuevas articulaciones sensibles por sujeto en el día 360 para
10 pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 77A: Una gráfica que muestra la Frecuencia de nuevas articulaciones hinchadas por sujeto en el día 180 para
15 pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 77B: Una gráfica que muestra la Frecuencia de nuevas articulaciones hinchadas por sujeto en el día 360 para
20 pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 78: Una gráfica que muestra la proporción de nuevas articulaciones activas en el día 360 para pacientes
25 administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2

~~32~~ 323

o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figuras 79A-79B: Gráficas que muestran el: Fig. 79A Cambio a partir de la línea base en los Dominios de Salud Física el día 180, y Fig. 79B Cambio a partir de la línea base en los Dominios de Salud Mental el día 180, para pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figuras 80A-80B: Gráficas que muestran el: Fig. 80A Cambio a partir de la línea base en los Dominios de Salud Física el día 360, y Fig. 80B Cambio a partir de la línea base en los Dominios de Salud Mental el día 360, para pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 81 : Una gráfica que muestra los niveles de IL-2r soluble en la Línea base, Días 180 y 360 para pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 82: Una gráfica que muestra los niveles del Factor Reumatoide en la Línea base, Días 180 y 360 para pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

32
324

Figura 83: Una gráfica que muestra los niveles de ICAM-1 en la Línea base, Días 180 y 360 para pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 84 : Una gráfica que muestra los niveles de e-Selectina en Línea base, Días 180 y 360 para pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 85: Una gráfica que muestra el IL-6 en suero en la Línea base, Días 180 y 360 para pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 86A: Una gráfica que muestra los niveles de CRP en la Línea base, Días 180 y 360 para pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

Figura 86B: Una gráfica que muestra los niveles de TNF α en Línea base, Días 180 y 360 para pacientes administrados con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 o 10 mg/kg de peso corporal) como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

323/325

Figura 87: Porcentaje de células T activadas en especímenes de aterectomía.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

5 Definiciones

Todos los términos técnicos y científicos usados en esta solicitud tienen significados utilizados comúnmente en el arte a menos que se especifique de otra manera. Como se usa en esta solicitud, las siguientes palabras o frases tienen
10 los significados especificados.

Como se usa en la presente, "ligando" se refiere a una molécula que reconoce y enlaza específicamente a otra molécula, por ejemplo, un ligando para CTLA4 es una molécula B7. En un ejemplo adicional, un ligando para la molécula B7
15 es una molécula de CTLA4 y/o CD28. La interacción de una molécula y su ligando se puede regular por composiciones de la invención. Por ejemplo, la interacción de CTLA4 con su ligando B7 se puede bloquear por la administración de las moléculas de CTLA4Ig. Alternativamente, el factor de necrosis
20 de tumor (TNF), un ligando, interactúa con su receptor el receptor TNF (TNFR) y se puede bloquear por la administración de etanercept o de otras moléculas de bloqueo de TNF/TNFR.

Como se usa en la presente, "CTLA4 de tipo silvestre" o "CTLA4 no mutado" tiene la secuencia de aminoácidos del CTLA4
25 de longitud completa que se presenta naturalmente como se

~~321~~ 326

muestra en la figura 23 (también como se describe en la Patentes de EUA Nos. 5,434,131, 5,844,095 y 5,851,795 incorporadas en la presente como referencia en su totalidad) o cualquier porción o derivado del mismo, que reconozca y
5 enlace a B7 o un interfiera con un B7 de manera que bloquee el enlace para CD28 y/o CTLA4 (por ejemplo, CD28 y/o CTLA4 endógenos). En modalidades particulares, el dominio extracelular del CTLA4 de tipo silvestre comienza con la metionina en la posición +1 y termina con el ácido aspártico
10 en la posición +124 o el dominio extracelular del CTLA4 de tipo silvestre comienza con la alanina en la posición -1 y termina con el ácido aspártico en la posición +124 como se muestra en la Figura 23. El CTLA4 de tipo silvestre es una proteína de superficie celular que tiene un dominio
15 extracelular N-terminal, una dominio de transmembrana y un dominio citoplásmico C-terminal. El dominio extracelular se enlaza a las moléculas objetivo tal como una molécula B7. En una célula, la proteína CTLA4 de tipo silvestre que se presenta naturalmente, se traduce como un polipéptido
20 inmaduro, el cual incluye un péptido de señal en el extremo de la terminal N. El polipéptido inmaduro se somete a un procesamiento post-traducciona el cual incluye el desdoblamiento y remoción del péptido de señal para generar un producto de desdoblamiento CTLA4 que tenga un
25 extremo en la terminal N recientemente generado que difiera

327

del extremo en la terminal N en la forma inmadura. Alguien experto en la técnica apreciará que puede suceder un procesamiento adicional posterior a la traducción, el cual retire uno o más de los aminoácidos del extremo en la terminal N recientemente generado del producto de desdoblamiento CTLA4. alternativamente, el péptido de señal no se puede retirar por completo, generando moléculas que comiencen antes de la metionina de aminoácidos de partida común. Así, la proteína CTLA4 madura puede comenzar en la metionina en la posición +1 o en la alanina en la posición -1. La forma madura de la molécula CTLA4 incluye el dominio extracelular o cualquier porción del mismo que se enlaza a B7.

Como se usa en la presente, una "molécula mutante CTLA4" significa un CTLA4 de tipo silvestre como se muestra en la Figura 23 o cualquier porción o derivado del mismo que tiene una mutación o mutaciones múltiples (preferentemente en el dominio extracelular del CTLA4 de tipo silvestre). Una molécula mutante CTLA4 tiene una secuencia que es similar pero no idéntica a la secuencia de la molécula CTLA4 de tipo silvestre, pero se enlaza todavía a B7. Las mutaciones pueden incluir uno o más residuos de aminoácidos substituidos con un aminoácido que tenga una estructura conservadora (por ejemplo, substituye una leucina con una isoleucina) o no conservadora (por ejemplo, substituye una glicina con un

~~328~~ 328

triptofano) o propiedades químicas, eliminaciones, adiciones, cambios de estructura o truncamientos de aminoácido. Las moléculas mutantes de CTLA4 pueden incluir una molécula que no es de CTLA4 en ella o unida a ella. Las moléculas mutantes
5 pueden ser solubles (esto es, en circulación) o enlazarse a una superficie celular. Las moléculas mutantes CTLA4 adicionales incluyen aquellas descritas en los números de serie de la solicitud de Patente de EUA 09/865,321, 60/214,065, y 60/287,576; en los números de Patentes de EUA
10 6,090,914, 5,844,095 y 5,773,253; y como se describe por Peach, R. J., et al., en J Exp Med 180:2049-2058 (1994)). Las moléculas mutantes CTLA4 se pueden hacer sintéticamente o de manera recombinante.

"CTLA4Ig" es una proteína de fusión soluble que
15 comprende un dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre que se enlaza a B7 o una porción del mismo unido a una región constante de inmunoglobulina (Ig) o una porción del mismo. Una modalidad en particular, comprende el dominio extracelular del CTLA4 de tipo silvestre (como se muestra en
20 la figura 23) partiendo de la metionina en la posición +1 y finalizando en el ácido aspártico en la posición +124 o partiendo de la alanina en la posición -1 hasta el ácido aspártico en la posición +124; un residuo de unión de aminoácido de glutamina en la posición +125 y una porción de
25 inmunoglobulina que abarcan el ácido glutámico en la posición

32X329

+126 a través de la lisina en la posición +327 (el ADN que codifica CTLA4Ig se depositó el 31 de Mayo de 1991, con la American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 bajo las disposiciones del tratado de Budapest y se le ha acordado el número de acceso ATCC, ATCC 68629; Linsley, P., et al., 1994 Immunity 1:793-80). CTLA4Ig-24 una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) CTLA4Ig se depositó el 31 de Mayo de 1991 con el número de identificación ATCC CRL-10762). Las moléculas solubles de CTLA4Ig usadas en los métodos y/o kits de la invención pueden o no incluir una secuencia de un péptido de señal (líder). Típicamente, en los métodos y/o kits de la invención, las moléculas no incluyen una secuencia de un péptido de señal.

"L10EA29YIg" es una proteína de fusión que es una molécula mutante de CTLA4 soluble que comprende un dominio extracelular de un CTLA4 de tipo silvestre con cambios de aminoácidos A29Y (un residuo de aminoácido de tirosina substituido por alanina en la posición 29) y L104E (un residuo del aminoácido del ácido glutámico substituido por una leucina en la posición +104) o una porción del mismo que se enlaza a una molécula de B7' unida a un extremo Ig (incluido en la figura 19; ADN que codifica L10EA29YIg se depositó el 20 de Junio de 2000 con el número ATCC PTA-2104; copendiente en los números de serie de la solicitud de Patente de EUA 09/579,927, 60/287,576 y 60/214,065

~~328~~ 330

incorporada en la presente como referencia. Las moléculas solubles de L10EA29YIg usadas en los métodos y/o kits de la invención pueden o no incluir una secuencia de péptido de señal (líder). Típicamente, en los métodos y/o kits de la invención las moléculas no incluyen una secuencia del péptido de señal.

Como se usa en la presente, "soluble" se refiere a cualquier molécula o fragmentos derivados de la misma que no se enlazan o colocan en una célula, esto es, en circulación. Por ejemplo, CTLA4, B7 o CD28 se pueden ser solubles al enlazar una porción de inmunoglobulina (Ig) al dominio extracelular de CTLA4, B7 o CD28, respectivamente. Alternativamente, una molécula tal como CTLA4 se puede hacer soluble al retirar su dominio de transmembrana. Típicamente, las moléculas solubles usadas en los métodos, composiciones y/o kits de la invención no incluye una secuencia de señal (líder).

Como se usa en la presente, "moléculas solubles de CTLA4" significa moléculas CTLA4 que no se enlazan a la superficie celular (esto es, en circulación) o cualquier porción funcional de una molécula de CTLA4 que se enlaza a B7 que incluyen, pero no se limitan a: proteínas de fusión CTLA4Ig (por ejemplo codificadas por un ADN depositado con el número de acceso 68629) en donde el dominio extracelular de CTLA4 se fusiona a una porción de inmunoglobulina (Ig) tal

22/33

como IgCy1 (IgCgamma), IgCy2 (IgCgamma2), IgCy3 (IgCgamma3),
IgCy4 (IgCgamma4), IgCμ(IgCmu), IgCα1 (IgCalfa1), IgCα2
(IgCalfa2), IgCδ(IgCdelta) o IgCε(IgCepsilon), haciendo la
molécula de fusión soluble, o fragmentos y derivados del
5 mismo; proteínas con el dominio extracelular de CTLA4
fusionado o unido con una porción de una proteína
biológicamente activa o químicamente activa tal como el
producto del gen E7 del virus del papiloma (CTLA4-E7), el
antígeno p97 asociado con el melanoma (CTLA4-p97) o la
10 proteína HIV (CTLA4.env gp 120) (como se describe en la
Patente de EUA No. 5,844,095 que se incorpora en la presente
como referencia en su totalidad) o fragmentos y derivados del
mismo; proteínas de fusión híbridas (quiméricas) tales como
CD28/CTLA4Ig (como se describe en la Patente de EUA No.
15 5,434,131 que se incorpora en la presente como referencia en
su totalidad). O fragmentos y derivados de los mismo;
moléculas CTLA4 con el dominio de transmembrana retirado para
hacer soluble a la proteína (Oaks, M. K., et al., 2000
Cellular Immunology 201:144-153, que se incorpora en la
20 presente como referencia en su totalidad) o fragmentos y
derivados de la misma. "Moléculas solubles CTLA4" también
incluye fragmentos, porciones o derivados de los mismos y
moléculas mutantes CTLA4 solubles que tienen una actividad de
enlace para CTLA4. Las moléculas CTLA4 solubles usadas en los
25 métodos de la invención pueden o no incluir una secuencia de

330/332

un péptido de señal (líder). Típicamente en los métodos, composiciones y/o kits de la invención, las moléculas no incluyen una secuencia de péptido de señal.

Como se usa en la presente, "dominio extracelular de CTLA4" es la porción de CTLA4 que reconoce y enlaza a los ligandos CTLA4, tales como las moléculas B7. Por ejemplo, un dominio extracelular de CTLA4 comprende la metionina en la posición +1 hasta el ácido aspártico en la posición +124 (Figura 23). De manera alternativa, un dominio extracelular de CTLA4 comprende la alanina en la posición -1 hasta el ácido aspártico en la posición +124 (Figura 23). El dominio extracelular incluye fragmentos o derivados de CTLA4 que se enlazan a una molécula B7. El dominio extracelular de CTLA4 como se muestra en la Figura 23 puede también incluir mutaciones que cambien la avidez de enlace de la molécula de CTLA4 para una molécula B7.

Como se usa en la presente, el término "mutación" significa un cambio en el nucleótido o en la secuencia de aminoácido de una molécula de tipo silvestre, por ejemplo, un cambio en el ADN y/o las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular CTLA4 de tipo silvestre. Una mutación en el ADN puede cambiar un codón que conduce a un cambio en la secuencia de aminoácido. Un cambio del ADN puede incluir substituciones, eliminaciones, inserciones, empalmes alternativos o truncamientos. Un cambio de aminoácidos puede incluir substituciones, eliminaciones, inserciones, adiciones truncamientos, o errores de procesamiento

33/33

o desdoblamiento de la proteína. Alternativamente, las mutaciones en una secuencia de nucleótidos pueden resultar en una mutación silente en la secuencia de aminoácidos como se entiende bien en el arte. A ese respecto, ciertos codones de

5 nucleótidos codifican al mismo aminoácido. Los ejemplos incluyen codones de nucleótidos CGU, CGG, CGC y CGA que codifican al aminoácido, arginina (R); o codones GAU y GAC que codifican el aminoácido, ácido aspártico (D). Así, se puede codificar una proteína por una o más moléculas de ácido nucleico que difieran

10 de su secuencia específica de nucleótidos pero que codifiquen todavía a moléculas de proteínas que tengan secuencias idénticas. La secuencia de codificación del aminoácido es como sigue:

15	Aminoácido	Símbolo	Símbolo de 1 letra	Codones
	Alanina	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
	Cisteína	Cys	C	UGU, UGC
	Ácido aspártico	Asp	D	GAU, GAC
	Ácido glutámico	Glu	E	GAA, GAG
20	Fenilalanina	Phe	F	UUU, UUC
	Glicina	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
	Histidina	His	H	CAU, CAC
	Isoleucina	Ile	I	AUU, AUC, AUA
25	Lisina	Lys	K	AAA, AAG

232 334

	Aminoácido	Símbolo	Símbolo de 1 letra	Codones
5	Leucina	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
	Metionina	Met	M	AUG
	Asparagina	Asn	N	AAU, AAC
	Prolina	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
10	Glutamina	Gln	Q	CAA, CAG
	Arginina	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
	Serina	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
15	Treonina	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
	Valina	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
	Triptofano	Trp	W	UGG
	Tirosina	Tyr	Y	UAU, UAC

La molécula mutante puede tener una o más mutaciones.

20 Como se usa en la presente, una "secuencia de proteína que no es de CTLA4" o "una molécula que no es de CTLA4" significa cualquier molécula de proteína que no se enlaza a B7 y no interfiere con el enlace de CTLA4 a su objetivo. La molécula que no es de CTLA4 unida a un dominio extracelular
25 de una molécula de CTLA4 puede alterar la solubilidad o

237-335

afinidad de la molécula de CTLA4. Un ejemplo incluye, pero no se limitan a, una región constante de inmunoglobulina (Ig) o porción de la misma. Preferentemente, la región constante Ig es una región constante Ig de humano o de mono por ejemplo C(gamma)1 humana, que incluye las regiones CH2 y CH3 y articulación. La región constante Ig se puede mutar para reducir sus funciones del efector (Patentes de EUA No. 5,637,481, 5,844,095 u 5,434,131).

Como se usa en la presente, "fragmento" o "porción" es cualquier parte o segmento de una molécula por ejemplo CTLA4 o CD28, preferentemente el dominio extracelular de CTLA4 o CD28 o una parte o segmento del mismo que reconoce y se enlaza a su objetivo por ejemplo una molécula B7.

Como se usa en la presente "B7" se refiere a la familia de moléculas B7 que incluyen, pero no se limitan a, B7-1 (CD80) (Freeman et al., 1989, J Immunol. 143:2714-2722, incorporada en la presente como referencia en su totalidad), B7-2 (CD86) (Freeman et al, 1993 Science 262:909-911 incorporada en la presente como referencia en su totalidad; Azuma et al, 1993 Nature 366:7679 incorporada en la presente como referencia en su totalidad) que pueden reconocer y enlazar a CTLA4 y/o CD28. Una molécula B7 se puede expresar en una célula B activada.

Como se usa en la presente "CD28" se refiere a una molécula que reconoce y enlaza a B7 como se describe en el

~~331~~ 336

número de serie BUA 5,580,756 y 5,521,288 (que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad).

Como se usa en la presente "células positivas B7" son algunas células con uno o más tipos de moléculas B7 expresadas en la superficie celular.

Como se usa en la presente, un derivado es una molécula que comparte una similitud de secuencia y actividad de su molécula precursora. Por ejemplo, un derivado de CTLA4 incluye una molécula soluble de CTLA4 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70% similar al dominio extracelular del CTLA4 de tipo silvestre, y que reconoce y enlaza a B7 por ejemplo el CTLA4 o la molécula mutante CTLA4 soluble L104EA29YIg. Un derivado significa cualquier cambio en la secuencia de aminoácidos y/o la calidad química del aminoácido por ejemplo análogos de aminoácidos.

Como se usa en la presente, para "regular" una respuesta inmune es activar, estimular, sobrerregular, inhibir, bloquear, subregular o modificar la respuesta inmune. Las enfermedades cardiovasculares aquí descritas se pueden tratar al regular una respuesta inmune por ejemplo, al regular las interacciones de células positivas CTLA4- y/o CD28- funcionales con células positivas B7. Por ejemplo, un método para la regulación de una respuesta inmune comprende poner en contacto la célula positiva B7 con una molécula CTLA4 soluble de la invención de la manera de formar complejos solubles

331 337

CTLA4/B7, la molécula soluble CTLA4 interfiere con la reacción de una molécula endógena CTLA4 y/o CD28 con la molécula B7.

Como se usa en la presente, "bloquear" o "inhibir" un receptor, señal o molécula, significa interferir con la activación del receptor, señal o molécula cuando se detecta por una prueba reconocida en el arte. Por ejemplo, el bloqueo de una respuesta inmune mediada por célula se puede detectar al determinar la reducción de los síntomas asociados con la enfermedad inmune. El bloqueo o inhibición puede ser parcial o total.

Como se usa en la presente, "el bloqueo de la interacción B7" significa interferir con el enlace de B7 con sus ligandos, tales como CD28 y/o CTLA4, con lo cual se obstruyen las interacciones de células positivas B7 o células T. Ejemplos de las moléculas que bloquean las interacciones B7 con CTLA4 y/o CD28 incluyen, pero no se limitan a moléculas tales como un anticuerpo (o porción o derivado del mismo) que reconoce y enlaza a cualquiera de las moléculas CTLA4, CD28 o B7 (por ejemplo B7-1, B7-2); una forma soluble (o porción o derivado del mismo) de las moléculas tales como el CTLA4 soluble; un fragmento de péptidos u otra molécula pequeña diseñada para interferir con una señal de célula a través de la interacción mediada por CTLA4/CD28/B7. En una modalidad preferida, el agente de bloqueo es una molécula

~~336~~ 338

soluble de CTLA4 tal como CTLA4Ig (ATCC 68629) o L10EA29YIg (ATCC PTA-2104), una molécula soluble CD28 tal como CD28Ig (ATCC 68628), una molécula B7 tal como C7Ig (ATCC 68627), un anticuerpo monoclonal anti-B7 (por ejemplo ATCC HB-253, ATCC 5 CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341 y anticuerpos monoclonales como se describen por Anderson en la Patente de EUA No. 6,113,898 o Yokochi et al., 1982. J. Immun., 128(2)823-827), un anticuerpo monoclonal anti-CTLA4 (por ejemplo, ATCC HB-304, y anticuerpos monoclonales como se 10 describen en las referencias 82-83). y/o un anticuerpo monoclonal anti-CD28 (por ejemplo ATCC HB 11944 y mAb 9.3 como se describe por Hanse (Hansen et al., 1980. Immunogenetics 10: 247-260) or Martín (Martín et al., 1984. J. Clin. Immun., 4(1):18-22)). También se incluyen moléculas 15 pequeñas que bloquean las interacciones de B7 con CTLA4 y/o CD28. El bloqueo de las interacciones de B7 se pueden detectar por pruebas reconocidas en el arte tales como determinar la reducción de la enfermedad inmune (por ejemplo, enfermedad cardiovascular) o enfermedad inflamatoria en los 20 síntomas asociados, al determinar la reducción en las interacciones de células B7/célula T o al determinar la reducción en la interacción B7 con CTLA4 y/o CD28. El bloqueo puede ser parcial o total.

Como se usa en la presente, un "cantidad efectiva de una 25 molécula" se define como una cantidad que bloquea la

~~337~~ 339

interacción de la molécula con su ligando. Por ejemplo, una cantidad efectiva de una molécula que bloquea la interacción B7 con CTLA4 y/o CD28 se puede definir como la cantidad de la molécula la cual cuando se enlaza a las moléculas B7 en las células positivas B7 inhibe las moléculas B7 de los ligandos de enlace endógenos tales como CTLA4 y CD28. Alternativamente, una cantidad efectiva de una molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/o CD28 se puede definir como la cantidad de la molécula que cuando se enlaza a las molécula CTLA4 y/o CD28 en las células T inhibe las moléculas B7 a partir de los ligandos de enlace endógenos tales como CTLA4 y CD28. La inhibición o bloqueo puede ser parcial o completo.

Como se usó aquí, "tratar" una enfermedad significa manejar una enfermedad mediante terapias medicinales o de otro tipo. El tratamiento de una enfermedad puede mejorar o aliviar los síntomas de una enfermedad, reducir la severidad de una enfermedad, alterar o prevenir el curso de la progresión de la enfermedad, prevenir la ocurrencia de la enfermedad, y/o mejorar o aliviar o curar el problema de enfermedad básico. Los síntomas de enfermedad cardiovascular incluyen, pero no están limitados a: arritmias; dolor de pecho; isquemia miocárdial; angina; tolerancia al ejercicio reducido; disnea en ejercicio; disnea nocturna paroxismal, claudicación; ataques isquémicos pasajeros y calidad de vida.

~~328~~
340

Por ejemplo, para tratar una enfermedad cardiovascular se puede efectuar por regulación de una respuesta inmune por ejemplo, por regulación funcional de funciones de células positivas CTLA4- y/o CD28- con células positivas.

5 Alternativamente, el tratamiento de una enfermedad cardiovascular se puede efectuar mediante prevención de la enfermedad de ocurrir o progresar a través del uso de las composiciones descritas aquí.

Como se usa aquí, la "enfermedad cardiovascular" tiene
10 el significado comúnmente usado en el campo, que incluye, pero sin limitación, las siguientes enfermedades o condiciones: trastornos tromboembólicos, trastornos tromboembólicos cardiovasculares arteriales que incluyen, trastornos tromboembólicos cardiovasculares venosos, y
15 trastornos tromboembólicos en las cámaras del corazón; arteriosclerosis; restenosis; enfermedad arterial periférica; cirugía de injerto de desviación coronaria; enfermedad de arteria carótida; arteritis; miocarditis; inflamación cardiovascular; inflamación vascular; enfermedad coronaria
20 del corazón (CHD); angina inestable (UA); angina refractaria inestable; angina estable (SA); angina estable crónica; síndrome coronario agudo (ACS); infarto al miocardio primero o recurrente; infarto al miocardio agudo (AMI); infarto al miocardio; infarto al miocardio de onda no Q; infarto al
25 miocardio no STE; enfermedad de arteria coronaria; isquemia

35 341

cardiaca; isquemia; muerte repentina isquémica; ataque isquémico pasajero; apoplejía; aterosclerosis; enfermedad arterial oclusiva periférica; trombosis venosa; trombosis de vena profunda; tromboflebitis; embolismo arterial; trombosis 5 arterial coronaria; trombosis arterial cerebral; embolismo cerebral; embolismo de riñón; embolismo pulmonar; trombosis que resulta de (a) válvulas prostéticas u otros implantes, (b) catéteres permanentes, (c) endoprótesis vasculares, (d) derivación cardiopulmonar, (e) hemodiálisis, o (f) otro 10 procedimiento en el cual la sangre se expone a una superficie artificial que promueve trombosis; trombosis que resulta de aterosclerosis, cirugía o complicaciones quirúrgicas, inmovilización prolongada, fibrilación arterial, trombofilia congénita, cáncer, diabetes, efectos de medicamentos u 15 hormonas, y complicaciones de embarazo; arritmias cardíacas que incluyen arritmias supraventriculares, arritmias auriculares, flúter auricular, fibrilación auricular; otras enfermedades enlistadas en Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 2 Volume Set, 6th Edition, 2001, 20 Eugene Braunwald, Douglas P. Zipes, Meter Lobby, Douglas D. Zipes.

Las enfermedades cardiovasculares preferidas son: aterosclerosis; enfermedad coronaria del corazón (CHD); restenosis; enfermedad arterial periférica; cirugía de 25 injerto de desviación coronaria; enfermedad de arteria

~~340~~ 342

carótida; arteritis; miocarditis; inflamación cardiovascular; inflamación vascular; angina inestable (UA); angina refractaria inestable; angina estable (SA); angina estable crónica; síndrome coronario agudo (ACS); infarto al

5 miocardio; infarto al miocardio agudo (AMI); que incluye infarto al miocardio primero o recurrente; infarto al miocardio de onda no Q; infarto al miocardio de elevación no ST, e infarto al miocardio de elevación de segmento ST.

Las enfermedades cardiovasculares más preferidas son:

10 aterosclerosis; enfermedad coronaria del corazón (CHD); angina inestable (UA); angina refractaria inestable; angina estable (SA); angina estable crónica; síndrome coronario agudo (ACS); infarto al miocardio; infarto al miocardio agudo (AMI); que incluye infarto al miocardio primero o recurrente;

15 infarto al miocardio de onda no Q; infarto al miocardio de elevación de segmento no ST, e infarto al miocardio de elevación de segmento ST.

Como se usa en la presente, "terapia génica" es un proceso para tratar una enfermedad mediante manipulación

20 genética. La terapia génica involucra la introducción de una molécula de ácido nucleico dentro de una célula y la célula expresa un producto de gen codificado mediante la molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, como es bien conocido por aquellos expertos en la técnica, la introducción de la

25 molécula de ácido nucleico dentro de una célula se puede

realizar mediante introducción de un vector de expresión que contenga la molécula de ácido nucleico de interés dentro de las células ex vivo o in vitro mediante una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo, precipitación de fosfato de calcio, dextrano dietiaminoetilo, polietilén glicol (PEG), electroporación, inserción directa, lipofección o infección viral (Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning; A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989); Kriegler M. Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (W. H. Freeman and Co, New York, N. Y. 1993) y Wu, Methods in Enzymology (Academia Press, New York, 1993), cada uno de los cuales está incorporada aquí por referencia). Alternativamente, las secuencias de nucleótido de interés pueden ser introducidas dentro de una célula in vivo usando una variedad de vectores y mediante una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo, administración directa del ácido nucleico dentro a un sujeto (Williams y colaboradores, 1991 PNAS 88:2726-2730); o inserción de la molécula de ácido nucleico dentro de un vector viral, producción del virus recombinante o partícula viral, e infección del sujeto con el virus recombinante (Battleman y colaboradores, 1993 J Neurosci 13:94-951; Carroll y colaboradores, 1993 J Cell Biochem 17E:241; Lebkowski y colaboradores, Patente de EUA No. 5,354, 678; Davison y Elliorr, Molecular Virology: A Practical Approach (IRL Press, New York, 1993)). Otros

512344

métodos usados para transferir in vivo incluyen encapsulación del ácido nucleico^{no} en liposomas, e introducción directa de los liposomas, o liposomas combinados con un virus Sendai de Hemaglutinación, en un sujeto (Patente de EUA No. 5,824,655),
5 incorporada aquí por referencia). Las células transfectadas o infectadas expresan los productos de proteína codificados mediante el ácido nucleico con el propósito de mejorar una enfermedad o los síntomas de una enfermedad.

Como se usa en la presente, "aliviar" se refiere a
10 disminuir o hacer menos severo, uno o más de los síntomas de una enfermedad, así como uno o más síntomas de una enfermedad cardiovascular, que incluye pero no está limitada a: disritmias; dolor de pecho isquemia miocárdial; angina; tolerancia al ejercicio reducido; fatiga; disnea en
15 ejercicio; disnea nocturna paroxismal, claudicación; ataques isquémicos pasajeros y calidad de vida.

Con el propósito de que la invención aquí descrita pueda ser entendida más completamente se establece la siguiente descripción. -

20

Composiciones y Métodos de la Invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos para tratar enfermedades cardiovasculares por administración a un sujeto de una cantidad efectiva de una
25 molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/o CD28.

~~345~~ 345

Por ejemplo, los ligandos incluyen: moléculas CTLA4 solubles (tales como moléculas CTLA4Ig, CTLA4-E7, CTLA4-p97, CTLA4-env gp120, y CTLA4 mutantes tales como CTLA4/CD28Ig, L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg y/o L104EA29WIIg),
5 moléculas CD298 solubles, moléculas B7-1 solubles, moléculas B7-2 solubles, y anticuerpos monoclonales que reconocen y enlazan B7, CD28 y/o CTLA4 (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-CTLA4, un anticuerpo monoclonal anti-CD28, un anticuerpo monoclonal anti-B7-1 o un anticuerpo monoclonal
10 anti-B7-2.

Una cantidad efectiva de una molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/o CD28 se puede definir como la cantidad de anticuerpos monoclonales anti-B7, moléculas CTLA4 soluble y/o CD28 soluble que, cuando enlaza a moléculas B7 en
15 células positivas B7 inhiben moléculas B7 de enlazar ligandos endógenos tales como CTLA4 y CD28. La inhibición puede ser parcial o completa.

Alternativamente, una cantidad efectiva de una molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/ CD28 se puede
20 definir como la cantidad de anticuerpo monoclonal anti-CTLA4, anticuerpo monoclonal anti-CD28 o moléculas B7 (B7-1 ó B7-2) solubles que, cuando enlazan a moléculas CTLA4 y/o CD28 en células T, inhiben a las moléculas B7 de enlazar ligandos endógenos tales como CTLA4 y CD28. La inhibición puede ser
25 parcial o completa.

~~344~~ 346

Una cantidad efectiva de una molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/o CD28 es una cantidad de alrededor de 0.1 hasta 100 mg/kg de peso de un sujeto. En otra modalidad la cantidad efectiva es una cantidad de

5 alrededor de 0.5 hasta 100 mg/kg de peso de un sujeto, 0.5 hasta 5 mg/kg de peso de un sujeto, 0.1 hasta 5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 5 hasta 10 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 10 hasta 15 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 15 hasta 20 mg/kg de peso de un sujeto,

10 alrededor de 20 hasta 25 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 25 hasta 30 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 30 hasta 35 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 35 hasta 40 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 40 hasta 45 mg/kg de peso de un sujeto,

15 alrededor de 45 hasta 50 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 50 hasta 55 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 55 hasta 60 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 60 hasta 65 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 65 hasta 70 mg/kg de peso de un sujeto,

20 alrededor de 70 hasta 75 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 75 hasta 80 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 80 hasta 85 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 85 hasta 90 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 90 hasta 95 mg/kg de peso de un sujeto,

25 alrededor de 95 hasta 100 mg/kg de peso de un sujeto.

347

En una modalidad, la cantidad efectiva de una molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/o CD28 es una cantidad de alrededor de 2 mg/kg hasta alrededor de 10 mg/kg de peso de un sujeto. La cantidad preferida es 10 mg/kg de peso de un sujeto. En otra modalidad, la cantidad efectiva es una cantidad de alrededor de 0.1 hasta 4 mg/kg de peso de un sujeto. En una modalidad la cantidad efectiva es una cantidad de alrededor de 0.1 hasta 0.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 0.5 hasta 1.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 1.0 hasta 1.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 1.5 hasta 2.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 2.0 hasta 2.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 2.5 hasta 3.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 3.0 hasta 3.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 3.5 hasta 4.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 4.0 hasta 4.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 4.5 hasta 5.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 5.0 hasta 5.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 5.5 hasta 6.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 6.0 hasta 6.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 6.5 hasta 7.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 7.0 hasta 7.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 7.5 hasta 8.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 8.0 hasta 8.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 8.5 hasta 9.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 9.0 hasta 9.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 9.5 hasta 10.0 mg/kg de peso de un sujeto.

~~346~~ 348

En otra modalidad, la cantidad efectiva es una cantidad de alrededor de 0.1 hasta 20 mg/kg de peso de un sujeto. En otra modalidad la cantidad efectiva es una cantidad alrededor de 0.1 hasta 2 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 2 hasta 4 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 4 hasta 6 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 6 hasta 8 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 8 hasta 10 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 10 hasta 12 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 12 hasta 14 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 14 hasta 16 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 16 hasta 18 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 18 hasta 20 mg/kg de peso de un sujeto.

En otra modalidad, la cantidad efectiva es alrededor de 2 mg/kg de peso de un sujeto. En todavía otra modalidad, la cantidad efectiva es alrededor de 10 mg/kg de peso de un sujeto.

En una modalidad específica, la molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/o CD28 es una molécula CTLA4 soluble y la cantidad efectiva de una molécula CTLA4 soluble es alrededor de 2 mg/kg de peso de un sujeto. En otra modalidad específica, la cantidad efectiva de una molécula CTLA4 soluble es alrededor de 10 mg/kg de peso de un sujeto. En otra modalidad específica, una cantidad efectiva de un CTLA4 es 500 mg para un sujeto que pesa menos que 60 kg, 750 mg para un sujeto que pesa entre 60-100 kg, y 1000 mg para un sujeto que pesa más que 100 kg.

Una cantidad efectiva de la molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/o CD28 es CTLA4 soluble se

345 349

puede administrar a un sujeto diariamente, semanalmente, mensualmente y/o anualmente, en ocasiones únicas o múltiples por hora/día/semana/mes/año, dependiendo de la necesidad. Por ejemplo, en una modalidad, la molécula puede inicialmente ser administrada una vez cada dos semanas por un mes, y luego una vez todos los siguientes meses.

En una modalidad preferida, la enfermedad cardiovascular es; aterosclerosis; enfermedad coronaria del corazón (CHD); angina inestable (UA); angina refractaria inestable; angina estable (SA); angina estable crónica; síndrome coronario agudo (ACS); infarto al miocardio primero o recurrente; infarto al miocardio agudo (AMI); infarto al miocardio; infarto al miocardio de onda no Q; infarto al miocardio de no STE.

Aquí (Ejemplos 3-7) se presentan datos clínicos que soportan el uso de moléculas que bloquean interacciones de CD28-B7 en la prevención o tratamiento de enfermedades cardiovasculares. En estudios clínicos para RA, la CTLA4Ig tiene disminuido CRP, IL-6, y TNF- α , todos los marcadores de inflamación que también se correlacionan con enfermedades cardiovasculares. Estos hallazgos sugieren que un mecanismo novedoso de acción-bloqueo del camino CD28-B7 - puede ser útil para tratar enfermedades cardiovasculares. Más estudios se discuten en los Ejemplos 8 y 9. Presentamos como nuestra invención, los métodos para tratamiento de enfermedades

348 350

cardiovasculares mediante administración a un sujeto de una cantidad efectiva de una molécula que bloquea interacciones de B7 con CTLA4 y/o CD28.

Mientras algunos datos de soporte discutidos aquí para este nuevo método de tratamiento de enfermedades cardiovasculares se derivan de la literatura médica publicada, nuestra invención no se reduce. El concepto que la inmunología/inflamación puede jugar un rol crítico en enfermedades cardiovasculares es un cambio de paradigma relativamente reciente e incompleto. Lo amplio de la investigación a través de cardiología, inmunología y enfermedades infecciosas es sustancial, así descubrimientos en un campo no se vuelven integrados a través de lo dividido de estas disciplinas. A la inversa, una vez que se hace un nuevo descubrimiento sus implicaciones en tratamientos y mecanismos completos de acciones pueden no ser transparentes inmediatamente para investigadores/científicos. Adicionalmente, se ha reportado en un estudio que la población de células T dominantes en pacientes con USA fueron células CD4⁺CD28^{null} (Ref: Circulation 2000; 102:2883-2888). Este hallazgo sugiere que la interferencia con CD28-B7 mediada por señalización podría no ser eficaz en pacientes UA.

La inhibición de la interacción CD28-B7, tal como por CTLA4Ig o L104EA29YIg, para reducir morbilidad

351

cardiovascular y mortalidad o mejorar la función cardiovascular y la calidad de vida es nueva. El uso de estos agentes a través del espectro de enfermedades cardiovasculares se soporta mediante: (1) semejanzas
5 celulares y bioquímicas entre pacientes con artritis reumatoide (RA) y aterosclerosis/angina inestable; (2) el mecanismo de acción de CTLA4Ig y L104EA29YIg aparentemente adecuado para la invención en enfermedades cardiovasculares; (3) efectos antiinflamatorios de CTLA4Ig
10 y/o L104EA29YIg en modelos animales y estudios clínicos presentados aquí; (4) recientemente reportado el hallazgo en la importancia de interacción B7-CD28 en aterosclerosis. Muchos de estos datos existen en estudios preclínicos diferentes (modelos celulares y animales),
15 además en estudios clínicos presentados aquí, y se resumen a continuación.

(1) Semejanzas celulares y bioquímicas entre
pacientes con artritis reumatoide y
20 aterosclerosis/angina inestable.

Existen unas semejanzas bioquímicas y celulares entre estos dos procesos patológicos (Tabla 1). Adicionalmente, las muertes prematuras de pacientes con RA se han ligado recientemente a síndromes coronarios agudos (Refs: J
25 Rheumatology 199; 16:2562-2571; Rheumatology 1999;38:668-674).

~~31~~ 352

TABLA 1

**Semejanzas Bioquímicas y Celulares Entre Artritis Reumatoide
y Ateroesclerosis/Angina Inestable**

	Ateroesclerosis/ Angina Inestable	Artritis Reumatoide
Semejanzas Bioquímicas		
Factor- α de Necrosis de Tumor (TNF- α)	↑	↑
Expresión de metaloproteinasa	↑	↑
Interleucina-6 (IL-6)	↑	↑
Proteína C-reactiva (CRP)	↑	↑↑
Adhesión de moléculas (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, P- selectina)	↑	↑
Endotelina	↑	↑
Semejanzas Celulares		
Activación de mastocito	↑	↑
Activación de células T	↑	↑
Activación de células B	0 ó ↑	0 ó ↑
Antígenos Posibles		

353

	Ateroesclerosis/ Angina Inestable	Artritis Reumatoide
Proteínas de choque por calor (HSP)	Reportado	Reportado
Agentes de infección	Reportado	Reportado
LDL Oxidizado	Reportado	
Colágeno II		Reportado
Antígenos de cartílago		Reportado

10

Notas: Adaptado de Paceri y Teh, (Ref: Circulation 1999; 100:2124-2126). Los símbolos 0 denotan que no hay incremento o decremento apreciable de las poblaciones de control; + denota incremento en parámetro de poblaciones de control; Reportado denota presencia de evidencia de soporte disponible en la literatura médica.

20

Estas semejanzas sugieren que podría haber procesos patofisiológicos comunes esenciales en cada una de estas enfermedades.

(2) El mecanismo de acción de CTLA4Ig y L104EA29YIg parece apropiado para intervención en enfermedades cardiovasculares.

Las células T están presentes en ateroma temprano además de placas vulnerables/rotas

38 354

Estas son líneas de evidencia que soportan la noción de que la activación de las células T es importante a través del espectro de enfermedades cardiovasculares de aterosclerosis para ruptura de placa aguda. Las células T están entre las células más comunes presentes en lesiones ateroscleróticas humanas (REF: New Engl J Med 1999; 340:115-126) y están presentes en ambas lesiones tempranas y en placas vulnerables o rotas. Estudios patológicos de placas vulnerables o rotas han mostrado que las células T (mayormente CD4⁺) están presentes y localizadas en la región del hombro de la lesión de ateroma- el sitio más probable de erosión de tejido (Refs: Am. J. Cardiol. 1991; 68: 36B-50B. Circulación 1994; 89:36-44).

15 *Las citocinas elaboradas por células T están equilibradas para promover inflamación y ruptura de placas*

Las células T se sabe que secretan citocinas inflamatorias que incluyen interferon- γ (INF- γ); TNF α , e interleukin-2(IL-2) (Refs: Aterosclerosis 1986;6:131-138. J Clin Invest 1985;76:125-131). Las acciones de las células T en placas de ateroma se piensa que son de dos veces. Primero, las células T pueden regular las acciones de los macrófagos que a su vez se cree que liberan las enzimas digestivas, rompen la matriz que cubre y la capa del músculo liso, y promueven la ruptura de la placa. Secundariamente, las

2/7 355

células T pueden producir directamente una reducción de la síntesis de colágeno en las capas fibrosas de ateroma mediante secreción de IFN- γ a las células del músculo del tejido vascular. Colectivamente, estas actividades de las células T se cree que representan un proceso coordinado que promueve la inestabilidad y ruptura de la placa de ateroma.

Dentro del ateroma, las células T se activan in situ a un grado que es paralelo a la severidad de los síntomas clínicos

10 Las células T no solamente están presentes en ateroma, sino que también existe evidencia para su activación in situ dentro de estas lesiones. En un estudio de activación de célula T en ateroma coronario, van der Wal y colaboradores, han demostrado para especímenes de aterectomía que las células T están
15 activadas como evidenciado por la expresión del receptor IB-2 (IL-2r) y la secreción IL-2 (Ref: Heart 1998; 80:14-18). El aumento en la expresión de la célula T de IL-2r en este estudio fue en proporción a la severidad de los síntomas clínicos de pacientes que sufren aterectomía. La Figura 87 muestra el
20 porcentaje de células T activadas en especímenes de aterectomía.

El HSP60 u otros antígenos novedosos pueden promover directamente inflamación cardiovascular

Estudios han sugerido una posible liga entre agentes
25 infecciosos y el establecimiento de enfermedades

356

cardiovasculares. Un sinnúmero de agentes infecciosos han sido sugeridos incluyendo, *Chlamydia pneumoniae* (Cp), *Helicobacter pylori*, citomegalovirus (CMV), adenovirus, virus coxsackie, varios Herpesviridae, y una variedad de infecciones dentales han sido ligadas a CHD. La evidencia que soporta la causalidad entre estos agentes con respecto a aterosclerosis coronaria, sin embargo, varía ampliamente. *C. pneumoniae*, un patógeno respiratorio humano, se ha encontrado más a menudo en asociación con CHD.

El papel de elevación persistente de CRP, y la presencia de anticuerpos para *C. pneumoniae* (Cp) o anticuerpos para humanos HSP60 (hu-HSP60) se ha investigado en un estudio de control de caso anidado del Helsinki Heart Study (Ref: Circulation 2003; 107:2566-2570). Este estudio, una prueba de prevención primaria controlada de placebo de doble ciego potencial, sorteó 4081 sujetos y observó 241 eventos coronarios (muerte coronaria o MI no fatal) durante uno 8.5 años de investigación. Se investigó la importancia de seropositividad persistente (como se definió por una elevación de CRP, anticuerpos de suero a Cp o anticuerpos de suero a hu-HSP60 en la línea base y de 3 a 6 meses anteriores al índice de evento coronario) para la predicción de eventos coronarios subsiguientes (Tabla 2).

31/352

TABLA 2

Relaciones Probables (OR) para el Desarrollo de Enfermedad Coronaria o MI No Fatal con Persistencia de Factores de Riesgo en el Estudio de Corazón de Helsinki.

5		OR No Ajustado (95% CI)	OR Ajustado (95% CI)
	CRP-		
	Cp-	1	1
10	Cp+	1.55 (0.85-2.80)	1.62 (0.87-3.00)
	CRP+		
	Cp-	2.36 (1.16-4.79)	1.96 (0.92-4.18)
	Cp+	5.38 (2.32-12.46)	4.47 (1.84-10.83)
	CRP-		
15	Hu-HSP60-	1	1
	Hu-HSP60+	0.92 (0.46-1.85)	0.87 (0.42-1.80)
	CRP+		
	Hu-HSP60-	2.07 (1.04-4.14)	1.78 (0.85-3.74)
20	Hu-HSP60+	6.06 (2.23-16.47)	4.36 (1.53-12.39)

Estos datos indican que en una población de individuos masculinos de edad media con enfermedad coronaria del corazón no conocida, la seropositividad elevada persistentemente para Cp o hu-HSP60 cuando está presente con un CRp elevado, predijo eventos coronarios

356 358

subsiguientes (Tabla 2). De observar, los pacientes quienes fueron persistentemente CRP+, CP+, y hu-HSP60+ tuvieron una OR ajustada de 16.87 (2.06-137.9) para el desarrollo de los eventos coronarios subsiguientes.

5 Solamente los pacientes de control 1/138 encontraron este criterio para una elevación persistente en todos los 3 marcadores, considerando que 17 estuvieron identificados en casos de índice. Estos hallazgos sugieren la presencia de factores de riesgo antigénico novedoso para la
10 identificación prospectiva de individuos en riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares.

Un estudio reciente separado, reporta que la proteína de choque de corazón clamidial 60 (Cp-HSP60) está fuertemente asociada con ACS (Ref: Biasucci, y
15 colaboradores, Circulation 2003; 107:3015-3017). A diferencia de los pacientes asintomáticos en el Helsinki Heart Study, este estudio investigó pacientes en el otro extremo del espectro CHD. En este estudio, 219 pacientes ingresados a la Unidad de Cuidados Coronarios (CCU, por sus
20 siglas en inglés) con ya sea UA (Braundwald Class IIIb) o AMI fueron comparados con pacientes sanos o pacientes con angina estable (SA). La presencia de una respuesta de anticuerpo en pacientes para Cp-HSP60 (anti-Cp-HSP60) se midió en 100 sujetos de control, 40 sujetos con SA, 179
25 sujetos con UA, y 40 sujetos con AMI (Tabla 3).

318
359

TABLA 3

Características Serológicas de la Población de Estudio como se Reportó por Biasucci, y colaboradores.

	Sujetos de Control (N=100)	Pacientes de Angina Estable (N=40)	Pacientes de Angina Inestable (N=179)	Pacientes de AMI (N=40)
5 Seropositividad Cp	30%	60%	68%	65%
Seropositividad HSP60	0%	20%	98%	99%
10 CRP > 3 mg/dL	8%	25%	59%	62%
CRP mediano, mg/dL	1.4	2.1	5.05	6.02

Nota: El anticuerpo usado para determinación de seropositividad de HSP60 en este estudio no discrimina entre
15 Cp-HSP60 y hu-HSP60. Debido a que este carece de especificidad estos datos no soportan una asociación directa entre la respuesta del anti AHP60 y la infección.

Los hallazgos anteriores son soporte de la idea de que existe una respuesta antigénica específica en pacientes con
20 UA y AMI. Estos dos estudios representan extremos de poblaciones de pacientes en el espectro de enfermedad cardiovascular. El Helsinki Heart Study muestra que pacientes sin historia de enfermedades coronarias de corazón (u otras mayores) pueden ser identificados como que tienen un riesgo
25 aumentado de muerte coronaria o MI no fatal basado en

~~258~~ 360

elevación de CRP y una respuesta de anticuerpo persistente para Cp o hu-HSP60. La preponderancia de estos factores de riesgo en una población de prevención primaria de salud, sin embargo, fue baja. En contraste absoluto, los pacientes en el estudio por Biasucci, y colaboradores, indica que la seropositividad de HSP60 es cercanamente universal en pacientes con UA o AMI. Además, la presencia de seropositividad de 20% para HSP60 en pacientes con angina estable sugiere que una relación clasificada puede existir entre la presencia de anticuerpos para HSP-60 y eventos cardiovasculares.

La respuesta antigénica a HSP60 está mediada a través de interacción de CD28-B7

En modelos animales, los macrófagos (un tipo de célula común en ateroma humano) se han identificado como el principal inductor de IFN- γ en células T en administración de ya sea ratón o hu-HSP60 (Ref: Int. Immunol. 2002;14:1247-1253). Este proceso aparenta ocurrir a través de un modelo de "dos señales" clásico para activación de célula T que involucra los caminos de CD28-B7. En este modelo, la activación de células T mediante ya sea murino o hu-HSP60 se bloquea por administración de CTLA4Ig (Ref: Int. Immunol. 2002;14:1247-1253). Dadas las homologías de secuencia alta entre humano, murino, clamidial y proteínas de choque de

31/361

corazón bacterial, este hallazgo puede ser conservado a través de la especie. En efecto, posiblemente esta homología alta entre los HSP de agentes infecciosos y hu-HSP que pueden servir para promover autoinmunidad a través de imitación molecular.

Señalización de HSP60 a través de CD28-B7 puede permitirse una oportunidad para intervención en enfermedad humana

Parecen haber un número de semejanzas entre los modelos preclínicos que rodean HSP60 y aquellas pruebas clínicas antes mencionadas (Helsinki Heart Study; Biasucci y colaboradores). Primero, los modelos murinos han mostrado que la respuesta autoinmune más fuerte (esto es, la proliferación de célula T y producción de anticuerpo para el mismo HSP60) se logra solamente mediante administración concurrente de ambos murino (el mismo) HSP60 y Cp-HSP60 (Ref: Infection and Immunity 1997; 65: 1669-1674). Este hallazgo preclínico en un modelo animal no relacionado es muy similar al hallazgo observado en el grupo de riesgo alto en el Helsinki Heart Study. De observar, la colocalización de Cp-HSP60 y hu-HSP60 dentro en placas de ateroma humano se han reportado (Refs: Circulation 1998;98:300-307. J Infect Dis 1997;176:292-295). En estas placas, HSP60 puede regular subsiguientemente TNF- α , la expresión de metaloproteínasa de matriz y las células de endotelio activo y músculo liso (Ref: Circulation

72
362

2003;107:3015-3017). En adición, la co-administración de ambos HSP60 murino y Cp-HSP60 en este modelo animal resulta en una decadencia de 6 veces en producción IL-10 de linfocitos y un incremento de 12 veces en la relación de producción de IFN- γ /IL-10. La decadencia coincidente en niveles IL-10 puede traducirse en unas observaciones significativas clínicamente como concentraciones de IL-10 de suero bajas han sido asociadas con un riesgo dependiente de concentración de muerte siguiendo AMI (Ref: Heeschen, y colaboradores, Circulation 2003; 107:2109-2114). Dados los paralelismos entre estos estudios de animales y datos de pruebas clínicas, la inhibición de la señalización de CD28-B7 a través del uso de CTLA4Ig o L104EA29YIg puede representar una intervención racional mecanísticamente específica para prevención y/o tratamiento de enfermedad cardiovascular.

El uso de CTLA4Ig o L104EA29YIg para prevención y/o tratamiento de enfermedad cardiovascular puede no estar limitada a HSP60

El HSP60 sirve como un modelo hipotético para la explicación mecanística de CTLA4Ig o L104EA29YIg en la prevención y/o tratamiento de enfermedad cardiovascular. Sin embargo HSP60, no representa una estimulación antigénica única que pueda ser interrumpida por el tratamiento de CTLA4Ig o L104EA29YIg. Por ejemplo, la evidencia

~~361~~ 363

epidemiológica reciente del Women's Health Study (Ref: Circulation 2001; 104:2266-2268) y los datos de observación del estudio de CAPTURE (Ref: NEJM 2003; 348-1104-1111) han demostrado independientemente la existencia de un aumento clasificado y continuo en riesgo cardiovascular (muerte o infarto al miocardio no fatal) basado en niveles de CD40L de suero. Consecuentemente, las interacciones CD40-CD40L se están volviendo reconocidas como mediadores importantes de inflamación en enfermedad cardiovascular. También existe evidencia que sugiere interacciones entre los caminos CD28-B7 y caminos CD40-CD40L en pacientes con angina inestable. Específicamente, esto ha demostrado que la CD40L que expresa (CD40L+) células T están presentes en lesiones de ateroma (Ref: Proc. Natl. Acad. Sci. 1997; 94:1931-1936). La ligación in vitro de CD40 en células asociadas a ateroma han mostrado incrementar la producción de citocinas pro-inflamatorias, metaloproteinasas de matriz, moléculas de adhesión, y factor de tejido (Ref: Nature 1998;394:200-203). En otros sistemas de modelo, la interacción de CD40 con CD40L en células que presentan antígeno (APC) aumenta la expresión de B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86)-las moléculas estimuladoras para CD28- mediada de activación de célula T (J. Immunol. 2000;165:3506-3518). Además, el tratamiento ex vivo de células T de pacientes con angina inestable que usa anticuerpos estimuladores contra CD3 y CD28 estimula la liberación de las CD40L (Ref: Circulation

38 364

1999;100:614-620). Juntas, estas observaciones pueden sugerir que los caminos que señalan CD28-B7 y CD40-CD40L pueden trabajar colectivamente para promover condiciones que predisponen a progresión y ruptura de placa aterosclerótica.

- 5 Además, la interferencia con este proceso a través del uso de CTLA4Ig o L104EA29YIg puede ser benéfica terapéuticamente. Finalmente, otros, todavía no descubiertos, procesos mediados de CD28-B7 (posiblemente antígenos relacionados con isquemia novedosos, ver a continuación) pueden tener papeles
- 10 importantes en enfermedad cardiovascular; uso de CTLA4Ig o L104EA29YIg en estos procesos puede ser útil clínicamente.

(3) Efectos anti-inflamatorios de CTLA4Ig y/o L104EA29YIg en modelos animales y estudios clínicos.

- 15 La inhibición de señalización de CD28-B7 en modelos de animales de isquemia renal sugiere que los mismos antígenos novedosos son importantes en isquemia

Los efectos de CTLA4Ig en inhibición de isquemia/lesión de repercusión se han evaluado en un modelo de rata (Ref: J Clin Invest 1997;100:1199-1203). En este modelo, las ratas sometidas a una nefrectomía unilateral y el riñón contralateral se volvió a hacer isquémico por 45 minutos. La coadministración de CTLA4Ig, pero no la inmunoglobulina de control, bloqueó grandemente la infiltración de células

20 CD4+T, macrófagos, y células de histocompatibilidad mayor II

25

363 365

(MHC) en el riñón isquémico. Coincidente con este hallazgo, fue una reducción de citocinas inflamatorias "Th1" (IL-2, IFN- γ , IL2r), citocinas asociadas con macrófago (TNF- α , IL-6, y sintetasa de óxido nítrico inducible), y quimioatrayentes/factores de crecimiento (MCP-1, RANTES, TGF β). En adición a estos hallazgos, la CTLA4Ig abroga casi completamente la disfunción renal temprana (esto es, elevaciones de creatinina en plasma) o tarde (esto es, mediciones de proteína en orina). Lo que se descubre particularmente acerca de esta observación es la capacidad de la CTLA4Ig para inhibir este proceso en un modelo que carece de aloantígeno. Establecido alternativamente, la inhibición de interacciones CD28-B7 en un modelo, no de transplante de isquemia renal, se proporciona por administración de CTLA4Ig y sugiere que los mismos antígenos novedosos que actúan a través de las trayectorias de CD28-B7 son importantes en lesión isquémica. La eficacia en este modelo animal es soporte de un papel para el uso de CTLA4Ig en modelos de isquemia coronaria que probablemente tiene alguna fisiología paralela.

Los aspectos antiinflamatorios de CTLA4Ig y L104EA29YIg son consistentes con su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedad CV

Los datos presentados aquí (Ejemplos 3-7) para el

~~366~~ 366

desarrollo clínico de CTLA4Ig y L104EA29Ig en pacientes con RA son alentadores con respecto a alteraciones favorables en marcadores inflamatorios. Es de interés que pacientes con RA y pacientes con aterosclerosis o UA tienen un sinnúmero de semejanzas bioquímicas, celulares y antigénicas (ver anteriormente, Tabla 1). En el programa de desarrollo clínico de fase II en RA varios marcadores de inflamación (CRP, IL-6, TNF- α) que están repartidos en pacientes con UA se midieron. En pacientes con RA, la administración de CTLA4Ig en ya sea 2 mg/kg o 10 mg/kg resultó en una disminución dependiente de la dosis en CRP- IL-6, TNF- α a los 180 días comparado con el placebo. Ver figuras 52, 55 y 56. Este efecto aparenta ser durable y fue demostrado que persiste durante todos los 360 días de tratamiento con CTLA4Ig. Ver figuras 85, 86A, y 86 B. Más estudios se discuten en los Ejemplos 8 y 9.

(4) Hallazgos reportados recientemente sobre la importancia de las interacciones B7-CD28 en aterosclerosis

Desde la presentación de la solicitud de la patente a la cual esta solicitud de patente reivindica prioridad, han aparecido dos reportes en la literatura científica que soportan fuertemente el papel de las interacciones CD28-B7 en el desarrollo, progresión e inestabilidad de lesiones de ateroma. Primero, Buono, y colaboradores, (Circulation 2004;109:2009-2015) caracterizó el desarrollo y progreso de

367

las lesiones de ateroma y respuestas de célula T específica de antígeno de placa en modelo murino deficiente de receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) ($Ldlr^{-/-}$). Los ratones $Ldlr^{-/-}$ desarrollaron aterosclerosis acelerada cuando se
5 alimentaron de una dieta rica en colesterol. En este estudio, los ratones $Ldlr^{-/-}$ fueron cruzados con ratones $B7-1^{-/-}B7-2^{-/-}$ y la progenie fue luego inter cruzada para generar una línea $B7-1^{-/-}B7-2^{-/-} Ldlr^{-/-}$ mutante de compuesto que carece completamente de CD80 y CD86. Este modelo único permitido
10 para investigación del papel de las interacciones de B7-CD28 en un modelo animal propenso a desarrollar aterosclerosis. Como se esperaba, cuando estos animales fueron alimentado con una dieta rica en colesterol, ambos ratones los $Ldlr^{-/-}$ y los $B7-1^{-/-}B7-2^{-/-} Ldlr^{-/-}$ tuvieron colesterol significativamente
15 elevado en comparación con los ratones $Ldlr^{-/-}$ alimentados con una dieta de control. Importantemente, sin embargo, no hubieron diferencias observadas entre los niveles de colesterol en ratones $Ldlr^{-/-}$ alimentados con una dieta rica en colesterol comparados con ratones $B7-1^{-/-}B7-2^{-/-} Ldlr^{-/-}$
20 alimentados con una dieta rica en colesterol. Las lesiones ateroscleróticas en estos ratones fueron cuantificadas del arco aórtico y la aorta descendiente usando análisis de imagen computarizados de cada uno de los 3 grupos. En 8 semanas, hubo aterosclerosis mínima en ratones $Ldlr^{-/-}$ que
25 recibieron la dieta de control. Los ratones $Ldlr^{-/-}$ que

28 368

recibieron una dieta rica en colesterol, sin embargo, tuvieron un incremento marcado en lesiones ateroscleróticas tanto en el arco aórtico como en la aorta descendente. En contraste, los ratones B7-1^{-/-}B7-2^{-/-}Ldlr^{-/-} que recibieron una
5 dieta enriquecida en colesterol tuvieron una reducción significativa de lesiones ateroscleróticas comparado con los ratones Ldlr^{-/-} que recibieron una dieta enriquecida en colesterol. Después de 20 semanas, hubo progreso de aterosclerosis en todos los 3 grupos de tratamiento y la
10 magnitud de diferencia observada entre los ratones Ldlr^{-/-} y los ratones B7-1^{-/-}B7-2^{-/-} Ldlr^{-/-} se disminuyó algo. No obstante, una reducción estadísticamente significativa en aterosclerosis entre los ratones Ldlr^{-/-} y los ratones B7-1^{-/-}B7-2^{-/-} Ldlr^{-/-} en el arco aórtico persistió en las 20 semanas.

15 En adición a estas observaciones morfológicas, también aparenta haber diferencias funcionales entre las células T de ratones Ldlr^{-/-} y ratones B7-1^{-/-}B7-2^{-/-}Ldlr^{-/-}. Específicamente, ensayos ex vivo de células T de CD4⁺ de ratones Ldlr^{-/-} y ratones B7-1^{-/-}B7-2^{-/-}Ldlr^{-/-} demostraron
20 que solamente los ratones Ldlr^{-/-} alimentados con una dieta enriquecida de colesterol produjeron cantidades sustanciales (~5 veces mayores) de IFN- γ cuando se estimularon con mHSP60. Este hallazgo sugiere que bajo condiciones de hipercolesterolemia y aterosclerosis, las
25 células T de ratones Ldlr^{-/-} se cebaron para responder al

misimo HSP60.~

En una segunda publicación, Afek y colaboradores, (Experimental and Molecular Pathology 2004;76:219-223) utiliza métodos inmunohistoquímicos para caracterizar la expresión de CD80 y CD86 dentro del ateroma de ratones agénicos de apolipoproteína E (ApoE^{-/-}). Los ratones ApoE^{-/-} desarrollan aterosclerosis de acuerdo con su edad de maduración. Estos investigadores evaluaron la presencia de CD80 y CD86 dentro de lesiones de ateroma en varias etapas de maduración. En este modelo, el inmunoteñido positivo de CD80 y CD86 estuvo presente en ambas lesiones de ateroma la temprana y la más avanzada. Más aún, el teñido de CD80 y CD86 se encontró estar co-localizado con el LDL oxidado -un autoantígeno supuesto para activación de células T.

Colectivamente, estos dos reportes de literatura soportan y extienden el material previamente presentado en la solicitud de patente prioritaria. Primero, la idea de que las células T están presentes en ateroma y están activadas in situ se fortaleció mediante el hallazgo de colocación de CD80 y CD86 dentro de ambos ateromas el temprano y el avanzado. Segundo, los datos obtenidos de los ratones B7-1^{-/-} B7-2^{-/-} Ldlr^{-/-} demuestran clara y elegantemente que la interrupción de la señalización de B7-CD28 influye en el desarrollo y progreso de la enfermedad aterosclerótica en un modelo bien aceptado de aterosclerosis. Finalmente, la

~~24~~ 370

observación de que la estimulación ex-vivo de células T de CD4+ de mHSP60 resulta en producción de INF- γ sustancial soporta la hipótesis anterior de que el HSP60 sirve como un antígeno novedoso para promover la inflamación cardiovascular e inestabilidad de placa (esto es, a través de los efectos del IFN- γ en las metaloproteinasas de matriz y síntesis de colágeno) a través de los procesos dependientes de B7-CD28.

Composiciones

10 La presente invención proporciona composiciones para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares que comprenden moléculas que bloquean las interacciones de B7 con CTLA4 y/o CD28, tal como moléculas de CTLA4 solubles. Ejemplos de CTLA4 soluble incluyen CTLA4Ig (Figura 24) y moléculas mutantes de
15 CTLA4 solubles tales como L104EA29YIg (Figura 19), L104EA29LIg (Figura 20), L104EA29Tig (Figura 21), L104EA29Wig (Figura 22).

Las moléculas CTLA4, con secuencias mutantes o de tipo silvestre, se pueden volver a hacer solubles mediante
20 eliminación del segmento de transmembrana CTLA4 (Oaks, M. K. y colaboradores, 2000 Cellular Immunology 201:144-153).

Alternativamente, las moléculas CTLA4 solubles, con secuencias mutantes o de tipo silvestre, pueden ser proteínas de fusión, en donde las moléculas CTLA4 están fusionadas a
25 porciones no de CTLA4 tales como moléculas de inmunoglobulina

(Ig) que vuelven a hacer las moléculas CTLA4 solubles. Por ejemplo, una proteína de fusión CTLA4 puede incluir el dominio extracelular de CTLA4 fusionado a un dominio constante de inmunoglobulina, que resulta en una molécula CTLA4Ig (Figura 24) Linsley, P. S. y colaboradores, 1994 Immunity 1:793-80). Ejemplos de dominios de inmunoglobulina que pueden ser fusionados a CTLA4 incluyen, pero no se limitan a IgC γ 1 (IgC γ 1), IgC γ 2 (IgC γ 2), IgC γ 3 (IgC γ 3), IgC γ 4 (IgC γ 4), IgC μ (IgC μ), IgC α 1 (IgC α 1), IgC δ (IgC δ) o IgC ϵ (IgC ϵ).

Para protocolos clínicos, se prefiere que la porción de inmunoglobulina no provoque una respuesta inmune en detrimento en un sujeto. La porción preferida es la región constante de inmunoglobulina, que incluye las regiones constantes de inmunoglobulina de humano o de mono. Un ejemplo de una región de inmunoglobulina apropiada es C γ 1 de humano, que incluye la articulación, regiones CH2 y CH3 las cuales pueden mediar funciones de efector tales como enlazamiento de receptores Fc, mediación de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), o mediar citotoxicidad mediada de célula dependiente de anticuerpo (ADCC). La porción de inmunoglobulina pueden tener una o más mutaciones allí dentro, (por ejemplo, en el dominio CH2, para reducir las funciones de efecto tal como CDC o ADCC) donde la mutación modula la capacidad de enlazamiento de la inmunoglobulina a

370.372

su ligando, mediante incremento o decrecimiento de la capacidad de enlazamiento de la inmunoglobulina a los receptores Fc. Por ejemplo, las mutaciones en la porción de inmunoglobulina pueden incluir cambios en cualquiera o en todos sus residuos de cisteína dentro del dominio de articulación, por ejemplo, las cisteínas en posiciones +130, +136, y +139 se sustituyen con serina (Figura 24). La porción de inmunoglobulina también puede incluir la prolina en posición +148 sustituida con una serina, como se muestra en la Figura 24. Además, las mutaciones en la porción de inmunoglobulina pueden incluir teniendo la leucina en posición +144 sustituida con fenilalanina, leucina en posición +145 sustituida con ácido glutámico, o glicina en posición +147 sustituida con alanina.

Las porciones no de CTLA4 adicionales para uso en las moléculas CTLA4 solubles o moléculas mutantes CTLA4 solubles incluyen, pero no se limitan a, molécula p97, molécula env_gp 120, molécula E7, y molécula ova (Dash, B. y colaboradores, 1994 J. Gen Virol. 75 (Pt 6):1389-97; Ikeda, T. y colaboradores, 1994 Gene 138 (1-2):193-6; Flak, K. y colaboradores, 1993 Cell. Immunol. 150(2):447-52; Fujisaka, K. y colaboradores, 1994 Virology 204(2):789-93). También son posibles otras moléculas (Gerard, C. y colaboradores, 1994 Neuroscience 62(3):721, Byrn, R. y colaboradores, 1989 63(10):4370; Smith, D. y

~~371~~ 373

colaboradores, 1987 Science 238:1704; Lasky, L. 1996 Science 233:209).

La molécula CTLA4 soluble de la invención puede incluir una secuencia de péptido de señal ligada al extremo N-terminal del dominio extracelular de la porción CTLA4 de la molécula. El péptido de señal puede ser cualquier secuencia que permitirá la secreción de la molécula, que incluye el péptido de señal de oncostatin M (Malik, y colaboradores, (1989) Molec. Cell. Biol. 9:2847-2853), o CD5 (Jones, N.H. y colaboradores, (1986) Nature 323:346-349), o el péptido de señal de cualquier proteína extracelular. La molécula CTLA4 soluble de la invención puede incluir el péptido de señal de oncostatina M ligado al extremo C-terminal del dominio extracelular de CTLA4, y la moléculas de inmunoglobulina humana (por ejemplo, articulación, CH2 y CH3) ligada a la terminación de terminal C del dominio extracelular (de tipo silvestre o mutado) de CTLA4. Esta molécula incluye el péptido de señal de oncostatina M que abarca una secuencia de aminoácido que tiene metionina en posición -26 a través de alanina en posición -1, la porción CTLA4 que abarca una secuencia de aminoácido que tiene metionina en posición +1 a través de ácido aspártico en posición +124, una unión de glutamina de residuo de aminoácido en posición +125, y la porción de inmunoglobulina que abarca una secuencia de aminoácido que tiene ácido glutámico en posición +126 a través de lisina en posición +357.

37A

Específicamente, las moléculas mutantes CTLA4 solubles de la invención que comprenden las secuencias CTLA4 mutadas descritas infra, pueden ser moléculas de fusión que comprenden Ig humana, por ejemplo, porciones de IgC(gama)1 (esto es IgC γ 1) fusionadas a los fragmentos de CTLA4 mutados.

En una modalidad, las moléculas mutantes CTLA4 solubles comprenden IgC γ 1 (IgC γ 1) fusionada a un dominio extracelular de CTLA4 que comprende una mutación de sitio único en el dominio extracelular. El dominio extracelular de CTLA4 comprende metionina en posición +1 a través de ácido aspártico en posición +124 (por ejemplo, Figura 23). El dominio extracelular del CTLA4 puede comprender alanina en posición -1 a través de ácido aspártico en posición +124 (por ejemplo, Figura 23). Ejemplos de mutaciones de sitio único incluyen las siguientes en donde la leucina en posición +104 se cambia a cualquier otro aminoácido:

Mutante de sitio único	Cambio de Codón
L104EIg	Acido glutámico GAG
L104SIg	Serina AGT
L104TIg	Treonina ACG
L104AIg	Alanina GCG
L104WIG	Triptofano TGG
L104QIg	Glutamina CAG
L104KIG	Lisina AAG
L104RIg	Arginina CGG
L104GIg	Glicina GGG

37375

Además, la invención proporciona moléculas mutantes que tienen el dominio extracelular de CTLA4 con dos mutaciones, fusionadas a una porción IgC γ 1 (IgC γ 1). Los ejemplos incluyen lo siguiente en donde la leucina en posición +104 se cambia a otro aminoácido (por ejemplo, ácido glutámico) y la glicina en posición +105, la serina en posición +25, la treonina en posición +30 o la alanina en posición +29 se cambia a cualquier otro aminoácido:

	Mutantes de sitio doble	Cambio de Codón
10	L104EG105FIg	Fenilalanina TTC
	L104EG105WIIg	Tryptofano TGG
	L104EG105LIIg	Leucina CTT
	L104ES25RIg	Arginina CGG
	L104ET30GIg	Glicina GGG
	L104ET30NIg	Asparagina AAT
15	L104EA29YIIg	Tirosina TAT
	L104EA29LIIg	Leucina TTG
	L104EA29TIg	Treonina ACT
	L104EA29WIIg	Tryptofano TGG

Todavía más, la invención proporciona moléculas que tienen el dominio extracelular de CTLA4 que comprenden tres mutaciones, fusionadas a una porción IgC γ 1 (IgC γ 1). Los ejemplos incluyen los siguientes en donde la leucina en posición +104 se cambia a otro aminoácido (por ejemplo, ácido glutámico), la alanina en posición +29 se cambia a otro aminoácido (por ejemplo, tirosina) y la serina en posición +25 se cambia a otro aminoácido:

376

Mutantes de sitio triple	Cambio de Codon
L104EA29YS25KIg	Lisina AAA
L104EA29YS25KIg	Lisina AAG
L104EA29YS25NIg	Asparagina AAC
L104EA29YS25RIg	Arginina CGG

Las moléculas mutantes CTLA4 solubles pueden tener una unión de residuo de aminoácido la cual se localiza entre la porción de CTLA4 y la porción de Ig de la molécula. La unión de aminoácido puede ser cualquier aminoácido, incluyendo glutamina. La unión de aminoácido puede ser introducida mediante métodos de síntesis molecular o química conocidos en la técnica.

Las proteínas CTLA4 solubles de la invención, y los fragmentos de estas, se pueden generar mediante métodos de síntesis químicos. Los principios de síntesis química de fase sólida de polipéptidos son bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar en textos generales que se relacionan con esta área (Dugas, H. y Penney, C. 1981 Bioorganic Chemistry, pp 54-92, Springer-Verlag, New York). Las proteínas solubles de CTLA4 se pueden sintetizar mediante metodología de fase sólida que utiliza un sintetizador de péptido Applied Biosystems 430A (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) y ciclos de síntesis suministrados por Applied Biosystems. Los aminoácidos protegidos tales como los aminoácidos protegidos

31-377

con t-butoxicarbonilo y otros reactivos se encuentran comercialmente disponibles en muchas casas proveedoras de materias químicas.

La presente invención proporciona moléculas mutantes
5 CTLA4 que incluyen una secuencia de péptidos de señal
enlazados al extremo N terminal del dominio extracelular de
la porción CTLA4 de la molécula mutante. El péptido de señal
puede ser cualquier secuencia que permitirá la secreción de
la molécula mutante, que incluye el péptido de señal de la
10 oncostatina M (Malik, et al., 1989 Molec. Cell. Biol. 9:2847-
2853), o CD5 (Jones, N. H. et al., 1986 Nature 323:346-349),
o el péptido de señal de cualquier proteína extracelular.

La invención proporciona moléculas mutantes CTLA4
solubles que comprenden una mutación de sitio único en el
15 dominio extracelular de CTLA4 tal como L104EIG (incluido en
la figura 18) o L104SIG, en donde L104EIG y L104SIG se mutan
en su secuencia CTLA4 de manera que la leucina en la posición
+104 se sustituya con ácido glutámico o serina,
respectivamente. Las moléculas mutantes de sitio único
20 incluyen además las porciones CTLA4 que comprenden a la
metionina en la posición +1 a través del ácido aspártico en
la posición +124, una unión de glutamina en los residuos de
los aminoácidos en la posición +125, y una porción de
inmunoglobulina que comprende al ácido glutámico en la
25 posición +126 a través de la lisina en la posición +357. La

~~377~~ 379

+357. La porción de la inmunoglobulina de la molécula mutante también puede también mutarse, de manera que las cisteínas en las posiciones +130, +136, y +139 se sustituyan con serina, y la prolina en la posición +148 se sustituya con serina.

- 5 Alternativamente, estas moléculas mutantes pueden tener una porción CTLA4 que comprende alanina en la posición -1 a través del ácido aspártico en la posición +124.

La invención proporciona moléculas mutantes CTLA4 solubles que comprenden una mutación de sitio doble en el
10 dominio extracelular de CTLA4, tal como L104EG105F_{Fig}, L104EG105W_{Ig} y L104EG105L_{Ig}, en donde la leucina en la posición +104 se sustituye con un ácido glutámico y glicina en la posición +105 se sustituye con fenilalanina, triptofano y leucina, respectivamente. Las moléculas mutantes de sitio
15 doble comprenden además porciones CTLA4 que comprenden metionina en la posición +1 a través del ácido aspártico en la posición +124, una unión de los residuos de aminoácidos de glutamina en la posición +125, y una porción de inmunoglobulina que comprende ácido glutámico en la posición
20 +126 a través de la lisina en la posición +357. La porción de inmunoglobulina también puede mutarse de manera que las cisteínas en las posiciones +130, +136, y +139 se sustituyen con serina, y la prolina en la posición +148 se sustituye con serina. Alternativamente, estas moléculas mutantes pueden

378/380

tener una porción CTLA4 que comprende alanina en la posición -1 a través del ácido aspártico en la posición +124.

La invención proporciona L104ES25RIg que es una molécula mutante de sitio doble que comprende una porción CTLA4 que comprende metionina en la posición +1 a través del ácido aspártico en la posición +124, una unión de residuos de aminoácidos de glutamina en la posición +125, y la porción de inmunoglobulina que comprende ácido glutámico en la posición +126 a través de la lisina en la posición +357. La porción que tiene el dominio extracelular de CTLA4 se muta para que la serina en la posición +25 se sustituya con arginina, y la leucina en la posición +104 se sustituya con el ácido glutámico. Alternativamente, L104ES25RIg puede tener una porción CTLA4 que comprende alanina en la posición -1 a través del ácido aspártico en la posición +124.

La invención proporciona moléculas mutantes CTLA4 solubles que comprenden una mutación de sitio doble en el dominio extracelular de CTLA4, tal como L104ET30GIg y L104ET30NIg, en donde la leucina en la posición +104 se sustituye con ácido glutámico y la treonina en la posición +30 se sustituye con glicina y asparagina, respectivamente. Las moléculas mutantes de sitio doble comprenden además porciones CTLA4 que comprenden metionina en la posición +1 a través del ácido aspártico en la posición +124, una unión de los residuos de aminoácidos de glutamina en la posición +125,

348
342

se sustituyen con serina, y la prolina en la posición +148 se
sustituye con serina. Alternativamente, estas moléculas
mutantes pueden tener una porción CTLA4 que comprende alanina
en la posición -1 a través del ácido aspártico en la posición
5 +124.

Las modalidades adicionales de moléculas mutantes CTLA4
soluble incluyen moléculas mutantes homólogas CTLA4/CD28
quiméricas que enlazan a B7 (Peach, R. J. et al., 1994 J Exp
Med 180:2049-2058). Ejemplos de estas moléculas mutantes
10 CTLA4/CD28 quiméricas incluyen HS1, HS2, HS3, HS4, HS5, HS6,
HS4A, HS4B, HS7, HS8, HS9, HS 10, HS11, HS12, HS13 y HS14
(patente de E.U.A. No. 5,773,253).

Las modalidades preferidas de la invención son moléculas
CTLA4 solubles tales como CTLA4Ig (como se muestra en la
15 Figura 24, iniciando en la metionina en la posición +1 y
terminando en la lisina en la posición +357) y L104EA29YIg
mutante CTLA4 soluble (como se muestra en la figura 19, que
inicia en la metionina en la posición +1 y termina en la
lisina en la posición +357).

20 La invención proporciona además, moléculas de ácido
nucleico que comprenden secuencias del nucleótido que
codifican a las secuencia de aminoácidos que corresponden a
las moléculas CTLA4 solubles de la invención. En una
modalidad, la molécula del ácido nucleico es un ADN (por
25 ejemplo, ADNc) o un híbrido del mismo. Por ejemplo, una

20/383

molécula de CTLA4Ig puede comprender un codón GCT o GCC, que
codifican alanina, en la posición +49 a +51 del nucleótido
como se muestra en la figura 24. En otro ejemplo, una
molécula CTLA4Ig puede comprender un codón GGT o GGG, que
5 codifica a la glicina, en la posición del nucleótido +436 a
+438 como se muestra en la Figura 24. En otro ejemplo, una
molécula CTLA4Ig puede comprender un codón CGG o CGT, que
codifica a la arginina, en la posición del nucleótido +631 a
+633 como se muestra en la figura 24. La CTLA4Ig que codifica
10 al ADN (Figura 24) se depositó el 31 de mayo de 1991 con la
American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University
Blvd., Manassas, VA 20110-2209 y se ha otorgado bajo el No.
de acceso ATCC 68629. La L104EA29YIg que codifica al ADN
(secuencia incluida en la figura 19) se depositó el 19 de
15 Junio del 2000 con ATCC y se ha otorgado el No. de acceso
ATCC PTA-2104. Alternativamente, las moléculas del ácido
nucleico son ARN o un híbrido del mismo.

Las moléculas del ácido nucleico de la invención también
incluyen moléculas del ácido nucleico derivadas que difieren
20 de las moléculas del ADN o ARN, y las moléculas anti-sentido.
Las moléculas derivadas incluyen ácidos nucleicos del péptido
(PNAs), y moléculas de ácidos no nucleicos que incluyen
fosforotioato, fosfotriéster, fosforamidato, y moléculas de
metilfosfonato que enlazan al ADN o ARN de hebra única en una
25 forma dependiente de un par base (Zamecnik, P., C., et al.,

382
384

1978 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:280284; Goodchild, P. C., et al. , 1986 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 4143-4146). Las moléculas de los ácidos nucleicos del péptido comprenden un oligómero de ácidos nucleicos al cual se ha agregado un
5 residuo de aminoácidos tales como lisina y un grupo amino. Estas pequeñas moléculas, también designadas agentes anti-gen, detienen el alargamiento del transcrito enlazando a su hebra complementaria (plantilla) de los ácidos nucleicos (Nielsen, P., E. , et al. , 1993 , *Anticancer Drug Des* 8: 53-
10 63). La revisión de los métodos para la síntesis del ADN, ARN, y sus análogos pueden encontrarse en: *Oligonucleotides and Analogues*, eds. F. Eckstein, 1991, IRL Press, New York; *Oligonucleotide Synthesis*, ed. M. J. Gait, 1984, IRL Press, Oxford, England. Adicionalmente, los métodos para la
15 tecnología del ARN antisentido se describen en las patentes norteamericanas 5,194,428 y 5,110,802. Un experto en el arte puede obtener fácilmente estas clases de moléculas de ácidos nucleicos usando las secuencias del polinucleótido CTLA4 soluble descrito en la presente, ver por ejemplo, *Innovative
20 and Perspectives in Solid Phase Synthesis* (1992) Egholm, et al. pp 325-328 o patente de E.U.A. No. 5,539,082.

Adicionalmente, la invención proporciona un vector que comprende las secuencias del nucleótido de la invención. El término vector incluye, pero no se limita a, plásmidos,
25 cósmidos y fagémidos. En una modalidad, el vector puede ser

385

un vector de replicación autónoma que comprende un replicón que dirige la replicación del ADN_r dentro de la célula apropiada. Alternativamente, el vector puede dirigir la integración del vector recombinante en la célula hospedadora.

- 5 También pueden usarse varios vectores virales, tales como por ejemplo, una variedad de vectores retrovirales y adenovirales bien conocidos (Berkner 1988 *Biotechniques* 6: 616-629).

Los vectores pueden permitir la expresión del transcrito CTLA4 soluble o secuencias del polipéptido en células
10 hospedadoras procarióticas o eucarióticas. Los vectores incluyen vectores de expresión, que comprenden un elemento de control de expresión, tal como una secuencia promotora que permite la transcripción de las secuencias de ácidos nucleicos CTLA4 solubles insertadas y pueden usarse para
15 regular la expresión (por ejemplo, transcripción y/o traducción) de una secuencia CTLA4 soluble enlazada operablemente en una célula hospedadora apropiada. Los elementos de control de expresión son conocidos en el arte e incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles,
20 promotores constitutivos, señales de secreción, mejoradores, terminadores de la transcripción y otros elementos reguladores transcripcionales. Otros elementos de control de expresión que están involucrados en la traducción se conocen en el arte, e incluyen la secuencia Shine-Dalgarno (por

~~284~~ 386

ejemplo, las células hospedadoras procarióticas), y los codones de iniciación y terminación.

También pueden requerirse señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de una secuencia

5 CTLA4 soluble. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. En casos en donde las secuencias en la dirección 5' y el codón de iniciación CTLA4 soluble se insertan en el vector de expresión apropiado, puede no ser necesario señales de

10 control traduccional adicionales. Sin embargo, en casos donde sólo la secuencia de codificación, o una porción de la misma se inserta, pueden proporcionarse señales de control transcripcional exógenas que incluyen el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar

15 en la estructura de lectura correcta para asegurar la traducción del inserto completo. Los elementos transcripcionales exógenos y codones de iniciación pueden ser de varios orígenes, natural y sintético. La eficacia de expresión puede ser mejorada mediante la inclusión de

20 mejoradores apropiados al sistema celular en uso (Scharf, D., et al, 1994 *Results Probl. Cell. Differ.* 20: 125-62; Bittner, et al., 1987 *Methods in Enzymol.* 153: 516-544).

Los vectores preferidos para la expresión de las secuencias CTLA4 solubles en las células hospedadoras

25 eucarióticas incluyen elementos de control de expresión,

387 387

tales como el promotor de polihedrina del baculovirus para la expresión en las células de insecto. Otros elementos de control de expresión incluyen promotores o mejoradores derivados de los genomas de células de plantas (por ejemplo, choque de calor, RUBISCO, genes de proteína de almacenamiento), promotores virales o secuencias líder o de virus de plantas, y promotores o mejoradores de genes mamíferos o de virus mamíferos.

El vector preferido incluye al menos un gen marcador seleccionable que codifica a un producto del gen que confiere resistencia al fármaco tal como resistencia a la ampicilina o tetracilina. El vector también comprende sitios de restricción de la endonucleasa múltiples que permiten la inserción adecuados de secuencias de ADN- exógenas. Los métodos para generar un vector de expresión recombinante que codifica a las proteínas de CTLA4 solubles de la invención son bien conocidos en el arte, y pueden encontrarse en Sambrook et al., (*Molecular Cloning ; A Laboratory Manual*, 2d edición, Sambrook, Fritsch, y Maniatis 1989, Cold Spring Harbor Press) y Ausubel et al. (1989 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York N. Y.).

Los vectores preferidos para generar los transcritos CTLA4 solubles y/o los polipéptidos CTLA4 solubles codificados son vectores de expresión que son compatibles con las células hospedadoras procarióticas. Los vectores de

316
388

expresión celulares procarióticos son bien conocidos en el arte y se encuentran disponibles de varias fuentes comerciales. Por ejemplo, los vectores pET (por ejemplo, Novagen Corp.), fagémidos BLUESCRIPT (Stratagene, LaJolla, CA), pSPORT (Gibco BRL, Rockville, MD), o pueden usarse híbridos ptrp-lac para expresar los polipéptidos CTLA4 solubles en las células hospedadoras bacterianas.

Alternativamente, los vectores de expresión preferidos por generar transcritos CTLA4 solubles y/o polipéptidos CTLA4 solubles codificados son vectores de expresión que son compatibles con las células hospedadoras eucarióticas. Los vectores más preferidos son aquellos compatibles con las células de vertebrados. Los vectores de expresión de células eucarióticas son bien conocidos en el arte y están disponibles de varias fuentes comerciales. Típicamente, se proporcionan tales vectores que contienen sitios de restricción adecuados para la inserción del segmento del ADN deseado. Típico de tales vectores son PSVL y pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1/pML2d (Internacional Biotechnologies, Inc.), pTDT1 (ATCC, #31255), y vectores de expresión eucarióticos similares.

Ejemplos de vectores de expresión incluyen pero no se limitan a, vectores para las células hospedadoras de mamíferos (por ejemplo, BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life

278 390

Wiltshire, UK), clon 13 CHO (GEIMG, Genova, IT), clon B CHO (GEIMG, Genova, IT), CHO-K1/SF designado ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), y RR-CHOK1 designado ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK). Las células de 5 plantas ejemplares incluyen plantas enteras, cultivo celular, o callo, de tabaco, maíz, soya y células de arroces. El maíz, soya, y semillas de arroces también son aceptables.

Las moléculas mutantes CTLA4 de la invención pueden aislarse como polipéptidos que se originan naturalmente o de 10 cualquier fuente ya sea natural, sintética, semi-sintética o recombinante. En consecuencia, las moléculas del polipéptido mutante CTLA4 puede aislarse como proteínas que se originan naturalmente a partir de cualquier especie, particularmente mamífero, que incluye bovino, ovino, porcino, murino, equino 15 y preferentemente humano.

Alternativamente, las moléculas del polipéptido mutante CTLA4 pueden aislarse como polipéptidos recombinantes que se expresan en células hospedadoras procarióticas o eucarióticas, o aisladas como un polipéptido químicamente 20 sintetizado.

Un experto en el arte puede emplear fácilmente métodos de aislamiento estándar para obtener moléculas mutantes CTLA4 aisladas. La naturaleza y grado de aislamiento dependerán de la fuente y el uso proyectado de las moléculas aisladas.

~~378~~ 391

Las moléculas mutantes CTLA4 y fragmentos o derivados de las mismas pueden producirse mediante métodos recombinantes. En consecuencia, una secuencia del nucleótido aislada que codifica a las moléculas CTLA4 tipo silvestre pueden ser manipulada para introducir las mutaciones, que resultan en las secuencias del nucleótido que codifican a las moléculas del polipéptido mutante CTLA4. Por ejemplo, las secuencias del nucleótido que codifican a las moléculas mutantes CTLA4 pueden ser generadas mediante métodos de mutagénesis dirigidas en el sitio usando cebadores y amplificación PCR. Los cebadores pueden incluir secuencias específicas diseñadas para introducir mutaciones deseadas. Alternativamente, los cebadores pueden diseñarse para incluir secuencias aleatorizadas o semialeatorizadas para introducir mutaciones aleatorias. Los métodos recombinantes estandar (*Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 2 edición, Sambrook, Fritsch, y Maniatis 1989, Cold Spring harbor Press) y Tecnología PCR (patente de E.U.A. No. 4,603,102) pueden emplearse para generar y aislar polipéptidos mutantes CTLA4 que codifican a polinucleótidos mutantes CTLA4.

La invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades farmacéuticamente efectivas de una molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/o CD28 tal como las moléculas CTLA4 solubles, moléculas CD28, moléculas B7 (B7-1 o B7-2), anticuerpos monoclonales anti-

~~340~~ 392

CTLA4, anticuerpos monoclonales anti-CD28 o anticuerpos monoclonales anti-B7 (B7-1 o B7-2). Las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. En ciertas modalidades, las enfermedades cardiovasculares están mediadas por las interacciones CD28/CTLA4/B7. Las moléculas CTLA4 solubles son preferentemente moléculas CTLA4 solubles con la secuencia del tipo silvestre y/o las moléculas CTLA4 solubles que tienen uno o más mutaciones en el dominio extracelular de CTLA4. La composición farmacéutica puede incluir la proteína CTLA4 soluble y/o moléculas de ácidos nucleicos, y/o vectores que codifican a las moléculas. En las modalidades preferidas, las moléculas CTLA4 solubles tienen la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CTLA4 como se muestra tanto en las figuras 24 o 19 (CTLA4Ig o L104EA29Y, respectivamente). Más preferentemente, la molécula mutante CTLA4 soluble es L104EA29YIg como se describe en la presente.

Las composiciones de la invención pueden incluir adicionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales, otro, o secundario. Por "administrado en combinación" o "terapia de combinación" significa que un compuesto de la presente invención y uno o más agentes terapéuticos adicionales son administrados al mamífero que se trata. Cuando se administra en combinación con cada componente puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier

344-393

orden en distintos momentos de tiempo. Así, cada componente puede administrarse individualmente pero lo suficientemente cercano en tiempo para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

5 Los agentes terapéuticos adicionales, cuando se emplean en combinación con las moléculas de la presente invención, puede usarse, "por ejemplo, en aquellas cantidades indicadas en la Referencia de Escritorio de los Médicos (PDR) o por el contrario determinado por un experto en el arte.

10 Agentes terapéuticos secundarios, adicionales, u otros, incluyen agentes inhibidores de coagulación o anti-coagulantes, agentes inhibidores de plaquetas o anti-plaquetas, inhibidores de la trombina, antagonistas de la vitamina K, glicoproteína IIb/ antagonistas del receptor
15 IIIa, agentes trombolíticos o fibrinolíticos, agentes anti-arritmicos, agentes anti-hipertensivos, inhibidores de enzimas que convierten angiotensina (ACE-Is), bloqueadores del receptor de angiotensina (ARBs), bloqueadores beta, bloqueadores de canal de calcio (tipo L y tipo T), glicósidos
20 cardiacos, diuréticos, antagonistas del receptor mineralocorticoide, inhibidores de fosfodiesterasa, agentes que reducen el colesterol/lípidos y terapias de perfil lípido, agentes anti-diabéticos, antidepresivos, agentes antiinflamatorios (esteroidal y no esteroidales), agentes
25 anti-osteoporosis, terapias de reemplazo de hormonas,

~~342~~
394

anticonceptivos orales, agentes anti-obesidad, agentes antiansiolíticos, agentes anti-proliferativos, agentes anti-tumor, anti-úlceras y agentes de la enfermedad de reflujo gastroesofágico, hormona de crecimiento y/o secretagogos de la
5 hormona de crecimiento, imitaciones de la tiroides (que incluye antagonistas del receptor tiroideo), agentes anti-infecciosos, agentes anti-virales, agentes anti-bacterianos y agentes anti-fungales.

Los agentes anticoagulantes (o agentes inhibidores de
10 coagulación) que pueden usarse en combinación con las composiciones de esta invención incluyen warfarina y heparina (heparina no fraccionada o cualquier heparina de peso molecular bajo disponible comercialmente), pentasacárido sintético, inhibidores de la trombina que actúan directamente
15 que incluyen hirudina y argatroban así como inhibidores del factor Xa.

El término agentes anti-plaquetas (o agentes inhibidores de plaquetas), como se usa en la presente, denota agentes que inhiben la función de la plaqueta, por ejemplo inhibiendo la
20 agregación, adherencia o secreción granular de plaquetas. Agentes incluyen, pero no se limitan a, varios fármacos conocidos no esteroideos antiinflamatorios (NSAIDS) tales como aspirina, ibuprofeno, naproxeno, sulindac, indometacina, mefenamato, droxicam, diclofenaco, sulfinpirazona, piroxicam,
25 y sales farmacéuticamente aceptables o profármacos de los

343 395

mismos. De los NSAIDS, se prefieren la aspirina (ácido acetilsalicílico o ASA) y piroxicam. Otros agentes inhibidores de plaquetas adecuados incluyen antagonistas IIb/IIIa (por ejemplo, tirofiban, eptifibatida, y abciximab),
5 antagonistas del tromboxano-A₂-receptor (por ejemplo, ifetroban), inhibidores de tromboxano-A₂-sintetasa, inhibidores PDE-III (por ejemplo, dipyridamol), y sales farmacéuticamente aceptables o profármacos de los mismos.

El término agentes anti-plaquetas (o agentes inhibidores de plaquetas), como se usa en la presente, se pretende también incluir antagonistas del receptor ADP (adenosin difosfato), antagonistas preferiblemente de los receptores purinérgicos P₂Y₁ y P₂Y₁₂, con P₂Y₁₂ que se prefiere más. Los antagonistas del receptor P₂Y₁₂ preferidos incluyen
15 ticlopidina y clopidogrel, que incluyen sales farmacéuticamente aceptables o profármacos de los mismos. El clopidogrel es un agente más preferido. la ticlopidina y clopidogrel son también compuestos preferidos puesto que se conocen por ser ligeros en el tracto gastrointestinal durante
20 su uso.

El término inhibidores de trombina (o agentes anti-trombina), como se usa en la presente, denota inhibidores de la trombina de proteasa de serina. Al inhibir la trombina, se interrumpen varios procesos mediados por la trombina tales
25 como la activación de la plaqueta mediada por la trombina (es

decir, por ejemplo, la agregación de plaquetas, y/o la secreción granular del inhibidor-1 del activador del plasminógeno y/o serotonina) y/o formación de fibrina. Una variedad de inhibidores de trombina se conocen por un experto en el arte y estos inhibidores se contemplan para ser usados en combinación con los compuestos presentes. Tales inhibidores incluyen, pero no se limitan a, derivados de la boroarginina, boropéptidos, heparinas, hirudina, argatroban, y melagatran, que incluyen sales y fármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados de boroarginina y boropéptidos incluyen N-acetil y derivados del péptido del ácido borónico tales como derivados del ácido α -aminoborónico C terminal de lisina, ornitina, arginina, homoarginina y análogos de isotiourownio de los mismos correspondientes. El término hirudina, como se usa en la presente, incluye derivados adecuados o análogos de hirudina, referidos en la presente como hirulogos, tales como disulfatohirudina. El término agentes trombolíticos o fibrinolíticos (o trombolíticos o fibrinolíticos), como se usan en la presente, denota agentes que lisan a los coágulos sanguíneos (trombi). Tales agentes incluyen el activador del plasminógeno del tejido (natural o recombinante) y formas modificadas de los mismos, anistreplasa, uroquinasa, estreptoquinasa, tenecteplasa (TNK), lanoteplasa (nPA), inhibidores del factor VIIa, inhibidores de PAI-1 (es decir, inactivadores de los

~~397~~ 397

inhibidores del activador del plasminógeno del tejido), inhibidores alfa2-antiplasmina, y complejo del activador de estreptoquinasa del plasminógeno anisolado que incluye sales farmacéuticamente aceptables o profármacos de los mismos. El

5 término anistreplasa, como se usa en la presente, se refiere a un complejo activador de la estreptoquinasa del plasminógeno anisolado, como se describe por ejemplo, en la EP 028,489, descripción que se encuentra incorporada en la presente mediante la referencia. El término uroquinasa, como

10 se usa en la presente, se piensa que denota a ambas, uroquinasa de cadena simple y doble, la última es referida en la presente como prouroquinasa.

Ejemplos de agentes anti-arrítmicos adecuados para usarse en combinación con los compuestos presentes incluyen:

15 agentes Clase I (tal como propafenona); agentes Clase II (tales como carvadiol y propranolol); agentes Clase III (tal como sotalol, dofetilido, amiodarona, azimilida e ibutilida); agentes Clase IV (tales como el diltiazem y verapamil); abridores del canal K^+ tales como los inhibidores I_{ACh} , e

20 inhibidores $I_{K_{ur}}$ (por ejemplo, compuestos tales como aquellos descritos en la WO01140231).

Ejemplos de agentes anti-hipertensivos adecuados para usarse en la combinación con los compuestos de la presente invención incluyen: bloqueadores adrenérgicos alfa,

25 bloqueadores beta adrenérgicos, bloqueadores del canal de

3ab
398

- calcio (por ejemplo, diltiazem, verapamil, nifedipina, amlodipina y mibefradil); diuréticos (por ejemplo, clorotiazida, clorhidrotiazida, flumetiazida, hidroflumetiazida, bendroflumetiazida, metilclorotiazida, 5 triclorometiazida, politiazida, benztiazida, tricrinafen del ácido etacrínico, clortalidona, furosemida, musolimina, bumetanida, triamtreneno, amilorido, spironolactona); inhibidores de renina, inhibidores de ACE (por ejemplo, captopril, zofenopril, fosinopril, enalapril, ceranopril, 10 cilazopril, delapril, pentopril, quinapril, ramipril, lisinopril); antagonistas del receptor AT-1 (por ejemplo, losartan, irbesartan, valsartan); antagonistas del receptor ET (por ejemplo, sitaxsentan, atrsentan y compuestos descritos en las patentes norteamericanas Nos. 5,612,359 y 15 6,043,265); antagonista Dual ET/AII (por ejemplo, compuestos descritos en la WO 00/01389); inhibidores de endopeptidasa neutral (NEP); inhibidores de la vasopepsidasa (inhibidores de NEP-ACE dual) (por ejemplo, omapatrilat, gemopatrilat y nitratos).
- 20 Ejemplos de bloqueadores del canal del calcio adecuados (tipo L o tipo T) para usarse en combinación con los compuestos de la presente invención incluyen diltiazem, verapamil, nifedipina, amlodipino y mibefradil.

254 400

esqualeno; fibratos; secuestrantes de los ácidos de la bilis (tales como el questran); inhibidores de ACAT; inhibidores de MTP; inhibidores de la lipooxigenasa, inhibidores de absorción del colesterol e inhibidores de la proteína éster transferasa del colesterol (por ejemplo, CP-529414).

Ejemplos de agentes anti-diabéticos adecuados para usarse en combinación con los compuestos de la presente invención incluyen: biguanidas (por ejemplo, metformina); inhibidores de la glucosidasa (por ejemplo, acarbosa);
10 insulinas (que incluyen secretagogos de la insulina o sensibilizadores de la insulina); meglitinidas (por ejemplo, repaglinida); sulfonilureas (por ejemplo, glimepirida, gliburido y glipizida); combinaciones de biguanida/gliburida (por ejemplo, glucovance), tiozolidindionas (por ejemplo,
15 troglitazona, rosiglitazona y pioglitazona), agonistas del PPAR-alfa, agonistas PPAR-gamma, agonistas PPAR alfa/gamma, inhibidores SGLT2, inhibidores de la proteína que enlaza a los ácidos grasos (aP2) tal como aquéllos descubiertos en la WO00/59506, péptido-1 tipo glucagon (GLP-1), e inhibidores de
20 la peptidase IV de dipeptidilo (DP4).

Ejemplos de agentes antidepresivos adecuados para usarse en combinación con los compuestos de la presente invención incluyen nefazodona y sertralina.

Ejemplos de agentes antiinflamatorios adecuados para
25 usarse en combinación con los compuestos de la presente

ju^a 401

invención incluyen: compuestos esteroides tales como corticosteroides y glucocorticoides, que incluyen prednisona y dexametasona; etanercept (Enbrel®); infliximab (Remicade®); inhibidores de la proteína de la cinasa tirosina (PTK);
5 inhibidores de la ciclooxigenasa (que incluyen NSAIDs, y COX-1 y/o inhibidores de COX-2); aspirina; indometacina; ibuprofen; piroxicam; naproxeno; celecoxib y/o rofecoxib.

Ejemplos de agentes anti-osteoporosis adecuados para usarse en combinación con los compuestos de la presente
10 invención incluyen alendronato y raloxifeno.

Ejemplos de terapias de reemplazo de hormonas adecuados para usarse en combinación con los compuestos de la presente invención incluyen estrógeno (por ejemplo, estrógenos conjugados) y estradiol.

15 Ejemplos de anti-coagulantes adecuados para usarse en combinación con los compuestos de la presente invención incluyen heparinas (por ejemplo, heparinas de peso molecular bajo y no fraccionado tales como enoxaparina y dalteparina).

Ejemplos de agentes anti-obesidad adecuados para el uso
20 en combinación con los compuestos de la presente invención incluyen orlistat e inhibidores ap2 (tales como aquéllos descritos en la WO00/59506).

Ejemplos de agentes anti-ansiedad adecuados para usarse en combinación con los compuestos de la presente invención

~~400~~ 402

incluyen diazepam, lorazepam, buspirona y pamoato de hidroxizina.

Ejemplos de agentes anti-proliferativos adecuados para usarse en combinación con los compuestos de la presente invención incluyen ciclosporin A, paclitaxel, adriamicina, epítilonas, cisplatina y carboplatina.

Ejemplos de agentes de enfermedades de reflujo gastroesofageal y anti-úlceras adecuados para usarse en combinación con los compuestos de la presente invención incluyen famotidina, ranitidina y omeprazol.

Agentes terapéuticos adicionales también incluyen: colágeno, dnaJ, moléculas que bloquean la función TNF (por ejemplo, pegsunercept), moléculas que bloquean la función de citocinas (por ejemplo, AMG719), moléculas que bloquean la función LFA-1 (por ejemplo, efalizumab) y trasplantes de células madre. Estos distintos tratamientos son actualmente estudiados en ensayos clínicos (www.clinicaltrials.gov) para determinar su efecto en la artritis reumatoide.

El colágeno, por ejemplo en la forma de colágeno II de bovino puede ser administrado oralmente a un paciente que padece de la enfermedad cardiovascular para aliviar uno o más síntomas de la enfermedad cardiovascular.

El DnaJ es un péptido pequeño que imita a una proteína contenida en un gen de muchos pacientes con la enfermedad cardiovascular. El péptido se deriva de la bacteria E. coli a

~~401~~ 403

partir de la proteína de choque por calor. El DnaJ puede administrarse oralmente a un paciente que padece la enfermedad cardiovascular para aliviar uno o más síntomas de enfermedad cardiovascular.

5 La TNF es una molécula involucrada en la respuesta inflamatoria de pacientes con artritis reumatoide y posiblemente una enfermedad cardiovascular. Plausiblemente, cualquier molécula que bloquea la función de la TNF por ejemplo, bloqueando el enlace de la tNF al receptor TNF
10 (TNFR), puede ayudar a modificar el progreso de la enfermedad cardiovascular y aliviar algunos de sus síntomas. Varios bloqueadores de la TNF tal como infliximab y etanercept, han demostrado ser eficaces en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. Están desarrollándose otros bloqueadores de
15 la TNF tales como el pegsunercept y se están probando (ensayo clínico de Fase II) para su eficacia tratando la enfermedad cardiovascular.

 Las citocinas, por ejemplo, la interleucina-1 (IL-1), son moléculas secretadas por las células involucradas en la
20 mediación de las respuestas inmunes. Plausiblemente, cualquier molécula que bloquea la función de las citocinas por ejemplo, bloqueando la interacción en la IL-1 con su receptor, puede ayudar a modificar el progreso de la enfermedad cardiovascular y aliviar uno o más de sus
25 síntomas. Anakinra, una proteína recombinante que bloquea la

~~404~~ 404

interacción de IL-1 con su receptor (IL-1R) ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la artritis cardiovascular. Un inhibidor IL-1, AMG719, está desarrollándose y probándose (ensayo clínico Fase II) para su eficacia en el tratamiento

5 de la artritis reumatoide.

La molécula 1 asociada con la función del linfocito (LFA-1) es una molécula compuesta de dos subunidades, CD11a y CD18 que funciona mediando la adherencia del linfocito a varios tipos de la célula tales como el endotelio.

10 Plausiblemente, la interferencia de la función LFA-1 puede ayudar a modificar el progreso de la enfermedad cardiovascular y aliviar uno o más de sus síntomas. Un anticuerpo anti-LFA-1, efalizumab, está desarrollándose y probándose (ensayo clínico Fase II) para su eficacia en el

15 tratamiento de la artritis reumatoide.

El bloqueo de TNF, citocinas o interacción de LFA-1 a sus ligandos mediante una molécula potencialmente terapéutica puede determinarse mediante cualquier número de ensayos conocidos por aquellos expertos en el arte. Por ejemplo,

20 pueden usarse ensayos de competición para probar el bloqueo mediante la molécula de interés, por ejemplo, pueden ser expuestos a un par que enlaza TNF/TNFR para competir con TNF para enlazarse a TNFR. Alternativamente, pueden realizarse ensayos funcionales para probar el bloqueo, por ejemplo, una

25 molécula puede probarse para su capacidad de inhibir una

~~407~~ 405

cascada inflamatoria, o cualquier parte de una reacción inflamatoria tal como hinchazón, enrojecimiento o dolor provocados por una citoquina.

Los agentes terapéuticos adicionales también incluyen:

5 el inhibidor p38 MAP quinasa, gp39 soluble (conocido también como el ligando CD40 (CD40L), CD154, T-BAM, TRAP), CD29 soluble, CD40 soluble, CD80 soluble (por ejemplo, ATCC 68627), CD86 soluble, CD28 soluble (por ejemplo, el número de acceso ATCC 68628), CD56 soluble, Thy-1 soluble, CD3

10 soluble, TCR soluble, VLA-4 soluble, VCAM-1 soluble, LECAM-1 soluble, ELAM-1 soluble, CD44 soluble, anticuerpos reactivos con gp39 (por ejemplo, ATCC HB-10916, ATCC HB-12055 y ATCC HB-12056), anticuerpos reactivo con CD40 (por ejemplo, ATCC HB-9110), anticuerpos reactivos con B7 (por ejemplo, ATCC HB-

15 253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341, etc), anticuerpos reactivos con CD28 (por ejemplo, ATCC HB-11944 o mAb 9.3 como se describe en Martin et al (J. Clin. Immun. 4 (1):18-22,1980), anticuerpos reactivos con LFA-1 (por ejemplo, ATCC HB-9579 y ATCC TIB-213), anticuerpos

20 reactivos con LFA-2, anticuerpos reactivos con IL-2, anticuerpos reactivos con IL-12, anticuerpos reactivos con la IFN-gamma, anticuerpos reactivos con CD2, anticuerpos reactivos con CD48, anticuerpos reactivos con cualquier ICAM (por ejemplo, ICAM-1 (ATCC CRL-2252), ICAM-2 e ICAM-3),

25 anticuerpos reactivo con CTLA4 (por ejemplo, ATCC HB-304),

~~406~~ 406

anticuerpos reactivos con Thy-1, anticuerpos reactivos con CD56, anticuerpos reactivos con CD3, anticuerpos reactivos con CD29, anticuerpos reactivos con TCR, anticuerpos reactivos con VLA-4, anticuerpos reactivos con VCAM-1, anticuerpos reactivos con LECAM-1, anticuerpos reactivos con ELAM-1, anticuerpos reactivos con CD44. En ciertas modalidades, se prefieren los anticuerpos del monoclonal. En otras modalidades, se prefieren los fragmentos del anticuerpo. Debido a que los expertos en el arte comprenderán fácilmente, la combinación puede incluir: moléculas CTLA4 solubles de la invención y otro agente; moléculas CTLA4 solubles con otros dos agentes, moléculas CTLA4 solubles con otros tres agentes y similares. La determinación de la combinación óptima y dosificaciones puede determinarse y puede perfeccionarse usando métodos bien conocidos en el arte.

Algunas combinaciones específicas para la co-administración incluyen lo siguiente: CTLA4Ig o L104EA29YIg y anticuerpos monoclonales CD80 (mAbs); CTLA4Ig o L104EA29YIg y mAbs de CD86; CTLA4Ig o L104EA29YIg, mAbs CD80, y mAbs CD86; CTLA4Ig o L104EA29YIg y mAbs gp39; CTLA4Ig o L104EA29YIg y mAbs CD40; CTLA4Ig o L104EA29YIg y mAbs CD28; CTLA4Ig o L104EA29YIg, CD80 y mAbs CD86, y mAbs gp39; CTLA4Ig o L104EA29YIg, CD80 y mAbs CD86 y mAbs CD40; y CTLA4Ig o L104EA29YIg, mAb de anti-LFA1, y mAb anti-gp39. Un ejemplo

407

específico de un mAb de gp39 es MR1. Se apreciarán fácilmente otras combinaciones y se comprenderán por las personas expertas en el arte.

Los agentes terapéuticos adicionales también incluyen:

5 un inhibidor de calcineurina, por ejemplo, ciclosporina A o FK506; un macrólido inmunosupresivo, por ejemplo, rapamicina o un derivado del mismo (por ejemplo, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina); agente de alojamiento de linfocitos, por ejemplo, FTY720 o un análogo del mismo, corticosteroides,

10 ciclofosfamida, azatiopreno, un inhibidor de reductasa del ácido dihidrofólico tal como metotrexato, leflunomida o un análogo del mismo, mizoribina, ácido micofenólico, mofetil de micofenolato, 15-deoxispergualina o un análogo del mismo, anticuerpos monoclonales inmunosupresivos, por ejemplo,

15 anticuerpos monoclonal a los receptores del leucocito, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD 11a/CD18, CD7, CD25, CD 27, B7, CD40, CD45, CD58, CD 137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BB o sus ligandos; u otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo, CTLA4/CD28-Ig, u otros inhibidores de la molécula de

20 adherencia, por ejemplo, mAbs o los inhibidores de peso molecular bajos que incluyen antagonistas de LFA-1, antagonistas de Selectina y antagonistas VLA-4. El compuesto es particularmente útil en combinación con un compuesto que interfiere con CD40 y su ligando, por ejemplo, los

25 anticuerpos para CD40 y anticuerpos para CD40-L.

408
~~408~~

La administración de los compuestos de la invención presente (es decir, un primer agente terapéutico) en combinación con por lo menos un agente terapéutico adicional (es decir, segundo agente terapéutico), produce preferentemente una ventaja eficaz sobre los compuestos y agentes solos, mientras permite preferentemente el uso de dosis más bajas de cada uno (es decir, una combinación sinérgica). Una dosificación más baja minimiza el potencial de los efectos secundarios, mientras proporciona un margen de seguridad incrementado. Se prefiere que por lo menos se administre uno de los agentes terapéuticos en una dosis sub-terapéutica. Se prefiere más aun que todos los agentes terapéuticos se administren en dosis sub-terapéuticas. Se piensa que las dosis sub-terapéuticas significan una cantidad de un agente terapéutico que no solo proporciona el efecto terapéutico deseado para la condición o enfermedad que se trata. Se piensa que la combinación sinérgica significa que el efecto observado de la combinación es mayor que la suma de los agentes individuales administró exclusivamente.

Una composición farmacéutica que comprende CTLA4 soluble puede usarse para los métodos que bloquean la interacción B7 con CTLA4 y/o CD28; o para tratar las enfermedades cardiovasculares. Las cantidades efectivas de CTLA4 solubles en la composición farmacéutica se encuentran alrededor de de

409
~~404~~

0.1 a 100 mg/kg en peso del sujeto. En otra modalidad, la cantidad efectiva es una cantidad alrededor de 0.5 a 100 mg/kg en peso de un sujeto, 0.5 a 5 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 5 a 10 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 10 a 15 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 15 a 20 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 20 a 25 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 25 a 30 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 30 a 35 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 35 a 40 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 40 a 45 mg/kg de un sujeto, alrededor de 45 a 50 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 50 a 55 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 55 a 60 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 60 a 65 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 65 a 70 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 70 a 75 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 75 a 80 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 80 a 85 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 85 a 90 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 90 a 95 mg/kg en peso de un sujeto, o alrededor de 95 a 100 mg/kg en peso de un sujeto.

En una modalidad, la cantidad efectiva de CTLA4 soluble es una cantidad de alrededor de 2 mg/kg hasta alrededor de 10 mg/kg en peso de un sujeto. En otra modalidad, la cantidad efectiva es una cantidad de alrededor de 0.1 a 4 mg/kg en peso de un sujeto. En otra modalidad, la cantidad efectiva es una cantidad alrededor de 0.1 a 0.5 mg/kg en peso de un

410
~~101~~

sujeto, alrededor de 0.5 hasta 1.0 mg/kg en peso de un
sujeto, alrededor de 1.0 a 1.5 mg/kg en peso de un sujeto,
alrededor de 1.5 a 2.0 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor
de 2.0 a 2.5 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 2.5 a
5 3.0 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 3.0 a 3.5 mg/kg
en peso de un sujeto o alrededor de 3.5 a 4.0 mg/kg en peso
de un sujeto. En otra modalidad, la cantidad efectiva es una
cantidad alrededor de 0.1 a 20 mg/kg en peso de un sujeto. En
otra modalidad, la cantidad efectiva es una cantidad
10 alrededor de 0.1 a 2 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de
2 a 4 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 4 a 6 mg/kg en
peso de un sujeto, alrededor de 6 a 8 mg/kg en peso de un
sujeto, alrededor de 8 a 10 mg/kg en peso de un sujeto,
alrededor de 10 a 12 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de
15 12 a 14 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 14 a 16
mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 16 a 18 mg/kg en
peso de un sujeto o alrededor de 18 a 20 mg/kg en peso de un
sujeto. En una modalidad, la cantidad eficaz está que 2 mg/kg
en peso de un sujeto. En otra modalidad, la cantidad efectiva
20 está alrededor de 10 mg/kg en peso de un sujeto.

En una modalidad específica, una cantidad efectiva de
CTLA4 soluble es 500 mg para un sujeto que pesa menos de 60
kg, 750 mg para un sujeto que pesa entre 60-100 kg y 1000 mg
para un peso que pesa más de 100 kg.

~~404~~ 411

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de la invención, por ejemplo, CTLA4Ig y un portador aceptable o adyuvante que se conocen por aquellos expertos en el arte. Las composiciones farmacéuticas incluyen portadores adecuados y adyuvantes que incluyen cualquier material que cuando se combina con las moléculas de la invención (por ejemplo, la molécula CTLA4 soluble, tal como, CTLA4Ig o L104EA29Y) retienen la actividad de la molécula, y no es reactiva con el sistema inmunológico del sujeto. Estos portadores y adyuvantes incluyen pero no se limitan a, permutadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, las proteínas de suero tales como la albúmina de suero humana, las sustancias amortiguadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos saturados de vegetales, solución salina amortiguada con fosfato, agua, emulsiones (por ejemplo, emulsión agua/aceite), sales o electrólitos tales como sulfato de protamina, fosfato ácido de disodio, fosfato ácido de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, pirrolidona de polivinilo, sustancias basadas en celulosa y polietilen glicol. Otros portadores también pueden incluir soluciones estériles; tabletas, que incluyen tabletas cubiertas y cápsulas. Típicamente, tales portadores contienen excipientes tales

~~410~~
412

como almidón, leche, azúcar (por ejemplo, sacarosa, glucosa, maltosa), ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales de los mismos, magnesio o estearato cálcico, talco, aceites o grasas vétales, glicoles, u otros excipientes conocidos. Tales portadores también pueden incluir
5 saborizantes y aditivos de color u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden tales portadores son formuladas mediante los métodos convencionales bien conocidos. También pueden formularse tales composiciones dentro de las diversas
10 composiciones lípidas tales como por ejemplo, liposomas así como varias composiciones poliméricas tales como microesferas de polímeros.

En una modalidad adicional de la invención, la presente invención proporciona kits (es decir, una combinación
15 empaquetada de reactivos con las instrucciones) que contiene las moléculas de la invención útiles para bloquear las interacciones B7 con sus ligandos y/o para tratar una enfermedad cardiovascular.

El kit puede contener una composición farmacéutica que
20 incluye uno o más agentes, por ejemplo, una molécula CTLA4 exclusivamente soluble o con un segundo agente y un portador aceptable o adyuvante, por ejemplo, un amortiguador farmacéuticamente aceptable tal como una solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y una solución de
25 dextrosa. Este puede incluir otros materiales deseables desde

~~411~~ 413

el punto de vista comercial y del usuario que incluyen otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de paquetes con instrucciones para su uso. Los agentes pueden proporcionarse como polvos secos, normalmente
5 liofilizados que incluyen excipientes que al disolverse proporcionarán una solución del reactivo que tiene la concentración apropiada.

Los agentes secundarios pueden incluir aquellos descritos anteriormente como agentes adicionales, tales como
10 agentes inhibidores anti-coagulantes o de coagulación, agentes inhibidores de plaquetas o anti-plaqueta, inhibidores de la trombina, agentes trombolíticos o fibrinolíticos, agentes anti-arritmicos, agentes anti-hipertensivos, bloqueadores del canal de calcio (tipo L y tipo T),
15 glicosidos cardíacos, diuréticos, antagonistas del receptor mineralocorticoide, inhibidores de la fosfodiesterasa, agentes que reducen el coleserol/lípidos y terapias del perfil lípido, agentes anti-diabéticos, antidepresivos, agentes antiinflamatorios (esteroidal y no esteroideal),
20 agentes anti-osteoporosis, terapias de reemplazo de hormonas, contraceptivos orales, agentes anti-obesidad, agentes anti-ansiedad, agentes anti-proliferativos, agentes anti-tumor, agentes anti-úlceras y agentes de la enfermedad de reflujo gastroesofageal, hormona del crecimiento y secretagogos de
25 la hormona de crecimiento, imitaciones tiroideas (que

~~511~~ 414

incluyen antagonistas del receptor de la tiroides), agentes anti-infecciosos, agentes anti-virales, agentes antibacterianos, y agentes anti-fungales.

El kit comprende un recipiente con una etiqueta y/o
5 instrucciones. Los recipientes convenientes incluyen por ejemplo, botellas, frascos y tubos de la prueba. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede
10 ser una bolsa con una solución intravenosa o un frasco que tiene un tapón perforable por una aguja tal como una aguja para inyección hipodérmica). El recipiente puede soportar una composición farmacéutica tal como una composición farmacéutica que tiene un agente que es eficaz para bloquear
15 las interacciones B7 con su ligando y/o tratar una enfermedad cardiovascular.

El kit también puede comprender un segundo recipiente que comprende uno o más agentes secundarios descritos en la presente y/o una solución amortiguadora farmacéuticamente
20 aceptable, como la solución salina amortiguada con fosfato, una solución de dextros ay una solución de Ringer. Puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial o del usuario, que incluye otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de empaque
25 con instrucciones de uso.

417/415

El kit también puede incluir adecuadamente una etiqueta y/o instrucciones en, o asociadas con el recipiente. La etiqueta puede proporcionar direcciones que llevan a cabo la preparación de los agentes, por ejemplo, disolviendo los polvos secos, y/o tratamiento para una enfermedad cardiovascular específica. La etiqueta y/o instrucciones pueden indicar que la administración de la composición de la invención y un segundo agente puede ser al mismo tiempo, o pueden estar secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos.

La etiqueta y/o las instrucciones pueden indicar tanto el uso in vivo como in vitro de la composición farmacéutica. La etiqueta y/o las instrucciones pueden indicar que la composición farmacéutica se usa exclusivamente, o en la combinación con un segundo agente.

La etiqueta puede indicar las dosificaciones apropiadas para las moléculas de la invención. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que las dosificaciones para una molécula que es eficaz para bloquear las interacciones B7 con su ligando y/o tratamiento de una enfermedad cardiovascular son alrededor de que 0.1 a 100 mg/kg en peso del sujeto, alrededor de 0.5 a 100 mg/kg en peso de un sujeto, 0.5 a 5 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 5 a 10 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 10 a 15 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 15 a 20 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 20 a 25

~~4/4/6~~

mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 25 a 30 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 30 a 35 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 35 a 40 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 40 a 45 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 45 a 50 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 50 a 55 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 55 a 60 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 60 a 65 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 65 a 70 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 70 a 75 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 75 a 80 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 80 a 85 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 85 a 90 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 90 a 95 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 95 a 100 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 2 a 10 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 0.1 a 4 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 0.1 a 0.5 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 0.5 a 1.0 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 1.0 a 1.5 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 1.5 a 2.0 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 2.0 a 2.5 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 2.5 a 3.0 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 3.0 a 3.5 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 3.5 a 4.0 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 4.0 a 4.5 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 4.5 a 5.0 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 5.0 a 5.5 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 5.5 a 6.0 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 6.0 a 6.5 mg/kg

(11) 417

en peso de un sujeto, alrededor de 6.5 a 7.0 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 7.0 a 7.5 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 7.5 a 8.0 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 8.0 a 8.5 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 8.5 a 9.0 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 9.0 a 9.5 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 9.5 a 10.0 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 0.1 a 2 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 2 a 4 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 4 a 6 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 6 a 8 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 8 a 10 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 10 a 12 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 12 a 14 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 14 a 16 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 16 a 18 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 18 a 20 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 0.5 mg/kg en peso del sujeto, 2 mg/kg en peso del sujeto, 10 mg/kg en peso del sujeto, alrededor de 0.5 mg/kg a 100 en peso del sujeto, alrededor de 0.5 a 10 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 0.1 a 20 mg/kg en peso de un sujeto, alrededor de 500 mg para un sujeto que pesa menos de 60 kg, 750 mg para un sujeto que pesa entre 60-100 kg o 1000 mg para un peso sujeto que pesa más de 100 kg.

La etiqueta y/o las instrucciones también puede indicar que la composición farmacéutica puede usarse exclusivamente, o en combinación con un segundo agente para tratar una

~~417~~ 419

supra cantidades convenientes de CTLA4 soluble para el uso en los métodos de la invención.

La presente invención proporciona además métodos para tratar las enfermedades cardiovasculares. Los métodos comprenden administrar una composición terapéutica de la invención, como las moléculas CTLA4 solubles de la invención a un sujeto en una cantidad efectiva para aliviar al menos uno de los síntomas asociado con las enfermedades cardiovasculares. Ejemplos de CTLA4 solubles incluyen CTLA4Ig y una molécula mutante CTLA4 soluble, por ejemplo, L104EA29YIg. Los síntomas de enfermedad cardiovascular incluyen, pero no se limitan a, disrritmias, isquemia, angina, tolerancia del ejercicio reducido, fatiga, disnea en el ejercicio, y ataques isquémicos transitorios. Adicionalmente, la invención puede proporcionar una terapia a largo plazo para las enfermedades cardiovasculares que bloquean la activación de células T/estimulación mediante señales co-estimuladoras tales como B7 que enlaza a CD28, que conduce a la inducción de falta de energía o tolerancia de las células T.

Las enfermedades cardiovasculares incluyen, pero no se limitan a, las siguientes enfermedades o condiciones; trastornos tromboembólicos, trastornos tromboembólicos cardiovasculares arteriales que incluyen, trastornos tromboembólicos cardiovasculares venosos, y trastornos

~~11/18~~ 420

tromboembólicos en las cámaras del corazón; arterosclerosis; restenosis; enfermedad arterial periférica; cirugía de injerto de desviación coronaria; enfermedad de arteria carótida; arteritis; miocarditis; inflamación cardiovascular; inflamación vascular; enfermedad coronaria del corazón (CHD); angina inestable (UA); angina refractaria inestable; angina estable (SA); angina estable crónica; síndrome coronario agudo (ACS); infarto al miocardio primero o recurrente; infarto al miocardio agudo (AMI); infarto al miocardio; infarto al miocardio de onda no Q; infarto al miocardio no STE; enfermedad de arteria coronaria; isquemia cardiaca; isquemia; muerte repentina isquémica; ataque isquémico pasajero; apoplejía; aterosclerosis; enfermedad arterial oclusiva periférica; trombosis venosa; trombosis de vena profunda; tromboflebitis; embolismo arterial; trombosis arterial coronaria; trombosis arterial cerebral; embolismo cerebral; embolismo de riñón; embolismo pulmonar; trombosis que resulta de (a) válvulas prostéticas u otros implantes, (b) catéteres permanentes, (c) endoprótesis vasculares, (d) derivación cardiopulmonar, (e) hemodiálisis, o (f) otro procedimiento en el cual la sangre se expone a una superficie artificial que promueve trombosis; trombosis que resulta de aterosclerosis, cirugía o complicaciones quirúrgicas, inmovilización prolongada, fibrilación arterial, trombofilia congénita, cáncer, diabetes, efectos de medicamentos u

414/421

hormonas, y complicaciones de embarazo; arritmias cardíacas que incluyen arritmias supraventriculares, arritmias auriculares, flúter auricular, fibrilación auricular; otras enfermedades enlistadas en Heart Disease: A Textbook of
 5 Cardiovascular Medicine, 2 Volume Set, 6th Edition, 2001, Eugene Braunwald, Douglas P. Zipes, Meter Lobby, Douglas D. Zipes.

Las enfermedades cardiovasculares preferidas son: aterosclerosis; enfermedad coronaria del corazón (CHD);
 10 restenosis; enfermedad arterial periférica; cirugía de injerto de desviación coronaria; enfermedad de arteria carótida; arteritis; miocarditis; inflamación cardiovascular; inflamación vascular; angina inestable (UA); angina refractaria inestable; angina estable (SA); angina estable
 15 crónica; síndrome coronario agudo (ACS); infarto al miocardio; infarto al miocardio agudo (AMI); que incluye infarto al miocardio primero o recurrente; infarto al miocardio de onda no Q; infarto al miocardio de elevación no ST, e infarto al miocardio de elevación de segmento ST.

20 Las enfermedades cardiovasculares más preferidas son: aterosclerosis; enfermedad coronaria del corazón (CHD); angina inestable (UA); angina refractaria inestable; angina estable (SA); angina estable crónica; síndrome coronario agudo (ACS); infarto al miocardio; infarto al miocardio agudo
 25 (AMI); que incluye infarto al miocardio primero o recurrente;

~~420~~ 422

infarto al miocardio de onda no Q; infarto al miocardio de elevación de segmento no ST, e infarto al miocardio de elevación de segmento ST.

Las enfermedades cardiovasculares preferidas son
5 enfermedades cardiovasculares mediadas por las interacciones de células T con células B7 positivas.

También son preferidas las enfermedades cardiovasculares asociadas con al menos un marcador de inflamación. Por asociado con un marcador de inflamación, significa que el marcador
10 (presencia, ausencia o concentraciones específicas) se correlaciona estadísticamente con el riesgo del desarrollo futuro de la enfermedad, o el riesgo de recurrencia de la enfermedad, o el nivel actual de la actividad de enfermedad. Los marcadores de inflamación incluyen, pero no se limitan a CRP,
15 hsCRP, IL-10, CD40L, sCD40L, IL-6, sICAM-1, TNF- α , conteo de células de glóbulos blancos, fibrinógeno y amiloide A de suero. Los marcadores preferidos de inflamación son CRP, hsCRP, IL-6, y TNF- α , más preferido es hsCRP. Un alto CRP, alto hsCRP, bajo IL-10, alto sCD40L, alto IL-6, alto sICAM-1, alto TNF- α , alto
20 conteo de células de glóbulos blancos, alto fibrinógeno y alto amiloide A de suero se sabe que son indicadores de inflamación.

Las moléculas solubles CTLA4 de la invención muestran propiedades inhibitoras in vivo. Bajo condiciones en donde las interacciones de células positivas B7/células T por
25 ejemplo, las interacciones de células B/ y células T se

42/423

presentan como resultado de un contacto entre las células T y las células B7 positivas, en enlace de las moléculas introducidas CTLA4 para reaccionar con las células positivas B7 por ejemplo células B puede interferir, esto es, inhibir las interacciones de células positivas B7 y células T lo que resulta en una regulación de las respuestas inmunes.

Las modalidades preferidas de la invención comprenden el uso de CTLA4Ig o de la molécula mutante soluble CTLA4 L10EA29YIg para regular las interacciones de células positivas CTLA4 y CD28 funcionales con células positivas B7 para tratar o prevenir enfermedades cardiovasculares incluyendo eventos cardiovasculares recurrentes (por ejemplo, infarto al miocardio) y/o para subregular las respuestas inmunes. El L104EA29YIg de la invención es una molécula mutante soluble de CTLA4 que comprende al menos los 2 cambios de aminoácidos, la leucina (L) a ácido glutámico (E) en la posición +104 y la alanina (A) a la tirosina (Y) en el cambio en la posición +29 (Figura 19). La molécula L104EA29YIg puede abarcar mutaciones adicionales más allá de las 2 aquí especificadas.

Las cantidades adecuadas de la molécula usadas para bloquear la interacción B7 con CTLA4 y/o CD28 se describen supra. La molécula para bloquear la interacción de B7/CTLA4 puede ser una CTLA4 soluble tal como CTLA4Ig, CTLA4Ig/CD28Ig o L104EA29YIg, una CD28 soluble tal como CD28Ig, un B7

12424

soluble (B7-1 o B7-2) tal como B7Ig, anticuerpos monoclonales anti-CTLA4, anticuerpos monoclonales anti-CD28 o anticuerpos monoclonales anti-B7.

La cantidad de alivio del síntoma suministrado por la presente invención se puede medir usando cualquiera de los criterios aceptados establecidos para medir y documentar el alivio de síntomas en un entorno clínico. Los criterios aceptables para medir el alivio del síntoma pueden incluir angina, angina recurrente, angina inestable, tiempo isquémico, hospitalización por razones cardiovasculares, infarto al miocardio agudo, infarto al miocardio recurrente, necesidad de revascularización urgente, necesidad de intervención coronaria percutánea, todas las causas de mortalidad, mortalidad cardiovascular, ataque isquémico transitorio y apoplejía.

Los sujetos tratados por la presente invención incluyen sujetos mamíferos incluyendo humanos, monos, simios, perros, gatos, vacas, caballos, cabras, cerdos, conejos, ratas y ratones.

La presente invención proporciona diversos métodos locales o sistémicos para administrar las composiciones terapéuticas de la invención tales como una molécula CTLA4 soluble sola o en conjunto con un agente terapéutico adicional. Los métodos incluyen métodos intravenosos, intramusculares, intraperitoneales, orales, de inhalación y

424/426

los complejos CTLA4/B7 solubles. Se describen cantidades convenientes de CTLA4 solubles supra. Los complejos interfieren con la interacción entre las moléculas CD28 y CTLA4 endógenos con las moléculas de la familia B7.

5 Las moléculas CTLA4 solubles pueden administrarse a un sujeto en una cantidad y durante un tiempo (por ejemplo, amplio periodo de tiempo y/o muchas veces) suficiente para bloquear las moléculas B7 endógenas desde que se enlazan a sus respectivos ligandos en el sujeto. El bloqueo del enlace
10 del ligando/B7 endógeno inhibe así las interacciones entre las células B7-positivas con CD28-y/o las células CTLA4-positivas. En una modalidad, CTLA4 soluble puede administrarse a un sujeto, diariamente, semanalmente, mensualmente y/o anualmente, en dosis simples o múltiples por
15 día/semana/mes/año dependiendo de la necesidad. Por ejemplo, en una modalidad, la molécula puede administrarse inicialmente una vez cada dos semanas para un mes, y después una vez cada mes después de éste.

La dosificación de un agente terapéutico depende de
20 muchos factores que incluyen pero no se limitan a, el tipo de tejido afectado, tipo de enfermedad cardiovascular que se trata, severidad de la enfermedad, la salud de un sujeto y respuesta al tratamiento con los agentes. Por consiguiente, las dosificaciones de los agentes pueden variar dependiendo
25 de cada sujeto y el modo de administración. Las moléculas

427
~~521~~

CTLA4 solubles pueden administrarse en una cantidad de alrededor de 0.1 a 100 mg/kg de peso del paciente/día. Se describen cantidades convenientes de CTLA4 soluble supra.

La invención también abarca el uso de las composiciones de la invención junto con otros agentes terapéuticos o agentes farmacéuticos par tratar las enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, las enfermedades cardiovasculares pueden tratarse con las moléculas de la invención junto con, pero no limitándose a, los agentes terapéuticos adicionales listados anteriormente en la discusión de la composiciones de la invención.

Cuando las moléculas mutantes CTLA4 solubles de la invención se administran junto con otros agentes, por ejemplo, como se especificó anteriormente, las dosificaciones del agente co-administrado variará, dependiendo claro del tipo de co-fármaco empleado, el fármaco especificado, de la condición que se trate y así sucesivamente.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona aún un aspecto adicional de los métodos definidos anteriormente, que comprenden la co-administración, por ejemplo, concomitantemente o en secuencia en cualquier orden (es decir, al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en distintos momentos), de una cantidad terapéuticamente efectiva de moléculas CTLA4 solubles de la invención, por ejemplo, CTLA4Ig y/o L104EA29YIg, en forma

~~42/28~~

libre o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable, y una segunda sustancia del fármaco que es un inmunosupresor, inmunomodulatorio o fármaco anti-inflamatorio, por ejemplo, como se indicó anteriormente.

5 Además, se proporcionan combinaciones terapéuticas, por ejemplo, un kit que comprende una molécula CTLA4 soluble, en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, para ser usada concomitantemente o en secuencia en cualquier orden (es decir, al mismo tiempo o secuencialmente
10 en cualquier orden en distintos momentos), con por lo menos una composición farmacéutica que comprende otro agente terapéutico. El kit puede comprender las instrucciones para su administración. Los kits de la invención pueden usarse en cualquier método de la presente invención.

15 La invención también proporciona métodos para producir las moléculas mutantes CTLA4 solubles de la invención. La expresión de moléculas mutantes CTLA4 solubles pueden ser en células procarióticas o células eucarióticas.

Las procariotas más frecuentemente se representan por
20 varias cepas de las bacterias. Las bacterias pueden ser gram positivas o gram negativas. Típicamente, se prefieren las bacterias gram negativas como la E. Coli. También pueden usarse otras cepas microbianas. Las secuencias que codifican a las moléculas mutantes CTLA4 solubles pueden ser insertadas
25 en un vector diseñado para expresar las secuencias externas

427-129

en las células procarióticas tales como E. coli. Estos
vectores pueden incluir secuencias de control procarióticas
comúnmente usadas que se definen en la presente para incluir
a promotores para la iniciación de la transcripción,
5 opcionalmente con un operador, junto con las secuencias del
sitio de enlace del ribosoma, que incluyen tales promotores
comúnmente usados como sistemas del promotor beta-lactamasa
(penicilinas) y lactosa (lac) (Chang, et al., (1977) Nature
198: 1056), el sistema promotor del triptofano (trp)
10 (Goeddel, et al., (1980) Nucleic Acids Res. 8:4057) y el
promotor P_L derivado de lambda y el sitio que enlaza al
ribosoma del gen N (Shimatake, et al., (1981) Nature 292:
128).

Tales vectores de la expresión también incluirán
15 orígenes de replicación y marcadores seleccionables tales
como beta-lactamasa o el gen de fosfotransferasa de neomicina
que confiere resistencia a los antibióticos, de tal modo que
los vectores puedan replicar en bacterias y células que
llevan plásmidos y puedan seleccionarse para cuando crezcan
20 en presencia de antibióticos, tales como ampicilina o
canamicina.

Los plásmidos de la expresión pueden introducirse en las
células procarióticas vía una variedad de métodos estándares,
que incluyen pero no se limitan a choque de CaCl₂ (Cohen,
25 (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110, y Sambrook et al.

430
~~428~~

(eds.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989)) y electroporación.

De acuerdo con la práctica de la invención, las células eucarióticas son también células hospedadoras adecuadas.

5 Ejemplos de células eucarióticas incluyen cualquier célula animal, ya sea primaria o inmortalizada, levadura (por ejemplo, *Saccharomyces Cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Pichia pastoris*), y células de plantas. El mieloma, las células COS y las células CHO son ejemplos de células
10 animales que pueden usarse como hospedadoras. Las células CHO particulares incluyen, pero no se limitan a, DG44 (Chasin, et al., 1986 *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555-556; Kolkekar 1997 *Biochemistry* 36: 10901-10909), CHO-K1 (ATCC No. CCL-61), línea celular Tet-On CHO-K1 (Clontech), CHO designada ECACC
15 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), clon 13 de CHO (GEIMG, Genova, IT), clon B CHO (GEIMG, Genova, IT), CHO-K1/SF designado ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), y RR-CHOK1 designado ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK). Las células de planta ejemplares incluyen,
20 tabaco (plantas enteras, cultivo celular o callos), maíz, soya y las células de arroz. El maíz, soya, y semillas de arroces también son aceptables.

Las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican a las moléculas mutantes CTLA4 también pueden insertarse en un
25 vector diseñado para expresar las secuencias extranjeras en

431
~~2424~~

una hospedadora eucariótica. Los elementos reguladores del vector pueden variar de acuerdo con la hospedadora eucariótica particular.

Las secuencias de control eucarióticas comúnmente usadas para su uso en los vectores de expresión incluyen secuencia promotoras y de control compatibles con células de mamíferos tales como por ejemplo el promotor CMV (vector CDM8) y el virus del sarcoma aviario (ASV) (vector π LN). Otros promotores comúnmente usados incluyen los promotores tardío y temprano del virus 40 del simio (SV40) (Fiers, et al., (1973) Nature 273:113), u otros promotores virales tales como aquellos derivados del poliooma, Adenovirus 2, y virus del papiloma bovino. También se puede usar un promotor inducible tal como hMTII (Karin, et al., (1982, Nature 299:797-802).

Los vectores para expresar las moléculas mutantes CTLA4 en eucariotas también pueden llevar secuencias llamadas regiones potenciadoras. Estas son importantes al optimizar la expresión de genes y se encuentran en la dirección 5' o dirección 3' de la región de promotor.

Los ejemplos de los vectores de expresión para las células hospedadoras eucarióticas incluyen, pero no se limitan a vectores para células hospedadoras de mamíferos (por ejemplo BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); vectores pVPakc, vectores pCMV, vectores pSG5 (Stratagene)),

432
~~440~~

vectores retrovirales (por ejemplo vectores pFB (Stratagenen)), pCADN-3 (Invitrogen) o formas modificadas de los mismos, vectores adenovirales, vectores de virus asociadas con adeno, vectores de baculovirus, vectores de levadura (por ejemplo vectores pESC (Stratagenen)).

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas mutantes de CTLA4 se pueden integrar en el genoma de la célula hospedadora eucariótica y replicarse cuando se replica el genoma hospedador. Alternativamente, el vector que lleva las moléculas mutantes CTLA4 puede contener orígenes de replicación que permiten la replicación extracromosomal.

Para expresar las secuencias de ácido nucleico en *Saccharomyces cerevisiae*, el origen de replicación de un plásmido de levadura endógeno, el circulo 2 μ , se puede usar (Broach, (1983) Meth. Enz. 101:307). Alternativamente, las secuencias del genoma de levadura capaces de promover la replicación autónoma se pueden usar (ver por ejemplo, Stinchcomb et al., (1979) Nature 282:39); Tschemper et al., (1980) Gene 10:157; y Clarke et al., (1983) Meth. Enz. 101:300).

Las secuencias de control de la transcripción para vectores de levadura incluyen promotores para la síntesis de enzimas glicolíticas (Hess et al., (1986) J. Adv. Enzyme Reg. 7:149; Holland et al., (1978) Biochemistry 17:4900).

433
~~477~~

Promotores adicionales conocidos en el arte incluyen el promotor CMV proporcionaron el vector CDM8 (Toyama and Okayama, (1990) FEBS 268:217-221); el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman et al., (1980) J, Biol. Chem. 255:2073), y aquellos para las enzimas glicolíticas.

Otros promotores se inducen debido a que se pueden regular por estímulos ambientales o por el medio de crecimiento de las células. Estos promotores que se inducen incluyen aquellos de los genes de proteínas de choque térmico, alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromos C, fosfatasa de ácido, enzimas asociadas con el catabolismo de nitrógeno, y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa.

Las secuencias reguladoras también se pueden colocar en el extremo 3' de las secuencias codificadoras. Estas secuencias pueden actuar para estabilizar al ARN mensajero. Tales terminadores se encuentran en la región no traducida 3' que sigue a las secuencias codificadoras en diversos genes de mamíferos y derivados de levadura.

Los vectores ejemplares para plantas y células de plantas incluyen, pero no se limitan a plásmidos de Agrobacterium T₁, virus mosaico de la coliflor, (CaMV) y virus mosaico dorado del tomate (TGMV).

Se han descrito los aspectos generales de las transformaciones del sistema hospedador de células de

434
~~113~~

mamíferos por Axel -(Patente de EUA No. 4,399,216 concebida el 16 de Agosto de 1983). Las células mamíferas se pueden transformar por métodos que incluyen, pero no se limitan a transfección en presencia de fosfato de calcio, microinyección, electroporación o por medio de transducción con vectores virales.

Los métodos para la introducción de secuencias externas de ADN en los genomas de eucariotas incluye genomas de plantas y de levadura que incluyen (1) métodos mecánicos tales como la microinyección de ADN en células sencillas o protoplastos, células formadoras de vórtice con perlas de vidrio en presencia de ADN, o disparo de esferas de oro o de tungsteno recubiertas con ADN dentro de células o protoplastos; (2) introducción del ADN al hacer las membranas celulares permeables a las macromoléculas a través de un tratamiento con el polietilen glicol o someter a pulsos eléctricos de alto voltaje (electroporación); o (3) el uso de liposomas (que contiene ADNc) los cuales se fusionan a las membranas celulares.

Una vez que las moléculas mutantes de CTLA4 de las invenciones se expresan, se puede cosechar por métodos bien conocidos en el arte tal como lisis células (por ejemplo sonicación, lisozimas y/o detergentes) y recuperación de proteínas efectuada usando medios de purificación estándar de proteínas, por ejemplo cromatografía por afinidad o

435
~~435~~

cromatografía de intercambio de iones para producir un producto substancialmente puro (R. Scopes in: "Protein Purification, Principles and Practice", Tirad Edition, springer-Verlag (1994); Sambrook et al. (eds.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989)). La expresión de las moléculas mutantes de CTLA4 se puede detectar por métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, las moléculas mutantes se pueden detectar por geles SDS-PAGE de tinción Coomassie e inmunotinción usando anticuerpos que se enlazan a CTLA4.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y para ayudar a alguien experto ordinario en hacer y usar la misma. Los ejemplos no se pretende de ninguna manera que limiten de otra forma el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Lo siguiente proporciona a una descripción de los métodos usados para generar las secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas CTLA4 de la invención.

Un plásmido que codifica CTLA4Ig se construye primero y se muestra que expresa las moléculas CTLA4Ig como se escribe en las patentes de EUA nos. 5,434,131, 5,885,579 y 5,851,795.

436

~~434~~

luego se generaron las moléculas de mutantes de un solo sitio (por ejemplo, L104Eig) a partir de la secuencia de codificación CTLA4Ig expresada y probada para enlazar la cinética para diversas moléculas B7. La secuencia de Nucleótido L104Eig (como se incluye en la secuencia que se muestra en la figura 18) se usó como una plantilla para generar la secuencia del mutante CTLA4 de sitio doble (como se incluye en las secuencias que se muestran en las figuras 19-22) que se expresaron como proteínas y probaron para cinética de enlaces. Las secuencias mutantes CTLA4 de sitio doble incluyen: L104E29Yig, L104EA29LIg, L104EA29Tig, y L104EA29Wig. Los mutantes de sitio triple también se generaron.

Construcción de CTLA4Ig

Un constructo genético que codifica a CTLA4Ig comprende el dominio extracelular de CTLA4 y un dominio IgCgamma1 se construye como se describe las patentes de EUA 5,434,131, 5,844,095 y 5,851,795, los contenidos de la cual se incorporan en la presente como referencia. El dominio extracelular del gen CTLA4 se clona por PCR usando los oligonucleótidos sintéticos que corresponden a la secuencia publicada (Dariavach et al., Eur Journ. Immunol. 18:1901-1905 (1988)).

Debido a que un péptido de señal para CTLA4 no se identificó en el gen CTLA4, la terminación N de la

437 /
~~437~~

secuencia predicha de CTLA4 se fusiona al péptido de señal de la oncostatina M (Malik et al., y Cell. Biol. 9:2847(1989)) en dos etapas usando oligonucleótidos de traslape. Para la primera etapa, el oligonucleótido

5 CTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGG CCCAGCC (SEQ ID NO:1) (que codificó los 15 aminoácidos en la terminal C del péptido de señal de la oncostatina M se fusiona a los 7 aminoácidos de la terminal N de CTLA4) se usa como un cebador delantero y

10 TTTGGGCTCCTGATCAGAATCTGGGCACGGTTG (SEQ ID NO: 2) (que codifica los residuos de aminoácidos 199-125 de la secuencias de aminoácidos que codifica el receptor CTLA4 y que contiene un sitio de la enzima de restricción Bel) como un cebador inverso. La plantilla para esta etapa se

15 sintetiza por ADNc a partir de 1 micro g de ARN total a partir de las células H38 (una línea celular leucémica de células T infectada con HTLV II proporcionada por los Drs. Salahudin y Gallo, NCI, Bethesda, MD). Una porción del producto de PCR de la primera etapa se vuelve a amplificar

20 usando un cebador delantero de traslape que codifica la porción en la terminal N del péptido de señal de la oncostatina M y que contiene un sitio de la endonucleasa de restricción Hind-III

CTAGCCACTGAAGCTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACA-

25 GAGGACGCTCAGTCAGTCTGGTCCTTGCACTC (SEQ ID NO:3) y el mismo

438
~~1128~~

cebador inverso...El producto de la reacción por PCR se digiere con Hind III/Xba I y Bcl I y se liga junto con un ADNc desdoblado por Bcl I/Xba I en un fragmento que codifica las secuencias de aminoácidos que corresponden a la región de articulación CH2 y CH3 de IgC(gamma)1 dentro del vector de expresión desdoblado de Hind III/Xba I, el CDM8 o el vector de expresión desdoblado de Hind III/Xba I pILN (también conocido como π LN).

El ADN que codifica la secuencia de aminoácidos que corresponde a CTLA4Ig se ha depositado con la ATCC bajo el tratado de Budapest en mayo 31, 1991, y se le ha asignado número de acceso ATCC 68629.

Mutagénesis basada en el codón de CTLA4Ig

Se desarrolló una estrategia de separación por exclusión y mutagénesis para identificar las moléculas mutantes de CTLA4Ig que tenían velocidades más lentas de disociación (tasas de apagado) a partir de moléculas CD80 y/o CD86 esto es, capacidad de enlace mejorada. En esta modalidad, las mutaciones se llevaron a cabo en y/o alrededor de los residuos en CDR-1, CDR-2 (también conocidos como la hebra C') y/o las regiones CDR-3 del domino extracelular CTLA4 (como se describe en las patentes de EUA 6,090,914, 5,773,253 y 5,844,095; en la patente de EUA pendiente Número de serie de la solicitud de 60/214,065; y por Peach, R.J., et al J Exp

439
~~438~~

Med 1994 180:2049-2058. Una región tipo CDR que abarca a cada región CDR se extiende por diversos aminoácidos en la dirección 3' y/o 5' de la porción CDR). Estos sitios se escogieron con base en los estudios de las proteínas de fusión quiméricas CD28/CTLA4 (Peach et al., J. Exp. Med., 1994, 180:2049-2058), y sobre un modelo que predice cuales cadenas laterales de residuos de aminoácidos se expondrían al solvente y una falta de identidad en los residuos de aminoácidos u homología en ciertas posiciones entre CD28 y CTLA4. También cualquier residuo que esté espacialmente en proximidad cercana (5 a 20 unidades de Ångstrom) a los residuos identificados se considera parte de la presente invención.

Para sintetizar y separar por exclusión las moléculas mutantes CTLA4 solubles con afinidades alteradas para una molécula B7 (por ejemplo CD80, CD86), se adoptó una estrategia de dos etapas. Los experimentos permitieron en general primero una colección de mutaciones en un codón específico de una porción extracelular de CTLA4 y luego separar por exclusión estos por un análisis BIAcore para identificar mutantes con reactividad alterada a B7. El sistema de ensayo Biacore (Pharmacia, Piscataway, N.J.) utiliza un sistema detector de resonancia de un plasmón de superficie que involucra esencialmente el enlace covalente de cualquiera de CD80Ig ó CD86Ig a un chip de un sensor

440
C137

recubierto con dextrano que se localiza en el detector. La molécula de prueba luego se puede inyectar en la cámara que contiene el chip del sensor y la cantidad de proteína complementaria que se enlaza se puede valorar con base en el cambio en la masa molecular que se asocia físicamente con el lado recubierto con dextrano del chip sensor; el cambio en la masa molecular se puede medir por el sistema detector.

Específicamente, las secuencias de nucleótidos mutantes de un sólo sitio sencillo se generaron usando un ADN no mutado (por ejemplo de tipo silvestre) que codifica CTLA4Ig (patentes de EUA Nos: 5,434,131, 5,844,095; 5,851,795; y 5,885,796; Número de acceso ATCC 68629) como una plantilla. Los cebadores PCR oligonucleótidos mutagénicos se diseñaron por mutagénesis aleatoria de un codón específico al permitir a cualquier base en las posiciones 1 y 2 del codón pero solamente a la guanina o timina en la posición 3 (XXG/T o también señalado como NNG/T). De esta manera, un codón específico que codifica un aminoácido se puede mutar aleatoriamente para codificar cada uno de los 20 aminoácidos. A ese respecto, la mutagénesis de XXG/T produce 32 codones potenciales que codifican a cada uno de los 20 aminoácidos. Los productos de PCR que codifican las mutaciones en proximidad cercana con el rizo de tipo CDR3 de CTLA4Ig (MYPPPY), se digirieron con SacI/XbaI y se subclonaron en un corte similarmente CTLA4Ig (como se incluye

441
~~11291~~

en la figura 24) vector de expresión π LN. Este método se usó para generar la molécula mutante CTLA4 de sitios sencillo L104Eig (como se incluye en la figura 18).

Para la mutagénesis en proximidad al rizo de tipo CDR-1 de CTLA4Ig, se introdujo primero un sitio de restricción NheI silente 5' a este rizo, por una mutagénesis dirigida al cebador PCR. Se digirieron los productos por PCR con NheI/XbaI y se subclonaron en vectores de expresión CTLA4Ig. L104Eig similarmente cortados. Este método se usa para generar una molécula mutante CTLA4 de sitio doble L104EA29YIg (como se incluye en la figura 19). En particular, la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula mutante CTLA4 de sitio sencillo L104Eig, se usa como una plantilla para generar la molécula mutante CTL4 de sitio doble, L107EA29YIg.

Las secuencias de nucleótidos mutantes de sitio doble que codifican las moléculas mutantes CTLA4 tales como L104EA29YIg (depositado en Junio 19, 2000 con American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 y acordado el número de acceso ATCC PTA-2104), se generaron al repetir el procedimiento de mutagénesis antes descrito usando L104Eig como una plantilla. Se usó este método para generar diversas secuencias de nucleótidos mutantes de sitio doble tales como aquellas que codifican a las moléculas CTLA4 L104EA29YIg (como se incluye en la secuencia mostrada en

442
~~440~~

la figura 19), L104EA29LIg (como se incluye en la
secuencia mostrada en la figura 20) L104EA29TIg (como se
incluye en la secuencia mostrada en la figura 21) y
L104EA29WIG (como se incluye en la secuencia mostrada en
5 la figura 22). Los mutantes de sitio triple tales como
aquellos que codifican L104EA29YS25KIg, L104EA29YS25NIg y
L104EA29YS25RIg, también se generaron.

Las moléculas solubles de CTLA4 se expresaron a partir
de secuencias de nucleótidos y se usan en los estudios
10 clínicos fase II descritos en el ejemplo 3, infra.

Como lo apreciarán aquellos expertos en la técnica, la
replicación de la secuencia de ácido nucleico especialmente
por amplificación PCR, introduce fácilmente los cambios base
en las hebras de ADN. Sin embargo, los cambios en nucleótidos
15 no necesariamente se traducen en cambios de aminoácidos ya
que algunos codones codifican de manera redundante el mismo
aminoácido. Algunos cambios de los nucleótidos de la
secuencia original o de tipo silvestre, silente (esto es que
no provoca cambio en el aminoácido traducido) o de otra
20 manera, aunque no se describe explícitamente en la presente
se abarcan dentro del alcance de la invención.

EJEMPLO 2.

El siguiente ejemplo proporciona una descripción de los
25 métodos de separación por exclusión usados para identificar

443
~~441~~

los polipéptidos CTLA mutantes e sitio doble y sencillo expresados a partir de los constructos descritos en el ejemplo 1, que muestran una mayor avidez de enlace por las moléculas B7 en comparación con las moléculas CTLA4Ig.

5 Los estudios actuales de CTLA4Ig indican que in vitro e in vivo por sí mismo es incapaz de bloquear por completo el cebado de las células T activadas específicas de antígeno. Los estudios in vitro en CTLA4Ig y cualquier anticuerpo monoclonal específico para CD80 o CD86 que mide la inhibición
10 de la proliferación de células T, indica que el anticuerpo monoclonal CD80 no aumenta la inhibición de CTLA4Ig. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal CD86 aumenta la inhibición lo que indica que CTLA4Ig no fue tan efectivo en bloquear las interacciones CD86. Estos datos apoyan hallazgos previos por
15 Linsley et al. (Immunity, (1994), 1:973-801) que muestran la inhibición de las respuestas celulares mediadas por CD80 que requirieron aproximadamente concentraciones de CTLA4Ig 100 veces inferiores que para las respuestas medidas por CD86. con base en estos hallazgos, se conjetura que las moléculas
20 mutantes CTLA4 solubles que tienen una mayor avidez para CD86 que el CTLA4 de tipo silvestre deben poder mejor bloquear el cebado de las células activadas específicas de antígeno CTLA4Ig.

Hasta este punto, las moléculas mutantes CTLA4 solubles
25 descritas en el ejemplo 1 anterior se separaron por exclusión

444
~~442~~

usando un procedimiento de separación por exclusión novedoso para identificar diversas mutaciones en el dominio extracelular de CTLA4 que mejora la avidéz de enlace para CD80 y CD86. Esta estrategia de separación por exclusión proporciona un método efectivo para identificar directamente mutantes con velocidades aparentemente más lentas de apagado sin necesidad de purificación de proteínas o cuantificación ya que la determinación de la velocidad de apagado es independiente de la concentración (O'Shannessy et al., 1993) Anal. Biochem., 212:457-468).

Las células COS se transfectaron con un ADN de plásmido purificado en una mini preparación individual se propagaron por varios días. Se aplicaron medios de cultivo acondicionados por tres días a chips biosensores BIAcore (Pharmacia Biotech AAB, Uppsala, Sweden) recubiertos con CD80Ig o CD86Ig soluble. El enlace específico y la disociación de las proteínas mutantes se midió por resonancia de plasmón de superficie (O'Shannessy, D.J., et al., 1997 Anal. Biochem. 212:457-468). Todos los experimentos se corrieron en biosensores BIAcore™ o BIAcore™ 2000 a 25° C. Se inmovilizaron los ligandos en chips sensores NCM5 grado investigación (Pharmacia) usando un acoplamiento estándar de N-etil-N'-(dimetilaminopropil)carbodiimidN-hidroxisuccinimida (Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277; Khilko, S.N., et al. (1993) J. Biol. Chem 268:5425-15434).

445
443**Método de separación de exclusión**

Las células COS que se hacen crecer en placas de cultivo de tejido de 24 pozos se transfectaron transitoriamente con un CTLA4Ig mutante. Los medios de cultivo que contienen el
5 CTLA4Ig mutante soluble secretado se recolectaron 3 días después.

Los medios de cultivo de células COS acondicionados se dejaron fluir sobre chips biosensores de BIAcore derivados con CD86Ig o CD80Ig (como se describe en Greene et al., 1996
10 J. Biol. Chem. 271:26762-26771), y se identificaron las moléculas mutantes con relaciones de apagado más lentas que aquellas observadas para el CTLA4Ig de tipo silvestre. Los ADN que corresponden a las muestras de medios seleccionados formaron secuencias y se preparó más ADN para llevar a cabo
15 una transfección transitoria de células COS a mayor escala, a partir de la cual la proteína mutante CTLA4Ig se preparó siguiendo la purificación de proteína A de los medios de cultivo.

Las condiciones de análisis de BIAcore y el análisis de
20 datos de enlace de equilibrio se efectuaron como se describe en J. Greene et al., 1996 J. Biol. Chem. 271:26762-26771 y la solicitud de patente de E.U.A Nos. de serie 09/579,927, y 60/579,927, y 60/217,065 que se incorporan en la presente como referencia.

446
~~444~~**Análisis de datos BIAcore**

Las líneas base del sensograma se normalizaron a unidades de respuesta cero (RU) previo al análisis. Las muestras se corrieron sobre células de flujo derivadas de imitación para determinar los valores RU de respaldo debido a las diferencias en el índice de refracción en volumen entre las soluciones. Las constantes de disociación en equilibrio (K_d) se calcularon a partir de gráficas de R_{eq} contra C, en donde R_{eq} es la respuesta en régimen permanente menos la respuesta en un chip derivado de imitación, y C es la concentración molar del analito. Las curvas de enlace se analizaron usando un software de ajuste de curvas no lineal comercial (Prism, GraphPAD Software).

Los datos experimentales se ajustaron primero a un modelo para un enlace de ligando sencillo a un receptor sencillo (modelo del sitio 1, esto es, un sistema sencillo de langmuir, $A+B \rightleftharpoons AB$), y las constantes de asociación en equilibrio ($K_d = [A] \cdot [B] / [AB]$) se calcularon a partir de la ecuación $R = R_{max} \cdot C / (K_d + C)$. Posteriormente, los datos se ajustaron al modelo más sencillo de dos sitios de enlace a ligandos (esto es, a un receptor que tiene dos sitios de enlace independientes que no interactúan como se describen por la ecuación $R = R_{max1} \cdot C / (K_{d1} + C) + R_{max2} \cdot C / (K_{d2} + C)$).

La bondad de los ajustes de estos dos modelos se analizó visualmente por comparación con los datos experimentales y

447.
~~447~~

estadísticamente por una prueba F de las sumas de los cuadrados. El modelo más sencillo de un sitio se escogió como el mejor ajuste a menos que el modelo de dos sitios se ajustara significativamente mejor ($p < 0.1$).

5 Los análisis de asociación y disociación se efectuaron usando un software de evaluación BIA 2.1 (Pharmacia). Las constantes de la velocidad de asociación K_{on} se calcularon de dos formas, suponiendo interacciones homogéneas de sitio sencillo de interacciones en paralelo de dos sitios. Para las
10 interacciones de sitio sencillo, los valores K_{on} se calcularon de acuerdo con la ecuación $R_t = R_{eq}(1 - \exp^{-k_s(t-t_0)})$, en donde R_t es una respuesta a un tiempo dado, t ; R_{eq} es la respuesta a régimen permanente; T_0 es el tiempo al comienzo de la inyección y $K_s = dR/dt = K_{on} \cdot CK_{off}$, en donde C es una concentración
15 del analito, calculado en términos de sitios de enlace monoméricos. Para las interacciones de dos sitios los valores K_{on} se calcularon de acuerdo con la ecuación $R_t = R_{eq1}(1 - \exp^{-k_{s1}(t-t_0)}) + R_{eq2}(1 - \exp^{-k_{s2}(t-t_0)})$. Para cada modelo, los valores de K_{on} se determinaron a partir de la pendiente calculada (hasta
20 alrededor de un 70% de asociación máxima) de las gráficas de K_s contra C .

Los datos de disociación se analizaron de acuerdo con los modelos de un sitio ($AB = A + B$) o de dos sitios ($A_i B_j = A_i + B_j$), y las constantes de velocidad (K_{off}) se
25 calcularon de las curvas de mejor ajuste. El modelo de

448
~~448~~

sitio de enlace se usó, excepto cuando los residuos fueron mayores que el respaldo de la máquina (2-10RU, de acuerdo con la máquina), en cuyo caso se empleó el modelo de sitio de dos enlaces. Los tiempos medios de la ocupación del receptor se calcularon usando la relación $t_{1/2}=0.693/K_{off}$.

Citometría de flujo

Se adquirieron mAb L307.4 (anti-CD80) murinos de Becton Dickinson (San Jose, California) y IT2.2 (anti-B7-0 [también conocido como CD86]), de Pharmingen (San Diego, California). Para la inmunotinción, las células CHO positivas a CD86 y/o positivas a CD80 se retiraron de sus recipientes de cultivo por incubación en solución salina amortiguada de fosfato (PBS) que contiene 10 mM EDTA. Las células CHO ($1-10 \times 10^5$) se incubaron primero con mAbs o proteínas de fusión por inmunoglobulina en DMEM que contiene suero de bovino fetal al 10% (FBS), luego se lavaron e incubaron con reactivos de segunda etapa inmunoglobulina antihumana o antiratón de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Tago, Burlingame, California). Se les dio a las células un lavado final y se analizaron en un FACS_{can} (Becton Dickinson).

SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño

Se llevó a cabo el SDS-PAGE en geles de Tris/glicina 4-20% crilamida (Novex, San Diego, CA). Se tificaron los

449
~~444~~

geles analíticos con azul de Coomassie Blue, y las imágenes de los geles húmedos se obtuvieron por escaneo digital. CTLA4Ig (25 µg) y L104EA29YIg (25 µg) se analizaron por cromatografía de exclusión de tamaño usando una columna TSK-GEL G300 SWXL (7.8 x 300 mm, Tosohaas, Montgomeryville, PA) equilibrada en solución salina amortiguada de fosfato que contiene 0.02% NaN₃ a una relación de flujo de 1.0 ml/min.

10 CTLA4X_{C120S} y L104EA29YX_{C120S}.

El CTLA4X_{C120S} de cadena sencilla se preparó como se describe previamente (Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270:15417-15424). Brevemente, un plásmido de expresión de oncostatina M CTLA4 (OMCTLA4) se usó como plantilla, el
15 cebador delantero GAGGTGATAAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACAG (SEQ ID NO: 4) se escogió para coincidir con las secuencias en el vector, y el cebador inverso GTGGTGTATTGGTCTAGATCAATCAGAATCTGGGCACGGTTC (SEQ ID NO: 5) correspondió con los últimos siete aminoácidos (esto es, los
20 aminoácidos 118-124) en el dominio extracelular de CTLA4, y contenía un sitio de enzima de restricción y un codón de retención (TGA). El cebador reverso especificó una mutación de C120S (de cisteína a serina en la posición 120). En particular, la secuencia del nucleótido GCA (nucleótidos 34-
25 36) de cebador reverso mostrado arriba se reemplaza con una

450
~~448~~

de las siguientes secuencias de nucleótidos: AGA, GGA, TGA, CGA, ACT, o GCT. Como lo entenderan las personas expertas en la técnica, la secuencia de nucleótidos GCA es una secuencia complementaria reversa del codón TGC para la cisteína.

5 Similarmente, las secuencias de nucleótidos AGA, GGA, TGA, CGA, ACT, o GCT son las secuencias complementarias inversas de los codones para las serinas. Los productos de la reacción en cadena de polimerasa se digirieron con HindIII/XbaI y se subclonaron direccionalmente dentro del vector de expresión

10 π LN (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ). L104EA29YXC1208 se preparó en una forma idéntica. Cada constructo se verificó por la formación de secuencias de ADN.

15 Identificación y caracterización bioquímica de los mutantes de alta avides

Se escogieron venticuatro aminoácidos para mutagénesis y las alrededor de 2300 proteínas mutantes resultantes, se ensayaron para el enlace de CD8Ig por resonancia de plasmón de superficie (SPR; como se describe supra). Los efectos

20 predominantes de la mutagénesis en cada sitio se resumen en la tabla II, infra. La mutagénesis aleatoria de algunos aminoácidos de la región CDR-1 (S25-R33) aparentemente no altero el enlace de ligandos. La mutagénesis de E31 y R33 y los residuos M97-Y102 resultó aparentemente en un enlace de

25 ligandos reducido. La mutagénesis de los residuos, S25, A29,

451
~~417~~

y T30, K93, L96, Y103, L104, y G105, resultó en proteínas con velocidades lentas de encendido y/o lentas de apagado. Estos resultados confirman los hallazgos previos de que los residuos en la región de CDR-1 (S25-R33) y los residuos en o
5 cerca del enlace al ligando de influencia M97-Y102 (Peach et al., (1994) J. Exp. Med., 180:2049-2058).

La mutagénesis de los sitios S25, T30, K93, L96, Y103, y G105, resultó en la identificación de algunas proteínas mutantes que tuvieron velocidades más lentas de apagado a
10 partir de CD86Ig. Sin embargo, en estos casos, la velocidad más lenta de apagado se comprometió por una velocidad lenta de encendido que resultó en proteínas mutantes con una avidéz global para CD86Ig que fue aparentemente similar a aquella que se observa con el CTLA4Ig de tipo silvestre. Además, la
15 mutagénesis K93 resultó en una agregación importante que pudo haber sido responsable de los cambios cinéticos observados.

La mutagénesis aleatoria de L104 seguida por la transfección de células COS y la separación por exclusión por SPR de las muestras de los medios de cultivo sobre CD86Ig
20 inmovilizado, produjeron seis muestras de medios que contienen proteínas mutantes con velocidades de aproximadamente 2 veces más lentas de apagado que el CTLA4Ig de tipo silvestre. Cuando el ADNc correspondiente de estos mutantes se formó en secuencias, cada uno se encontró que
25 codificaba una mutación de leucina a ácido glutámico (L104E).

452
~~447~~

Aparentemente, la substitución de la leucina 104 al ácido aspártico (L104D) no afectó el enlace de CD86Ig.

Luego se repitió la mutagénesis en cada sitio listado en la tabla II, esta vez usando L104E como la plantilla de PCR en lugar de CTLA4Ig de tipo silvestre como se describe arriba. El análisis SPR de nuevo utilizando el CD86Ig inmovilizado, identificó seis muestras de medio de cultivo a partir de la mutagénesis de la alanina 29 con proteínas que tienen aproximadamente velocidades 4 veces más lentas de apagado que el CTLA4Ig de tipo silvestre. Las dos más lentas fueron las substituciones de tirosina (L104EA29Y), dos fueron de leucina (L104EA29L), una fue de triptofanó (L104EA29W), y una fue de treonina (L104EA29T). Aparentemente, no se identificaron los mutantes de velocidad lenta de apagado cuando la alanina 29 se mutó aleatoriamente sola, en CTLA4Ig de tipo silvestre.

La masa molecular relativa y el estado de agregación del L104E y L104EA29Yig purificado se evaluó por SDS-PAGE y por cromatografía de exclusión de tamaño. L104EA29Yig (~1 µg; pista 3) y L104Eig (~1 µg; pista 2) tuvieron aparentemente la misma movilidad electroforética que CTLA4Ig (~1 µg; pista 1) bajo condiciones reductoras (~50 kDa; +βME; plus 2-mercaptoetanol) y no reductoras (~100kDa; -βME) (FIG. 25A). La cromatografía de exclusión de tamaño demostró que L104EA29Yig (FIG. 25C) tuvo aparentemente la misma movilidad

453
~~457~~

que el CTLA4Ig (FIG. 25B) dimérico. Los picos principales representan un dímero de proteínas mientras que el pico menor de elusión más rápida en FIG. 25B representa agregados de peso molecular superior. Aproximadamente 5.0% de CTLA4Ig estuvo presente cuando los agregados de peso molecular superior pero no hubo evidencia de agregación de L104EA29YIg o L104EIG. Por lo tanto, el enlace más fuerte a CD86Ig observado con L104EIG y L104EA29YIg no se puede atribuir a la agregación inducida por la mutagénesis.

10

Análisis de enlace cinético y de equilibrio

Se llevó a cabo el análisis de enlace cinético y de equilibrio sobre los CTLA4Ig, L104EIG, y L104EA28YIg purificados con proteína A usando la resonancia de plasmon de superficie (SPR). Los resultados se muestran en la tabla I, infra. Las constantes de disociación en equilibrio observadas (K_d ; Tabla I) se calcularon a partir de las curvas de enlace generadas sobre un intervalo de concentraciones (5.0-200 nM). L104EA29YIg se enlaza más fuertemente a CD86Ig que lo hace L104EIG o CTLA4Ig. La K_d inferior de L104EA29YIg (3.21 nM) que L104EIG (6.06 nM) o CTLA4Ig (13.9 nM) indica una mayor avidez de enlace de L104EA29YIg a CD86Ig. La K_d inferior de L104EA29YIg (3.66 nM) que L104EIG (4.47 nM) o CTLA4Ig (6.51 nM) indica una mayor avidez de enlace de L104EA29YIg a CD80Ig.

25

454
~~454~~

El análisis de enlace cinético reveló que las velocidades de encendido comparativas para el enlace de CTLA4Ig, L104EIg, y L104EA29YIg a CD80 fueron similares como lo fueron las velocidades de encendido para CD86Ig (Tabla I). Sin embargo, las velocidades de apagado para estas moléculas no fueron equivalentes (Tabla I). En comparación con CTLA4Ig, L104EA29YIg tuvo aproximadamente una velocidad 2 veces más lenta de apagado a partir de CD80Ig y una velocidad aproximadamente 4 veces más lenta de apagado a partir de CD86Ig. L104E tuvo velocidades de apagado intermedias entre L104EA29YIg y CTLA4Ig. Ya que la introducción de estas mutaciones no afectó significativamente las velocidades de encendido, el incremento en la avidéz para CD80Ig y CD86Ig observado con L104EA29YIg se debe principalmente a una disminución en las velocidades de apagado.

Para determinar si el incremento en la avidéz de L104EA29YIg para CD86Ig y CD80Ig se debía a las mutaciones que afectan la forma en que cada monómero asociado como un dímero, o si hubieron cambios estructurales que mejoren la avidéz introducidos dentro de cada monómero, se prepararon constructos de cadena sencilla de los dominios extracelulares de CTLA4 y L104EA29Y siguiendo la mutagénesis de cisteína 120 a la serina como se describe supra y por Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270:15417-15424 (84). Las proteínas purificadas CTLA4X_{C120S} y L104EA29YX_{C120S} se mostró que eran monoméricas por cromatografía de permeación de gel (Linsley et al., (1995),

455
~~457~~

supra), antes de que se analizaran sus propiedades de enlace a los ligandos por SPR. Los resultados mostraron que la afinidad de enlace de ambas proteínas monoméricas para CD86Ig fue aproximadamente de 35-80 veces menor que el que se observa para sus dímeros respectivo (Tabla I). Esto soporta los datos previamente publicados que establecen que la dimerización de CTLA4 se requiere para un enlace de ligando de alta avidéz (Greene et al., (1996) J. Biol. Chem., 271:26762-26771).

L104EA29YX_{C1208} enlazado con una afinidad aproximadamente 2 veces superior que CTLA4X_{C1208} a ambos CD80Ig y CD86Ig. La afinidad creciente se debe a una velocidad de disociación aproximadamente 3 veces más lenta a partir de ambos ligandos. Por lo tanto, el enlace más fuerte al ligando por L104EA29Y se debió más probablemente a los cambios estructurales que mejoran la avidéz que se habían introducido dentro de cada cadena monomérica más que las alteraciones en las cuales se dimerizó la molécula.

Localización y análisis estructural de las mutaciones que potencian la avidéz

La estructura de la solución del dominio del tipo IgV extracelular de CTLA4 se ha determinado recientemente por espectroscopia RMN (Metzler et al., (1997) Nature Struct. Biol., 4:527-531). Esto permitió una ubicación precisa de la leucina 104 y la alanina 29 en un pliegue tridimensional (FIG.

456
~~457~~

26 detalles izquierdo y derecho). La leucina 104 se sitúa cerca de la secuencia de aminoácidos MYPPPY altamente conservada. La alanina 29 se situa cerca del extremo en la terminal C de la región CDR-1 (S25-R33), que esta espacialmente adyacente a la región MYPPPY. Aunque hay una interacción importante entre los
5 residuos en la base de estas dos regiones, no existe aparentemente una interacción directa entre L104 y A29 aunque ambas comprenden parte de un núcleo hidrofóbico contiguo en la proteína.

10 Las consecuencias estructurales de las dos mutantes que potencian la avidéz se evaluaron por modelado. La mutación de A29Y se puede acomodar fácilmente en la hendidura entre la región CDR-1 (S25-R33) y la región MYPPPY, y puede servir para estabilizar la conformación de la región MYPPPY. En el CTLA4 de
15 tipo silvestre, L104 forma interacciones hidrofóbicas extensivas con L96 y V94 cerca de la región MYPPPY. Es altamente improbable que la mutación por ácido glutámico adopte una conformación similar a aquella de L104 por dos razones. Primero, hay un espacio insuficiente para acomodar la cadena
20 lateral más larga de ácido glutámico en la estructura sin una perturbación importante para CDR-1 (región S25-R33). En segundo lugar, los costos energéticos de sepultar la carga negativa de la cadena lateral de ácido glutámico en la región hidrofóbica serían grandes. En su lugar, los estudios del modelado predicen
25 que la cadena lateral de ácido glutámico resalta sobre la

457
~~457~~

superficie en donde su carga se puede estabilizar por solvatación. Tal cambio conformacional se puede acomodar fácilmente por G105, con una distorsión mínima a otros residuos en otras regiones.

5

Enlace de los mutantes de alta avidéz a las células CHO que expresan CD80 o CD86

El análisis FACS (Fig. 27) de CTLA4Ig y las moléculas mutantes que se enlazan a células transfectadas de forma estable CD80+ y CD86+CHO, se llevó a cabo como se describe en la presente. Las células positivas a CD80- y positivas a CD86- de CHO se incubaron con concentraciones crecientes de CTLA4Ig, L104EA29YIg o L104EAIg, y luego se lavaron. La proteína de fusión de inmunoglobulina enlazada se detectó usando una
10 estable CD80+ y CD86+CHO, se llevó a cabo como se describe en la presente. Las células positivas a CD80- y positivas a CD86- de CHO se incubaron con concentraciones crecientes de CTLA4Ig, L104EA29YIg o L104EAIg, y luego se lavaron. La proteína de fusión de inmunoglobulina enlazada se detectó usando una
15 inmunoglobulina antihumana de cabra conjugada con isotiocianato de fluoresceína.

Como se muestra en la Figura 27, las células CHO positivas a CD80 o positivas a CD86 (1.5×10^5) se incubaron con las concentraciones indicadas de CTLA4Ig (cuadrados cerrados),
20 L104EA29YIg (círculos), o L104EAIg (triángulos) por 2 horas a 23°C, se lavaron e incubaron con anticuerpo de inmunoglobulina antihumano de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína. Al enlazar un total de 5000 células viables se analizaron (determinación sencilla) en un FACScan, y se
25 determinó la intensidad de fluorescencia media (MFI) a partir

458
~~456~~

de los histogramas de datos usando PC-LYSYS. Se corrigieron los datos para la fluorescencia de respaldo medida en las células incubadas con un reactivo de segunda etapa solamente (MFI = 7). El L6 mAb (80 µg/ml) de control dio MFI < 30. Estos resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.

El enlace de L104EA29YIg, L104EIG, y CTLA4Ig a la célula CHO transfectadas con CD80 humana es aproximadamente equivalente (FIG. 27A). L104EA29YIg y L104EIG se enlaza más fuertemente a las células CHO transfectadas de forma estable con CD86 humano como lo hace CTLA4Ig (FIG. 27B).

Ensayos Funcionales

Se aislaron células T positivas CD4 humanas por selección negativa inmunomagnética (Linsley et al., (1992) J. Exp. Med. 176:1595-1604). Las células T positivas CD4 aisladas se estimularon con acetato de miristato de forbal (PMA) más células CHO positivas CD86 o positivas CD80 en presencia de concentraciones de titulación de inhibidor. Las células T positivas CD4 ($8-10 \times 10^4$ /pozo) se cultivaron en presencia de 1 nM PMA con o sin estimuladores de células CHO irradiados. Las respuestas proliferativas se midieron por la adición de 1 µCi/pozo o [3H]timidina durante las 7 horas finales de un cultivo por 72 horas. La inhibición de PMA más las células T estimuladas CHO positivas a CD86 o CHO positivas a CD80 por L104EA29YIg y CTLA4Ig se efectuaron. Los resultados se muestran

459
~~457~~

en FIG. 28. L104EA29YIg inhibe la proliferación de células CHO tratadas con PMA positivas con CD80 más que CTLA4Ig (FIG. 28A). L104EA29YIg que es también más efectivo que CTLA4Ig al inhibir la proliferación de células CHO tratadas con PMA positivas a CD86 (FIG. 28B). Por lo tanto, L104EA29YIg es un inhibidor más potente de la co-estimulación mediada por CD80 y CD86 de las células T.

La figura 29 muestra la inhibición de L104EA29YIg y CTLA4Ig de células T humanas aloestimuladas antes preparadas, y aloestimuladas con una línea celular linfoblastoide humana B (LCL) denominada PM que expresa CD80 y CD86 (células T a 3.0×10^4 /pozo y PM a 8.0×10^3 /pozo). La aloestimulación primaria sucedió durante 6 días, luego se pulsaron las células con ^3H -timidina por 7 horas, antes de que se determinara la incorporación de la radioetiqueta.

La aloestimulación secundaria se efectuó como sigue. Células T aloestimuladas primarias por 7 días, se cosecharon sobre un medio de separación con linfocitos (LSM) (ICN, Aurora, OH) y reposaron por 24 horas. Luego se volvieron a estimular las células T (secundarias), en presencia de cantidades de titulación de CTLA4Ig o L104EA29YIg, al agregar PM en la misma relación como arriba. La estimulación sucedió por 3 días, luego se pulsaron las células con radioetiqueta y se cosecharon

460
~~460~~

como arriba. El efecto de L104EA29YIg sobre la células T primarias aloestimuladas se muestra en la FIG.29A. El efecto de L104EA29YIg sobre las células T aloestimuladas secundarias se muestran en la FIG.29B. L104EA29YIg
5 inhibe tanto la respuesta de proliferación de células T primarias y secundarias mejor que CTLA4Ig.

Para medir la producción de citoquina (figura 30), se prepararon placas de aloestimulación secundaria por duplicado. Después de 3 días, se ensayaron los medios de
10 cultivo usando un kit ELISA (Biosource, Camarillo, CA) al usar condiciones recomendadas por el fabricante. L104EA29YIg se encontró que era más potente que CTLA4Ig al bloquear la producción de citocinas de células T IL-2, IL-4 y γ -IFN (gamma-IFN) después de un estímulo
15 alogénico secundario (FIGS. 30A-C).

Los efectos de L104EA29YIg y CTLA4Ig en la respuesta de linfocitos mixtos de mono (MLR) se muestra en la figura 31. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC'S; 3.5×10^4 /pozo de cada mono) a partir de 2 monos
20 se purificación sobre un medio de separación con linfocitos (LSM) y se mezclaron con 2 μ g/ml de fitohemaglutinina (PHA). Las células se estimularon 3 días, luego se pulsaron con radioetiqueta 16 horas antes de cosechar. L104EA29YIg inhibió la proliferación de
25 células T de mono mejor que CTLA4Ig.

461
~~111~~

TABLA I

Constantes cinéticas aparentes y en equilibrio se dan en la siguiente tabla (los valores son medias $\pm$ desviación estándar de los tres diferentes experimentos)

5	Proteína inmovilizada	Analito	$K_{on} (x10^5) M^{-1} s^{-1}$	$K_{off} (x 10^{-3}) s^{-1}$	K_d nM
	CD80Ig	CTLA4Ig	3.44 $\pm$ 0.29	2.21 $\pm$ 0.18	6.51 $\pm$ 1.08
	CD80Ig	L104EIG	3.02 $\pm$ 0.05	1.35 $\pm$ 0.08	4.47 $\pm$ 0.36
10	CD80Ig	L104EA29YIg	2.96 $\pm$ 0.20	1.08 $\pm$ 0.05	3.66 $\pm$ 0.41
	CD80Ig	CTLA4X _{C1208}	12.0 $\pm$ 1.0	230 $\pm$ 10	195 $\pm$ 25
	CD80Ig	L104EA29YX _{C1208}	8.3 $\pm$ 0.26	71 $\pm$ 5	85.0 $\pm$ 2.5
	CD86Ig	CTLA4IG	5.95 $\pm$ 0.57	8.16 $\pm$ 0.52	13.9 $\pm$ 2.27
15	CD86Ig	L104EIG	7.03 $\pm$ 0.22	4.26 $\pm$ 0.11	6.06 $\pm$ 0.05
	CD86Ig	L104EA29YIg	6.42 $\pm$ 0.40	2.06 $\pm$ 0.03	3.21 $\pm$ 0.23
	CD86Ig	CTLA4X _{C1208}	16.5 $\pm$ 0.5	840 $\pm$ 55	511 $\pm$ 17
	CD86Ig	L104EA29YX _{C1208}	11.4 $\pm$ 1.6	300 $\pm$ 10	267 $\pm$ 29

20

25

462
~~460~~

TABLA II

El efecto del enlace de CD86Ig por mutagenesis de CTLA4Ig en los sitios listados se determina por SPR, descrito supra. El efecto predominante se ubica con un signo "+".

Sitio de mutagénesis	Efectos de mutagénesis		
	Sin efecto aparente	Velocidad lenta de encendido/velocidad lenta de apagado	Enlace reducido de ligandos
S25		+	
P26	+		
G27	+		
K28	+		
A29		+	
T30		+	
E31			+
R33			+
K93		+	
L96		+	
M97			+
Y98			+
P99			+
P100			+
P101			+
Y102			+
Y103		+	
L104		+	
G105		+	
I106	+		
G107	+		
Q111	+		
Y113	+		
I115	+		

463
~~461~~

EJEMPLO 3

Lo siguiente proporciona una descripción de los estudios clínicos en fase II de pacientes humanos administrados en la molécula mutante soluble CTLA4, L104EA29YIg (también conocida como L104EA29YIG o LEA) o CTLA4Ig, para aliviar al menos un síntoma asociado con la artritis reumatoide, incluyendo reducir: la hinchazón de articulación, sensibilidad en las articulaciones, inflamación, entumecimiento matutino y dolor. La molécula CTLA4Ig usada en la presente comienza con metionina en la posición +1 (o alternativamente con alanina en la posición -1) y termina con lisina en la posición +357 como se muestra en la figura 24. El ADN que codifica una modalidad de la molécula CTLA4Ig se ha depositado como ATCC 58629. La molécula de L104EA29YIg usada en la presente comienza con metionina en la posición +1 (o alternativamente con alanina en la posición -1) y termina con lisina en la posición +357 como se muestra en la figura 19. El ADN que codifica una modalidad de la molécula L104EA29YIg se ha depositado como ATCC PTA 2104.

Adicionalmente, lo siguientes proporciona una descripción de pacientes humanos administrados con L104EA29YIg o CTLA-4Ig para aliviar al menos un marcador biológico sustituto asociado con la artritis reumatoide, que incluye reducir las velocidades de sedimentación de eritrocitos, y los niveles de suero de la proteína reactiva C y/o el receptor IL2.

~~462~~ 464

Ensayos con pacientes

Un total de 214 pacientes, incluyendo 54 masculinos y 160 femeninos participaron en el estudio (Figuras 1A, 1B). Los pacientes en la línea base tuvieron una duración media de la enfermedad de 3.4 (± 2.0) años y habían fracasado al menos con un fármaco anti-reumático modificador de la enfermedad (DMARD). Se permitieron fármacos anti-inflamatorios no esteroideos estables (NSAIDS) o esteroides (≤ 10 mg/día) y se prohibió un DMARD concomitante. Se colocaron de manera aleatoria los pacientes en grupos de 25 a 32 pacientes por grupo de tratamiento. Treinta y dos pacientes recibieron un placebo, 92 recibieron L104EA29YIg, y 90 recibieron CTLA4Ig. Los pacientes que siguieron los lineamientos de protocolo y no descontinuaron antes del día 57 recibieron un total de 4 infusiones intravenosas, una infusión cada una en los días 1, 15, 29 y 57. Todos los pacientes se evaluaron en los días 1, 15, 29, 43, 57, 71 y 85. La dosis administradas incluyeron 0.5, 2.0 ó 10.0 mg/kg de L104EA29YIg (denotado como LEA.5, LEA2 y LEA10, respectivamente en las figuras 1A-1E) o de CTLA4OG (denotada como CTLA.5, CTLA2 y CTLA10, respectivamente en las figuras 1A-1E).

Todos los sujetos se monitorearon por eventos adversos peri-infusionales y seguridad global al responder un cuestionario que listaba los eventos adversos potenciales. Se les preguntó a los pacientes acerca de los eventos adversos

~~463~~ 465

potenciales que podrían haber sucedido 24 horas posteriores a la infusión. Además, los pacientes se les alentó a reportar espontáneamente cualquiera eventos adversos que hayan experimentado. Los médicos rutinariamente observaron las

5 muestras de laboratorio de los pacientes para anormalidades en la química sanguínea y la hematología. Por ejemplo, evaluaron los niveles de los mediadores de respuesta inflamatoria tales como las citocinas (TNF, IL-6), triptasa y complementos. El punto final primario fue la proporción de

10 sujetos que reúnen los criterios de ACR20 el día 85.

Almacenamiento del material de prueba

Se suministraron CTLA4IG y L104EA29YIg en viales de vidrio de uso sencillo que contienen 200 mg/vial de CTLA4Ig o

15 100 mg/vial de L104EA29YIg, respectivamente. Previo a la infusión, los CTLA4IG y L104EA29YIg se diluyeron hasta una concentración final de 25 mg/ml con agua estéril para inyección (SWFI).

20 Protocolo de administración

Todas las infusiones se administraron por vía intravenosa durante 1 hora (Figuras 1 hasta la 17). Todos los sujetos recibieron una infusión de la medicación de estudio.

Grupo 1: 32 pacientes, CTLA4Ig o L104EA29YIg que

25 coincide con el placebo.

~~466~~ 466

Grupo 2: 26 pacientes, 0.5 mg/kg de dosis de CTLA4Ig.

Grupo 3: 32 pacientes, 2.0 mg/kg de dosis de CTLA4Ig.

Grupo 4: 32 pacientes, 10.0 mg/kg de dosis de CTLA4Ig.

5 Grupo 5: 32 pacientes, 0.5 mg/kg de dosis de L104EA29YIg.

Grupo 6: 29 pacientes, 2.0 mg/kg de dosis de L104EA29YIg.

Grupo 7: 31 pacientes, 10.0 mg/kg de dosis de L104EA29YIg.

10

Monitoreo clínico

Se evaluaron los pacientes para los síntomas de línea base de actividad de la enfermedad previo a recibir algunas infusiones. Estas evaluaciones de línea base incluyeron:

15 hinchazón de las articulaciones, sensibilidad en las articulaciones, inflamación, entumecimiento matutino, actividad de enfermedad evaluada por el paciente y el médico así como la discapacidad evaluada por la Evaluación del Cuestionario de Salud (HAQ) (reportado como un registro de

20 función física en la figura 1C), y dolor (Figuras 1A a 1D). Adicionalmente, las evaluaciones de la línea base incluyeron las velocidades de sedimentación de eritrocitos (ESR), y los niveles en suero de la proteína reactiva C (CRP) y el receptor soluble IL-2 (IL-2r) (Figuras 1C y 1D).

25 Los estudios de respuesta clínica se basaron en los

~~467~~ 467

criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR). Un sujeto satisface el criterio de ACR20 si hay una mejora de 20% en los conteos de articulación sensible e hinchada y una mejora de 20% en tres de los 5 síntomas restantes medidos, tales como los cambios de la enfermedad global por el médico y el paciente, dolor, discapacidad y una reacción en fase aguda (Felson, D.T., et al., 1993 Arthritis and Rheumatism 36: 729-740; Felson, D. T., et al., 1995 Arthritis and Rheumatism 38: 1-9).

10 Similarmente, un sujeto satisface el criterio de ACR50 o ACR70 si hay de un 50 ó 70% de mejora respectivamente en los conteos de articulaciones sensibles y un 50 ó 70% de mejora respectivamente en tres de los 5 síntomas restantes medidos tales como los cambios globales en la enfermedad por el

15 médico y el paciente, dolor, discapacidad física, y una reacción en fase aguda tal como CRP o ESR.

Biomarcadores

Los biomarcadores potenciales de la actividad de enfermedad (factor reumatoide, CRP, ESR, IL-2R soluble, ICAM-1 soluble, E-selectina soluble y MMP-3) también se evaluaron. Se usaron métodos validados de inmunoensayo de enzimas (EIA) para determinar la concentración en suero de IL-2sR α , sICAM-1, sE-selectina y MMP-3. Se evaluaron los TNF α y IL-6 a una

20

25 infusión previa y posterior a 2 horas, si es necesario.

~~466~~ 468

Se midieron los IL-2sR α , sICAM-1, y sE-selectina usando kit EIA colorimétricos comercialmente disponibles de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Los límites superior e inferior de cuantificación fueron 312-20,000 pg/ml, 40-907 ng/ml y 10-206 ng/ml, respectivamente. El coeficiente entre ensayos de variación estuvo en el intervalo de 4.48-8.4%, 3.8-5.0% y 5.5-9.0%, respectivamente. De acuerdo con el fabricante del kit, los valores normales de suero están en el intervalo de 676-2,132 pg/ml, respectivamente.

- 10 MMP-3 se midió usando un kit EIA colorimétrico comercialmente disponible de Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Los límites superior e inferior de cuantificación fueron 30-7,680 ng/ml. El coeficiente entre ensayos de variaciones tuvo en el intervalo desde 6.3-10.6%.
- 15 De acuerdo con el fabricante del kit, los valores normales en suero estuvieron en el intervalo de 28-99 ng/ml.

- IL-6 y TNF α se midieron usando kits EIA quimioluminiscentes comercialmente disponibles de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Los límites inferior y superior de cuantificación fueron de 0.3-3,000 pg/ml y 0.7-7,00 pg/ml, respectivamente. El coeficiente de variación entre ensayos estuvo en el intervalo de 3.1-5.7% y 6.4-20.7%, respectivamente. De acuerdo con el fabricante del kit, los valores normales de suero están en el intervalo de <0.3-12 pg/ml y <0.7-7.5 pg/ml.

~~468~~ 469

Prueba de anticuerpos

Se obtuvieron muestras de suero para evaluación de anticuerpos específicos para el fármaco previo a la dosificación en el día 1 y aproximadamente en los días 15, 29, 57, 85 y 169. Debido a las concentraciones altas pre-existentes dirigidas a la porción de inmunoglobulina (Ig) de la molécula, también se evaluó la formación específica de anticuerpos contra CTLA4Ig y L104EA29YIG en regiones constantes Ig.

Placas de noventa y seis pozos Immulon II ELISA (Dynex, Chantilly, Virginia) se recubrieron con CTLA4Ig, CTLA4Ig sin las regiones constantes Ig, L104EA29YIG o L104EA29YIG sin las regiones constantes Ig a 2, 4, 2 ó 1 µg/ml en solución salina amortiguada de fosfato (PBS), respectivamente y se incubaron durante la noche a 2-8°C. Las placas se lavaron con PBS que contiene 0.05% Tween 20 y se bloquearon durante 1 hora a 37°C con PBS que contiene albúmina de suero de bovino al 1% (BSA). Luego se lavaron las placas y se agregaron diluciones en serie de los sueros de prueba o sueros de control de calidad (QC) a los pozos adecuados y se incubaron por 2 horas a 37°C. Se diluyeron los sueros 3 veces en PBS con 0.25% BSA y 0.05% Tween 20 partiendo en una dilución 1:10. Se lavaron las placas en cóctel de anticuerpos kappa y lambda anti humano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama) que fue

~~469~~ 471

infusionales fueron similares a todos los grupos de dosis con la excepción de los dolores de cabeza. La respuesta de los pacientes a los dolores de cabeza en el día 85 se incrementó dependiente de la dosis 23%, 44% y 53% en pacientes tratados con CTLA4Ig y 34%, 45% y 61% en pacientes tratados con L104EA29YIG a 0.5, 2.0 y 10.0 mg/kg respectivamente. En contraste, 31% de los pacientes a quienes se les administraron placebos experimentaron dolores de cabeza.

El porcentaje de paciente que discontinuó el estudio clínico debido a apariciones de artritis y otros eventos adversos se resume en la figura 2. Un porcentaje mucho mayor de pacientes en el placebo discontinuó el tratamiento debido a aparición de artritis. Los pacientes tratados con CTLA4Ig discontinuaron el tratamiento menos con dosis creciente. Muy pocos pacientes tratados con L104EA29YIg discontinuaron el tratamiento. Estos resultados indican una buena respuesta dependiente de la dosis inversa para CTLA4Ig, y una respuesta terapéuticas más fuerte con la terapia de L104EA29YIg.

Las respuestas de ARC-20, -50 y -70 de los pacientes tratados con CTL4Ig, L104EA29YIg o el placebo en el día 85 se resumen en la figura 3A. Similarmente, Las figuras 3B y C describen la respuesta de ACR-20 con 95% de límites de confianza. Las respuestas parecen ser dependientes de la dosis con una respuesta clara importante a 10 mg/kg peso corporal del paciente.

El porcentaje de pacientes que tuvo cuentas de articulaciones sensibles e hinchadas reducidas en comparación con los pacientes que no tuvieron respuesta al tratamiento con CTLA4Ig, L104EA29YIg, o placebo, se muestra en las 5 figuras 4A y B. Las respuestas terapéuticas parecen ser dependientes de la dosis. Un porcentaje mayor de pacientes mostró mejora de 20, 50, 70 y un 100% en los grupos de 20 y 10 mg/kg en ambos productos.

El porcentaje de pacientes que tuvo dolor reducido, 10 actividad de enfermedad evaluada por el paciente y unidades de registro medio del médico con CTLA4Ig, L104EA29YIg o placebo, se muestra en las figura 5A, B, C y D. Las respuestas terapéuticas cuando se observan por 15 escala Likert, parecen ser dependientes de la dosis a favor de los grupos de tratamiento activo en comparación el placebo el día 85. La escala de Likert es una escala de calificación verbal validada utilizando adjetivos para 20 calificar los síntomas (Conjunto Central Preliminar del Colegio Americano de Reumatología de Medidas de Actividad de Enfermedad para Ensayos Clínicos de Artritis Reumatoide: Arthritis and Rheumatism, June 1993, 36(6):729-740).

Las evaluaciones del paciente y del médico del cambio en la actividad de la enfermedad a partir de la línea base por al 25 menos 2 unidades, resultantes del tratamiento con CTLA4Ig,

~~471~~ 473

L104EA29YIg, o placebo, se muestran en las figuras 6A y B. Las respuestas parecen ser dependientes de la dosis con una mejora más notable para las dosis más elevadas de fármaco activo.

El porcentaje de reducción en los niveles de la proteína reactiva C (CRP) en pacientes tratados con CTLA4Ig, L104EA29YIg, o placebo se muestran en las figura 7A y B. Las respuestas parecen ser dependientes de la dosis con una disminución clara para los grupos de tratamiento activos con 2 y 10 mg/kg. Además, la figura 7B mostró que la diferencia es bastante importante en comparación con el placebo con intervalos de confianza del 95%. La figura 7C muestra los cambios en los cambio del nivel de suero a partir de la línea base en el día 85.

La cantidad de receptor IL-2 soluble en suero en pacientes tratados con CTLA4Ig, L104EA29YIg, o placebo, se muestra en la figura 8. La reducción en los niveles del receptor soluble IL-2 parece ser dependiente de la dosis.

La cantidad de ICAM-1 soluble en suero y E-selectina en pacientes tratados con CTLA4Ig, L104EA29YIg, o placebo, se muestra en la figura 33. La reducción en los niveles de ICAM-1 soluble y E-selectina soluble parecen ser dependientes de la dosis.

Los conteos de la mediana y de la media de articulaciones sensibles en pacientes tratados con CTLA4Ig o placebo con el tiempo se muestra en las figura 9A y B. El cambio desde de la línea base (por ejemplo, reducción en las

472 474

articulaciones sensibles) parece ser más importante en los grupos tratados con 2 y 10 mg/kg que en los grupos de placebo o 0.5 mg/kg.

Los conteos de mediana y de media de articulaciones hinchadas en pacientes tratados con CTLA4Ig o placebo con el tiempo se muestran en las figuras 10A y B. El cambio desde la línea base (por ejemplo, reducción en las articulaciones hinchadas) parece ser más importante en los grupos tratados con 2 y 10 mg/kg que en los grupos con placebo o 0.5 mg/kg.

Los registros de evaluación del dolor medio con el tiempo en pacientes tratados con CTLA4Ig o placebo se muestra en la figura 11. El cambio desde la línea base (por ejemplo, reducción en el dolor) parece ser más importante en los grupos tratados con 2 y 10 mg/kg que en los grupos con placebo o 0.5 mg/kg.

Los registros de evaluación de la actividad de enfermedad media evaluados por el paciente o el médico en pacientes tratados con CTLA4Ig o placebo con el tiempo se muestran en las figuras 12A y 12B. El cambio de la línea base (por ejemplo reducción en la actividad de la enfermedad) parece ser más importante en los grupos tratados con 2 y 10 mg/kg en el placebo o los grupos de 0.5 mg/kg.

Los conteos de articulaciones sensibles de media y mediana en pacientes tratados con L104EA29YIg (denotados como LEA en las figuras) o el placebo con el tiempo se muestran en

~~477~~ 475

las figuras 13A y B. El cambio desde la línea base (por ejemplo reducción en las articulaciones sensibles) parece ser dependiente de la dosis.

Los conteos de articulaciones hinchadas mediana y media en pacientes tratados con L104EA29YIg (denotados como LE en las figuras) o con el placebo con el tiempo se muestran en las figuras 14A y B. El cambio de la línea base (por ejemplo reducción en las articulaciones hinchadas) parece ser más importante en los grupos tratados con 2 y 10 mg/kg que con el placebo o en los grupos con 0.5 mg/kg.

Los registros de evaluación media del dolor en pacientes tratados con L104EA29YIg (denotados como Lea en las figuras) o con el placebo con el tiempo se muestran en la figura 15. El cambio desde la línea base (por ejemplo reducción en el dolor) parece ser dependiente de la dosis.

Los registros de evaluación de la actividad de enfermedad media evaluada por paciente o médico en pacientes tratados con L104EA29YIg (denotado como LEA en las figuras) o el placebo con el tiempo se muestran en las figuras 16A y B. El cambio desde la línea base (por ejemplo reducción en la actividad de la enfermedad) parece ser dependiente de la dosis.

El porcentaje de mejora de la discapacidad física evaluada por HAQ el día 85 para pacientes tratados con CTLA4Ig, L104EA29YIg o placebo se muestran en la Figura 17

~~474~~ 476

(Cuestionario de Evaluación de la Salud (HAQ); Eries, J F., et al., 1982 J. Of Rheumatology 9:789-793). Existe una clara mejora dependiente de la dosis con este parámetro.

Los cambios de la línea base para los niveles de proteína reactivas C y soluble con IL-2r fueron dependientes de la dosis en ambos grupos de tratamiento. después del tratamiento, los niveles solubles de IL-2r fueron de -2%, -10% y -22% para CTLA4Ig y -4%, -18%, y -32% para L104EA29YIg a 0.5, 2.0 y 10.0 mg/kg respectivamente, en comparación con +3% para el placebo. Los niveles de proteína reactivas C fueron +12%, -15% y -32% para CTLA4Ig y +47%, -33% y -47% para L104EA29YIg a 0.5, 2.0 y 10.0 mg/kg respectivamente en comparación con +20% para el placebo (figura 7a).

No se observaron hallazgos clínicamente notables con respecto a la prueba de hematología de rutina, prueba de laboratorio en química con la excepción de ligeras supresiones en los niveles de IgA e IgG a dosis superiores de ambos fármacos, hallazgos físicos o evaluaciones de signos vitales. De manera notable ninguna medicación indujo anticuerpos específicos del fármaco.

EJEMPLO 4

Los siguientes ejemplos describen estudios clínicos de fase II de pacientes humanos que se administrarán

~~447~~ 477

L104EA29YIg para reducir o prevenir el daño estructural, incluyendo erosión del hueso o de las articulaciones usando escalas radiográficas validadas. Esta mejora en la reducción o prevención del daño estructural es
5 paralela a la mejora clínica medida por los parámetros clínicos.

El estado de la estructura del hueso se observa en algunos de los pacientes humanos previo al tratamiento con CTLA4Ig o L104EA29YIg. Estos pacientes se
10 administran desde 0.5 hasta 20 mg/kg de CTLA4Ig o L104EA29YIg crónicamente cada 2 a 12 semanas (solo o en combinación con otros agentes) para mantener su mejora terapéutica con el tiempo. Se toman radiografías de las manos y los pies de los pacientes en intervalos
15 predefinidos: 6 meses y luego anualmente como se recomienda por los lineamientos de FDA. Estos pacientes se observan en una extensión de largo plazo después de 6 y 12 meses para determinar si el tratamiento con CTL4Ig o L104EA29YIg reduce el avance del deterioro del
20 hueso y luego anualmente. Los pacientes se observan por métodos radiográficos incluyendo formación de imágenes de resonancia magnética y/o rayos x (MRI) de acuerdo con la practica estándar en el arte (Larsen, A. K. And M. Eek 1977 Acta. Radiol. Diag. 18:481-491; Sharp, J.
25 T., et al., 1985 Arthritis and Rheumatism 28:1326-

~~476~~ 478

1335). Se evalúan los resultados de los datos radiográficos para la prevención del daño estructural, incluyendo el aligeramiento del avance de la erosión del hueso y el daño al cartílago, con el espacio en 5 articulaciones siendo más estrecho y/o la prevención de nuevas erosiones.

EJEMPLO 5

Estudio para evaluar la seguridad y eficacia clínica de 7
10 dosis diferentes de CTLA4Ig administradas por vía intravenosa
a sujetos con artritis reumatoide activa mientras reciben
metotrexato

El tratamiento de la artritis reumatoide (RA) está cambiando rápidamente con una voluntad creciente de usar 15 terapias más agresivas para lograr mayores incrementos en la eficacia y mayores velocidades de éxito. La meta final es mejorar la condición del sujeto en una forma más intensiva, al elevar la rapidez de una respuesta clínica completa e importante, al tratamiento y mantener este beneficio con 20 seguridad aceptable.

El metotrexato permanece como la piedra angular del tratamiento de la RA. Fue el primer agente que demostró un comienzo temprano-de acción, eficacia superior y tolerancia comparado con los DMARDs (por ejemplo oro, hidroxycloroquina, 25 sulfasalasina) usados para tratar RA. Se puede observar el

~~477~~ 479

beneficio clínico tan pronto como 3 semanas después de iniciar el tratamiento, y la mejora máxima se logra generalmente por 6 meses. Sin embargo, el metotrexato tiene diversas limitaciones. Por ejemplo a pesar de su tolerancia
5 aumentada, la ventana entre la eficacia y la toxicidad del hígado es bastante estrecha. Los sujetos tratados con metotrexato requieren una observación cuidadosa y la toxicidad inaceptable es a menudo la razón para discontinuar el tratamiento.

10 El metotrexato tampoco parece controlar eficientemente el avance de la enfermedad o el deterioro de las articulaciones. Para algunos sujetos, los practicantes se sienten obligados a agregar un segundo DMARD con la esperanza de una eficacia mejorada a pesar
15 del riesgo de una toxicidad aumentada. Alternativamente, el co-tratamiento con metotrexato y un bloqueador co-estimulador (por ejemplo los bloqueadores CD80 y CD86 tales como CTLA4Ig) que atacan el mecanismo autoinmune que se encuentra encima de la cascada inflamatoria de
20 citocinas, también puede incrementar la eficacia.

Como se observa en el ejemplo 3 anterior, se observaron respuestas clínicas importantes y reducciones en los marcadores substitutos de la actividad de la enfermedad para CTLA4Ig a dosis de 2 y 10 mg/kg como un
25 buen perfil de tolerancia. También se ha confirmado que

~~477~~ 480

el CTLA4Ig en composición usado en el ejemplo 3 anterior no indujo ningunos efectos colaterales. Como resultado, se decidió continuar el desarrollo clínico de CTLA4Ig para la artritis reumatoide en la fase IIB.

5 Lo siguiente proporciona una descripción del estudio clínico de fase IIB de paciente humanos, a quienes se les administró la molécula soluble de CTLA4 con metotrexato y los resultados del estudio después de 6 meses.

10 Este ejemplo describe un estudio de 12 meses en el cual se evaluó la eficacia primaria después de que todos los sujetos terminaron 6 meses de tratamiento o descontinuaron la terapia. También se evaluaron el avance de la enfermedad y la eficacia y seguridad a lo
15 largo de la duración del estudio.

 El estudio utilizó un diseño de dosificación en paralelo, controlado por placebo, de doble ciego, aleatorio. El estudio se diseñó para evaluar la seguridad, actividad clínica, inmunogenicidad y
20 farmacocinética de 2 dosis de CTLA4Ig: 2 o 10 mg/kg. Un total de aproximadamente 330 sujetos con RA activa y que recibían metotrexato se colocaron de manera aleatoria en uno de 3 extremos de dosificación: CTLA4Ig a 2 mg/kg (N= 110), 10 mg/kg (N= 110) y el grupo de control de placebo
25 (N= 110) a quien se le dieron infusiones mensuales por

427 481

12 meses. Todos los grupos continuaron en un tratamiento semanal de metotrexato (10-30 semanalmente) (Figura 57-62).

También se administraron CTLA4Ig o un placebo en el día 15. Cada dosis del medicamento de estudio se aplicó la infusión por vía intravenosa durante aproximadamente 30 minutos. El punto final de eficacia primaria fue la velocidad de respuesta de ACR 20 después de 6 meses.

10 Durante los primeros 6 meses no se les permitió a los sujetos alterar sus dosis de corticoesteroides, glucocorticoides o NSAIDs. Tampoco se permitieron incrementos en el metotrexato durante los primeros 6 meses. Se permitieron solamente disminuciones en el metotrexato si se sentía que provocaba toxicidad. Se trataron sujetos con metotrexato por al menos 6 meses y a una dosis estable por 28 días previo al primer tratamiento de CTLA4Ig o placebo. No se permitieron DMARD diferentes al metotrexato. El uso de corticoesteroides estables de baja dosis (a 10 mg por día o menos) y/o el uso de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs), incluyendo el ácido acetil salicílico (ASA) se permitió. Se permitieron analgésicos que no contenían ASA o NSAIDs en sujetos que experimentan dolor que no se controla adecuadamente por

25

~~480~~ 482

la línea base y los medicamentos de estudio, excepto 12 horas antes de una evaluación de las articulaciones. Se permitieron disminuciones de NSAIDs pero solamente si se debía a eventos adversos tales como toxicidad

5 gastrointestinal.

Producto de prueba, dosis y modo de administración, duración del tratamiento

CTLA4Ig a 2 mg/kg o 10 mg/kg se colocó por infusión cada

10 2 semanas por el primer mes y mensualmente de allí en adelante por 12 meses.

Todos los sujetos recibieron dosis semanales de metotrexato (10-30 mg) por al menos 6 meses previo a la colocación aleatoria y se mantuvieron con una dosis de

15 entrada por los primeros 6 meses del ensayo. Las dosis solamente se pudieron disminuir por toxicidad durante los primeros 6 meses.

Criterios para evaluación

20 El punto final primario de la primera etapa del estudio fue la proporción de sujetos que reúnen los criterios del Colegio Americano de Reumatología con una mejora del 20% (ACR 20) en el día 180 (sexto mes). La definición de ACR 20 de la mejora es una mejora del 20% desde la línea base en el número

25 de cuentas de articulaciones sensibles e hinchadas y una

~~481~~ 483

mejora del 20% desde la línea base en 3 de las siguientes 5 mediciones del conjunto central: evaluación global del sujeto en cuanto al dolor, evaluación global del sujeto de la actividad de la enfermedad, evaluación global del médico de la actividad de enfermedad, evaluación del sujeto de la función física y el valor de reactivo de fase aguda (proteína reactiva C (CRP)). La evaluación para una mejora del 50% (ACR 50) y una mejora del 70% (ACR 70) siguen similarmente. Los sujetos quienes descontinuaron el estudio debido a una falta de eficacia (esto es, empeoramiento del RA) se consideraron como sin respuesta al ACR desde ese tiempo en adelante. Para todos los sujetos que abandonaron por otras razones, su respuesta a ACR al momento de la descontinuación se llevó a adelante.

15

Métodos estadísticos.

Dos dosis de CTLA4Ig (2 mg/kg y 10 mg/kg) se compararon con el grupo de control de placebo. Todos los sujetos se mantuvieron en las mismas dosis de entrada estables de metotrexato. El análisis primario fue la comparación de CTLA4Ig 10 mg/kg con el placebo. Los tamaños de muestra se basaron en un nivel de 5% (extremo 2) de importancia. Con base en los estudios publicados, la velocidad de respuesta del placebo más el control de metotrexato de ACR20 en 6 meses es de alrededor de 25%. Se determinó una muestra 107 sujetos

25

~~48~~ 484

(ajustado por un abandono posible del 15%) por extremo de tratamiento para producir una potencia de 94% para detectar una diferencia de 25% a una nivel de 5% (2 extremos). Similarmente, se determinó la muestra para producir una potencia de 95% y 90% para detectar las diferencias de 20% y 14% en ACR 50 y ACR 70, respectivamente. Si la comparación entre el CTLA4Ig 10 mg/kg y el placebo fue importante con respecto a ACR 20, luego la comparación entre CTLA4Ig 2 mg/kg y el placebo se llevó a cabo. Esta segunda prueba debió tener una potencia de 88%. Este procedimiento secuencialmente de rechazo con base en las pruebas de Chi cuadrada también se usó para probar las diferencias en las respuestas de ACR 50 y ACR 70.

Todos los análisis de eficacia se basaron en un conjunto de datos que contienen todas las evaluaciones disponibles de todos los sujetos que recibieron al menos una dosis del medicamento de estudio.

Los cambios en porcentaje de la línea base también se reportaron para los componentes individuales de los ACR. Para los sujetos que descontinuaron se trasladó su última observación.

~~485~~ 485

Resultados

Características de línea base de demografía

TABLA III

Disposición del sujeto y demografía

5		Metotrexato + CTLA4Ig 10 mg/kg	Metotrexato + CTLA4Ig 2 mg/kg	Metotrexato + placebo
	Enrolamiento/aleatorio	115	105	190
	Terminado	99 (86.1%)	82 (78.1%)	78 (65.5%)
10	Descontinuado	16 (13.9%)	23 (21.9%)	41 (34.5 %)
	- Eventos adversos	2 (1.7%)	7 (6.7%)	7 (5.9%)
	- Falta de eficacia	12 (10.4%)	13 (12.4%)	29 (24.4%)
	- Otros	2 (1.7%)	3 (2.9%)	5 (4.2%)
15	Edad (años) - Media (rango)	55.8 (17-83)	54.4 (23-80)	54.7 (23- 80)
	Peso (kg) - Media (rango)	77.8 (40.1 - 144)	78.7 (48.4 - 186.8)	79.9 (44 - 140)

20

25

CTLA 486

	Metotrexato + CTLA4Ig 10 mg/kg	Metotrexato + CTLA4Ig 2 mg/kg	Metotrexato + placebo
Sexo	75% femeninos	63% femeninos	66% femeninos
Raza	87% blancos	87% blancos	87% blancos
Duración de la enfermedad (años) media $\pm$ SD	9.7 $\pm$ 9.8	9.7 $\pm$ 8.1	8.9 $\pm$ 8.3

5

10

Las características clínicas de línea base y demográficas fueron similares entre los grupos de tratamiento. 63 a 75% de los sujetos fueron femeninos, 87% fueron Caucásicos. La duración media de la enfermedad en la entrada fue de 9.7 $\pm$ 9.8, 9.7 $\pm$ 8.1, y 8.9 $\pm$ 8.3 años respectivamente en el grupo de 10.2 mg/kg y en el de control. El peso medio en kg fue muy similar entre 77.8 y 79.9 kg con un rango de 40.1 hasta 186.8 kg (Tabla III).

15

Después de 6 meses, más sujetos habían descontinuado del grupo de control (35.5%) que de los grupos de tratamiento activo; 13.9% y 21.9% para los grupos tratados con 10 y 2 mg/kg, respectivamente. La razón principal fue la falta de eficacia con 24.3% descontinuado en el grupo de control, lo opuesto a 12.4% y 10.4% descontinuado en los grupos de 2 y 10 mg/kg, respectivamente. La velocidad de descontinuación

20

25

~~28/1~~ 487

debida a eventos adversos fue menor en el grupo de 10 mg/kg con 1.7%, mientras que fue de 6.7% y 5.9% en los grupos de control y de 2 mg/kg, respectivamente.

5 Durante los primeros 3-4 meses, las discontinuaciones aparecieron a una velocidad más rápida en el grupo de control en comparación con los grupos de tratamiento activo. Después del día 120, las discontinuaciones para todos los grupos de tratamiento se estabilizaron para la duración del periodo de tratamiento primario (6 meses).

10

TABLA IV
Características clínicas de línea base

15

20

25

	Metotrexato + CTLA4Ig 10 mg/kg (n= 115)	Metotrexato + CTLA4Ig 2 mg/kg (n= 105)	Metotrexato + placebo (n= 119)
Articulaciones sensibles (media ± SD)	30.8 ± 12.2	28.2 ± 12.0	29.2 ± 13.0
Articulaciones hinchadas (media ± SD)	21.3 ± 8.4	20.2 ± 8.9	21.8 ± 8.8
Dolor (VAS 100 mm) (media ± SD)	62.1 ± 21.4	64.5 ± 22.3	65.2 ± 22.1

~~446~~ 498

	Metotrexato + CTLA4Ig 10 mg/kg (n= 115)	Metotrexato + CTLA4Ig 2 mg/kg (n= 105)	Metotrexato + placebo (n= 119)
5 Función física (registro MHAQ de 0 a 3) (media $\pm$ SD)	1.0 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.6
10 Evaluación global del sujeto (VAS 100 mm) (media $\pm$ SD)	60.1 $\pm$ 20.7	59.4 $\pm$ 23.7	62.8 $\pm$ 21.6
15 Evaluación global del médico (VAS 100 mm) (media $\pm$ SD)	62.1 $\pm$ 14.8	61.0 $\pm$ 16.7	63.3 $\pm$ 15.5
CRP (mg/dL)	2.9 $\pm$ 2.8	3.2 $\pm$ 2.6	3.2 $\pm$ 3.2
Entumecimiento matutino (en min.)	97.9 $\pm$ 63.1	104 $\pm$ 63.9	106.0 $\pm$ 64.2

20 El número medio de articulaciones hinchadas y sensibles
en la línea base fue comparable entre los 3 grupos de
tratamiento. El número medio de articulaciones sensibles y
articulaciones hinchadas en el grupo de 10 mg fue de 30.8 $\pm$
12.2 y 21.3 $\pm$ 8.4, respectivamente. El número medio de
25 articulaciones sensibles y articulaciones hinchadas en el

~~488~~ 489

grupo de 2 mg fue de 28.2 ± 12.0 y 20.2 ± 8.9 ,
respectivamente. El número medio de articulaciones sensibles
y articulaciones hinchadas en el grupo de control fue de 29.2
 ± 13.0 y 21.8 ± 8.8 , respectivamente. Estas evaluaciones y
5 todas la otras evaluaciones clínicas fueron similares entre
todos los grupos de tratamiento (Tabla IV):

Respuestas ACR y componentes del núcleo

10

TABLA V

Respuesta ACR a los 6 meses

15

20

25

	Metotrexato+ CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	Metotrexato+ CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	Metotrexato+ Placebo (n = 119)
ACR20	60.0%	41.9%	35.3%
Diferencia del grupo de control	24.7	6.6	-
95% CI -	11.9, 37.5	-6.2, 19.4	-
Valor p	<0.001	0.31	-
ACR50	36.5%	22.9%	11.8%
Diferencia del grupo de control	24.8	11.1	-

488
490

5

10

	Metotrexato+ CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	Metotrexato+ CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	Metotrexato+ Placebo (n = 119)
95% CI	13.8, 35.7	1.2, 20.9	-
Valor p	<0.001	0.027	-
ACR70	16.5%	10.5%	1.7%
Diferencia del grupo de control	14.8	8.8	-
95% CI	7.5, 22.2	2.7, 14.9	-
Valor p	<0.001	0.005	-

Las mejoras en las tasas de respuesta de ACR 20, 50 y 70 en el grupo de tratamiento con 10 mg/kg a los 6 meses con relación al grupo de control con metotrexato fueron estadísticamente importante (figuras 34-38, 40). Las mejoras en el ACR50 y ACR 70 para el grupo de 2 mg/kg también fueron estadísticamente importantes. La diferencia en la respuesta en ACR 20 entre el grupo 2mg/kg y el grupo de control fue 6.6%. Esta diferencia no fue estadísticamente importante, p = 0.31 (Tabla V, figura 49).

Las figuras 34-37 presentan tasas de respuesta ACR desde el día 1 hasta el día 180. Las figuras 38 y 40 presentan las tasas de respuesta ACR20, -50 y -70 el día 180 para los

~~4814~~ 491

diversos grupos de tratamiento. Las tasas de respuesta de ACR50 y ACR70 sugieren la posibilidad de que la eficacia máxima pudiera no lograrse a 10 mg/kg.

La figura 39 muestra la proporción de nuevas articulaciones sensibles e hinchadas en el día 180 del estudio después de la terapia con metotrexato solo o en combinación con CTLA4Ig (administrado a 2 ó 10 mg/kg de peso corporal del sujeto).

La figura 46 muestra la mejora en porcentaje medio en la función física desde la línea base cuando se mide por HAQ.

TABLA VI
Componentes individuales de ACR el día 180
(mejora en el porcentaje medio)

15	Componentes del núcleo	Metotrexato+ CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	Metotrexato+ CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	Metotrexato+ Placebo (n = 119)
20	Articulaciones sensibles	59.9%	43.3%	32.1%
	Articulaciones hinchadas	54.9%	45.1%	33.4%
	Dolor	46.4%	22.7%	8.4%
25	Función física (mHAQ)	41.5%	17.3%	14.1%

492

Componentes del núcleo	Metotrexato+ CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	Metotrexato+ CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	Metotrexato+ Placebo (n = 119)
Evaluación global del sujeto	40.8%	9.6%	17.6%
Evaluación global del médico	52.0%	38.6%	25.6%
CRP	31.5%	16.2%	-23.6%

10

Los grupos con dosis de 2 y 10 mg/kg demostraron algún grado de eficacia de entre todos los componentes clínicos de los criterios de respuesta ACR (Tabla VI; Figuras 41-45, 47-48); la evaluación global del sujeto en el grupo de dosis de 2 mg/kg es la única excepción. La reducción de las articulaciones sensibles e hinchadas parece ser dependiente de la dosis. El número de articulaciones sensibles se disminuyó por 59.9%, 43.3% y 32.1% en los grupos de 10 mg/kg, 2 mg/k y control, respectivamente. Se observó un patrón similar para los conteos de articulaciones hinchadas con una disminución de 59.9%, 45.1% y 33.4% con los grupos de 10 mg/kg, 2 mg/k y control, respectivamente. Las mayores diferencias con relación al grupo de control se observaron con la evaluación de dolor la cual disminuyó 46.4%, y 22.7% con relación a la línea base para 10 mg y 2 mg/kg CTLA4IG, respectivamente, en comparación con 8.45 en el grupo de control. El CRP medio disminuyó 31.5% t 16.2% con relación a la línea

~~491~~ 493

base en los grupos de 10 y 2 mg/kg en comparación con un incremento de 23.6% en el grupo de control.

Calidad de vida relacionada con la salud

5 El impacto de CTLA4Ig en la calidad de vida relacionada con la salud (HRQOL) se midió por una forma corta del Estudio de Resultados Médicos 36 (SF-36). El SF-36 se administró a todos los sujetos en la línea base, 90 y 180 días. El SF-36 consiste de 36 partes que cubren 8 dominios (función física, rol físico, dolor corporal, salud
10 general, vitalidad, función social, rol emocional y salud mental). Estos dominios individuales se usan para derivar los registros del resumen de componentes físicos y mentales en el intervalo de 0 a 100 con los mayores registros que indican una mejor calidad de vida.

Las diferencias absolutas de 5 o más en los registros de SF-36
15 se consideraron clínicamente significativas.

Comparado con los sujetos comparados con el placebo, los sujetos en el grupos de CTLA4Ig 10 mg/kg también experimentaron una mejora estadísticamente significativamente mayor en todos los 8 dominios de SF-36 (Figura 50-51). Para los sujetos tratados con
20 CTLA4Ig 2 mg/kg, la mejoras también fueron mejores que aquellos tratados con placebo pero las diferencias no fueron estadísticamente importantes (Figura 50-51).

Los registros de línea base de SF-36 fueron comparables entre los tres grupos de tratamiento. Las mejoras en calidad de vida
25 muestran una tendencia clara de respuesta a la dosis después de 6

493
494

meses de tratamiento.- Los sujetos en el grupo de tratamiento con CTLA4IG 10 mg/kg demostraron mejoras clínica y estadísticamente importantes de la línea base en todos los 8 dominios de SF-36. Los mayores efectos se muestran en los dominios de rol físico, dolor corporal y rol emocional. Este hallazgo positivo fue consistente con los resultados de eficacia. Para los sujetos tratados con CTLA4Ig 2 mg/kg las mejoras de la línea base también fueron estadísticamente importantes para todos los dominios excepto la salud mental.

10 Farmacocinética

Valores de parámetros farmacocinéticos

	C _{MAX} (µG/ML)	T _{MAX} (H)	AUC (TAU) (µG.H/ML)	T-MEDIA (Días)	CLT (ML/H/KG)	VSS (L/KG)
2 mg/kg						
15 MEDIA	57.96	0.50*	10176.14	13.50	0.23	0.07
DS	16.93	(0.00, 4.00)	3069.84	5.91	0.13	0.04
N	15	15	15	15	15	15
10 mg/kg						
20 MEDIA	292.09	0.50*	50102.56	13.11	0.22	0.07
DS	67.78	(0.00, 4.00)	15345.95	5.32	0.09	0.03
N	14	14	14	14	14	14

25 *Mediana (mínimo, máximo)

LA 7495

Las farmacocinética de CTLA4Ig se derivó de los datos de concentración en suero contra tiempo entre los días de dosis 60 y 90. Se recolectaron las muestras previo a la dosificación en los días 60, a 0.5 y 4 H después de la dosis, en los días 67, 74, 81 y 5 previo a la dosificación en el día 90. Los datos preliminares indican que ambos valores de Cmax y AUC se incrementan en una proporción comparable con el incremento de la dosis. Para dosis nominales que se incrementan en una proporción de 1:5, ambos valores de Cmax y AUC se incrementaron en una proporción de 1:5.04 y 1:4.92, respectivamente. Los valores T-HALF, CLT y Vss parecieron ser comparables e independientes de la dosis.

Los valores medios de Vss fueron de 0.07 L/Kg para ambos niveles de dosis, que fue de aproximadamente 1.6 veces del volumen de plasma.

15

Farmacodinámica

TABLA VII
Valores de línea base media para los biomarcadores farmacodinámicos

20

25

Biomarcador	Metotrexato+ CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	Metotrexato+ CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	Metotrexato+ Placebo (n = 119)
CRP (mg/dL)	2.9	3.2	3.2
RF (IU/L)	207	274	179

494 496

Biomarcador	Metotrexato+ CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	Metotrexato+ CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	Metotrexato+ Placebo (n = 119)
IL-2r (pg/ml)	1388	1407	1398
IL-6 (pg/ml)	26.7	31.7	21.4
TNF α (pg/ml)	11.8	6.0	11.9

Los niveles en suero de los biomarcadores farmacodinámicos se analizaron en diversos tiempos durante el estudio. Los valores de línea base se muestran en la tabla VII. Los valores del día 180 con relación a la línea base se muestra en las figuras 52-56.

Los niveles CRP disminuyeron de la línea base tanto en los grupos tratados con CTLA4Ig más que en el grupo de control, con una mayor reducción observada en el grupo de dosificación con 10 mg/kg (Ver figuras 47, 48 y 52).

Los niveles del factor reumatoide disminuyeron de la línea base tanto en los grupo tratados con CTLA4Ig más que el grupo de control con una mayor reducción observada en los grupos de dosificación de 10 mg/kg (Ver figura 53).

Los niveles de IL-2r solubles disminuyeron de la línea base tanto en los grupos tratados con CTLA4Ig más que en el grupo de control, con una mayor reducción

497 497

observada en el grupo de dosificación de 10 mg/kg (Ver figura 54).

Los niveles en suero de IL-6 disminuyeron en ambos grupos tratados con CTLA4Ig más que en el grupo de control (Ver figura 55).

Los efectos de CTLA4Ig en los niveles de TNF α en suero no fueron concluyentes. El grupo de 2 mg/kg incremento y el grupo de 10 mg/kg disminuyo con relación al grupo de control (Ver Figura 56).

10

Seguridad

CTLA4Ig fue bien tolerado en todas las dosis. No hubo muertes, malignidades o infecciones oportunistas en ninguno de los sujetos que recibieron CTLA4Ig. Los eventos adversos serios (SAEs) y los eventos adversos no serios (NSAEs) fueron similares o menos frecuentes en los grupos de tratamiento activos en comparación con el grupo de control.

Menores sujetos en el grupo de 10 mg/kg descontinuaron debido a eventos adversos con relación al grupo de control (1.7% vs 5.9%, respectivamente). Las discontinuaciones debidas a eventos adversos en el 2 mg/kg fueron similares con el grupo de control (6.7% vs 5.9%, respectivamente). Los SAEs siguieron un patrón similar a las discontinuaciones debidas a los eventos adversos.

~~496~~ 498

No se consideraron eventos adversos serios en el grupo de dosis de 10 mg/kg con relación a fármaco bajo estudio.

Immunogenicidad

5 No se detectaron respuestas de anticuerpos antifármacos a lo largo del día 180 a ambos niveles de dosis de CTLA4Ig.

CTLA4Ig redujo significativamente los signos y los síntomas de la artritis reumatoide en sujetos que recibieron metotrexato cuando se evalúa por los criterios de respuesta
10 ACR. Los efectos de CTLA4Ig parecen incrementarse en proporción al nivel de dosis. La mejora de la línea base en todos los componentes del núcleo de ACR, es mayor en el grupo de 10 mg/kg/ que en el grupo de 2 mg/kg. CTLA4Ig a dosis de 10 mg/kg demostró mejoras clínicas y estadísticamente importantes en
15 todos los 8 dominios del SF-36. Todos los biomarcadores farmacodinámicos ensayados parecieron disminuir en proporción al nivel de dosis de CTLA4Ig excepto para TNF α . CTLA4Ig fue seguro y bien tolerado en sujetos con artritis reumatoide que reciben metotrexato. El perfil del evento adverso para ambas
20 dosis de CTLA4I fue similar con el grupo de control.

EJEMPLO 6

Un estudio de un bloqueador de co-estimulación, CTLA4Ig, dado mensualmente en combinación con Etanercept a pacientes con
25 artritis reumatoide activa

~~491~~ 499

El siguiente ejemplo proporciona una descripción de la administración de CTLA4Ig en combinación etanercept, para tratar pacientes con artritis reumatoide activa.

Etanercept, junto con infliximab, comprende una nueva
5 generación de fármacos contra la artritis reumatoide que atacan el factor de necrosis de tumor (TNF. Etanercept es una proteína de fusión dimérica que tiene una porción extracelular del receptor TNF ligado a la porción Fc de la inmunoglobulina humana (IgG1). Esta proteína de fusión se
10 enlaza a TNF, bloquea sus interacciones con los receptores TNF de superficie celular y hace a las moléculas TNF biológicamente inactivas.

Este ejemplo describe un estudio de doce meses en el cual se evalúa la eficacia después de que todos los sujetos
15 completaron 6 meses de tratamiento o de terapia discontinua. También se evaluaron el avance de la enfermedad, la eficacia y la seguridad a los largo de la duración del estudio.

El estudio utilizó un diseño de dosificación paralelo controlado por placebo de doble ciego aleatorio.
20 Un total de aproximadamente 141 sujetos con RA activa y que reciben etanercept (25 mg dos veces por semana) se colocaron de manera aleatoria en 1 de 2 grupos de dosificación: 1) un grupo recibe CTLA4Ig a 25 mg/kg (n = 94) más etanercept o 2) un grupo placebo recibe solamente
25 etanercept (n = 47).

~~11916~~ - 500

Producto de prueba, dosis y modo de administración, duración de tratamiento

Todos los sujetos que recibieron etanercept (25 mg veces por semana) por al menos 3 meses previo al tratamiento.

5 Se dieron infusiones de CTLA4Ig en los días 1, 15, 30 y mensualmente de ahí en adelante durante 6 meses (fase de tratamiento primario). Cada dosis del medicamento bajo estudio se colocó en infusión intravenosa por aproximadamente 30 minutos.

10 La fase de tratamiento primaria del estudio tuvo lugar durante los primeros 6 meses de tratamiento. Durante este periodo, se les requirió a los sujetos permanecer en dosis estables de etanercept (25 mg dos veces por semana). No se permitieron DMARDs diferente al etanercept. Corticosteroides
15 estables de baja dosis (a 10 mg diario o menor) y/o fármaco anti-inflamatorio no esterooidal estable (NSAID), incluyendo ácidos acetil salicílico (ASA), en su uso se permitió. Se permitieron los analgésicos (que no contenían ASA o NSAIDs) en sujetos que experimentaron dolor que no se controló adecuadamente por la
20 línea base y los medicamentos bajo estudio excepto durante 12 horas antes de la evaluación de la articulación.

Criterios para evaluación

El punto final primario de este estudio fue recolectar
25 datos referentes a la proporción de sujetos que reúnen los

~~CLIA~~ 501

criterios modificados del colegio americano de reumatología (ACR) para una mejora del 20% (ACR 20) después de 6 meses. Los criterios modificados de ARC20 se usaron para acomodar niveles bajos de CRP en la población de sujetos del estudio. SE

5 definieron los criterios ACR modificados como 1) mayor de 20% de mejora en el conteo de articulaciones sensibles e hinchadas y 2) mayor de 20% de mejora en 2 de las cuatro medidas de conjunto de datos centrales restantes (dolor global, médico, sujeto, evaluación funcional). CRP, que es normalmente una parte de los

10 conjuntos de datos de núcleos de ACR estándar, no se incluyó en los criterios ACR modificados debido a los bajos niveles de CRP en sujetos que usan bloqueadores TNF tales como etanercept. Los criterios estándar de ACR y dos criterios alternativos (salud física SF-36 y salud mental de SF-36) también se evaluaron como

15 puntos finales secundarios.

Métodos estadísticos

El tratamiento de un grupo de pacientes con CTLA4Ig 2mg/kg en combinación con etanercept se comparó con un grupo de control

20 tratado con placebo más etanercept. Con base en los estudios previo con etanercept con poblaciones de pacientes similares, se asumió que la velocidad de respuesta ACR20 modificada (criterios modificados para evaluación) en 6 meses sería de 35% en el grupo de control. Esta es la proporción de respuesta esperada entre

25 sujetos que no respondieron adecuadamente a la terapia de

502

etanercept. Al usar una aleatorización de 2:1, una muestra de 141 sujetos (ajustados por una deserción posible de 10%) (47 control/94 CTLA4Ig) produjo una potencia de 90% para detectar una diferencia de 30% a un nivel de 5% de importancia (extremo 5 2, con base en la prueba chi-cuadrada sin ajuste para corrección de continuidad).

Similarmente, la muestra se determinó que producía una potencia de 91% y 83% para detectar diferencias de 30 y 25% en ACR 50 y 70, respectivamente. Sin embargo, debido al lento 10 enrolamiento, solamente 122 sujetos se colocaron de manera aleatoria y 121 se trataron y analizaron (un sujeto se colocó de manera aleatoria pero nunca recibió tratamiento).

Características de demografía y de línea base

15

TABLA 1

Disposición del sujeto en el día 180

20

	CTLA4Ig etanercept	+ Placebo + etanercept	TOTAL
Aleatorio*	85	36	121
Terminado	68 (80%)	22 (61%)	90 (74%)
Descontinuado	17 (20%)	14 (39%)	31 (26%)
Eventos adversos	6 (7.0%)	1 (2.7%)	7 (6%)
Falta de eficacia	6 (7.0%)	12 (33%)	18 (15%)
Otro	5 (5.8%)	1 (2.7%)	6 (5%)

25 * Excluye a un sujeto que no recibió tratamiento

503

Después de... seis meses, la proporción de discontinuaciones totales fueron superiores (39%) en el grupo de tratamiento de placebo más etanercept en comparado con el grupo de CTLA4Ig más Etancept (20%). La diferencia se impulso por un mayor grado de discontinuación debido a la falta de eficacia en el grupo de placebo más etanercept (Tabla 1).

Las características demográficas fueron similares entre los grupos de tratamiento. La mayoría de los sujetos fueron femeninos y caucásicos. La duración media de la enfermedad fue de 13 años y la edad media fue de 52 años (Tabla 2).

TABLA 2

Características Clínicas y Demográficas de la línea Base

Media

15		CTLA4Ig + etancerpt N = 85	Placebo + etancerpt N = 36	TOTAL N = 121
	Edad media: años (rango)	50 (24-74)	55 (28-72)	52 (24-74)
20	Peso medio: Kg (rango)	81 (45-154)	79 (46-126)	81 (45-154)
	Genero: femenino: n (%)	66 (78%)	26 (72%)	92 (76%)
25	Raza: Caucasica - n (%)	80 (94%)	36 (100%)	116 (96%)

100 504

5

10

	CTLA4Ig etancerpt N = 85	+ Placebo etancerpt N = 36	+ TOTAL N = 121
Duración media de la enfermedad: años + bs	13.0 ± 10.1	12.8 ± 8.6	13.0 ± 9.7
Articulaciones sensibles (de 68) - media + bs	28.7 + 14.0	29.5 + 13.7	28.9 + 13.8
Articulaciones inchadas-(de 66) - media + bs	19.6 + 9.4	20.3 + 11.0	19.8 + 9.9

Las características clínicas de la línea base fueron similares entre los grupos de tratamiento incluyendo una media de 29 articulaciones sensibles y 20 articulaciones inchadas. Con la excepción de los valores de CRP que fueron inferiores, las características de línea base fueron típicas de los sujetos con artritis reumatoide activa y enrolados en estudios clínicos (Tabla 2).

20

Respuestas ACR y componentes del núcleo

Las mejoras en las respuestas de ACR 20 y ACR 70 en el grupo de CTLA4Ig+ etanecept fueron estadísticamente importantes en comparación con el grupo de CTLA4Ig + placebo (Tabla 3 y Figura 63).

25

305

TABLA 3

Respuesta modificada de ACR en el día 180 número de sujetos
(%)*

	ACR 20	ACR 50	ACR 70
5 CTLA4Ig + etanercept***	48.2%	25.9%	10.6%
Dif. del placebo + etanercept	20.5%	6.4%	10.6%
10 95% CI	(1.2, 39.7)	(-10.2, 23.1)	(0.4, 20.8)
Valor p	0.037**	0.448	0.042**

* Ver criterios para evaluación

**p < 0.05 (probabilidad de respuesta ACR en CTLA4Ig +
15 etanercept vs. Placebo + etanercept)

***N = 85 y N = 36 para CTLA4Ig + etanercept: y Placebo +
etanercept, respectivamente.

A los dos meses de tratamiento, se observaron respuestas
numericamente superiores en todos los componentes de los
20 criterios ACR para el grupo de CTLA4Ig más etanercept. Tres
de los siete componentes ACR se muestran en la Figura 64A-C.

Las mejoras medias en los componentes individuales de los
criterios ACR en el día 180 fueron consistentemente superiores
en el grupo de tratamiento de CTLA4Ig más etanercept comparado
25 con el grupo de placebo más etanercept (Tabla 4).

130
506

TABLA 4

**Mejora Media en Porcentaje (SE) en los componentes ACR
individuales en el Día 180**

5	Componente ACR	CTLA4Ig + etanercept N= 85	Placebo + etanercept N= 36
	Articulaciones sensibles	42% (5.5)	24% (8.3)
	Articulaciones inchadas	37% (5.0)	21% (8.1)
10	Dolor	34% (4.3)	-1% (10.8)
	Función física (MHAQ)	31% (5.2)	-5% (13.8)
	Evaluación Global del Sujeto	27% (5.4)	3% (9.5)
15	Evaluación Física del medico	43% (4.3)	27% (5.8)

Calidad de vida

En comparación con la línea base, los sujetos en el
 20 grupo de CTLA4Ig más etanercept demostraron mejoras
 estadísticamente importantes en el día 180 en todas las 8
 sub-escalas de SF-36- comparado con solamente una (función
 física) en sujetos en el grupo de placebo más etanercept. Los
 cambios absolutos en la sub-escala de HRQOL se consideraron
 25 clínicamente significativos.

27/507

Comparado con el grupo de placebo más etanercept los sujetos en el grupo CTLA4Ig más etanercept-experimentaron una mejora significativamente mayor de forma estadística en cuatro subescalas de SF-36: rol físico, dolor corporal, 5 vitalidad y función social (Figura 65). Las mejoras en las otras cuatro sub-escalas también fueron mayores que en el grupo de placebo más etanercept aunque no fueron estadísticamente importantes.

10 Seguridad

No sucedieron muertes o infecciones oportunistas durante los primeros seis meses de este estudio. Entre los eventos adversos más frecuentemente más reportados, el dolor de cabeza, infección respiratoria superior dolor musculo 15 esquelético, náusea/vómito, hipertensión y diarrea sucedieron a una velocidad superior en el grupo de CTLA4Ig más etanercept comparado con el grupo placebo más etanercept. Las anormalidades de los senos nasales y el salpullido fueron ligeramente mayores en el grupo de CTLA4Ig más etanercept 20 también.

Más sujetos en el grupo CTLA4Ig más etanercept experimentaron eventos adversos serios (SAE) (7.1%) que en el grupo de etanercept más placebo (2.8%). Sin embargo, ninguno SAEs se consideraron relacionados con el fármaco bajo 25 estudio.

~~304~~ 508

Dos sujetos que recibieron CTLA4Ig y etanercept tuvieron una malignidad dermatológica. Un sujeto tuvo un carcinoma de célula basal que se extirpo después de la visita en el día 150. El otro sujeto tuvo un carcinoma de
5 célula escamosa que fue una lesión pre-existente que el sujeto decidió que se retirara después de la visita el día 120. Otro sujeto experimento angioedema que se consideró por el investigador por ser una reacción de fármaco a la azitromicina.

10 Todos los eventos adversos (AE) que conducen a la discontinuación fueron de intensidad media o moderada. Una discontinuación en el grupo de CTLA4Ig más etanercept se debió a un tremor, se consideró como un evento adverso serio.

15

Immunogenicidad

Ninguno sujetos que recibieron CTLA4Ig
ceroconvertido para anticuerpos específicos de
CTLA4Ig o CTLA4-T. No se observó cambio importante en
20 los GMT para anticuerpos específicos de CTLA4Ig o
CTLA4-T.

Comparación entre las respuestas ACR de CTLA4Ig/etanercept y CTLA4Ig/metotrexato

25

509

TABLA 5

Respuestas ACR de CTLA4Ig + etanercept vs. CTLA4Ig + metotrexato (% de mejora):

5

10

	CTLA4Ig + Etanercept ^a (IM101-101)		CTLA4Ig + Metotrexato ^b (IM101-100)		
	2 mg/kg N= 85	0 mg/kg ^c N= 36	10 mg/kg N= 115	2 mg/kg N= 105	0 mg/kg ^c N= 119
ACR 20	48.2% ^d	27.8%	60.0% ^d	41.9%	35.3%
ACR 50	29.3%	19.4%	36.5% ^d	22.9% ^d	11.8%
ACR 70	10.6% ^d	0%	16.5% ^d	10.5% ^d	1.7%

^a ACR modificado ver criterios para evaluación

^b ACR estandar criterios

15 ^c terapia de placebo + respaldo (etanercept o metotrexato)

^d p<0.05 ACR para la diferencia en la respuesta de ACR contra terapia de placebo + respaldo

La eficacia de CTLA4Ig más etanercept a 2 mg/kg fue similar con aquella observada en los sujetos que reciben la misma dosis de terapia de CTLA4Ig más metotrexato (Ejemplo 5). Sin embargo, los criterios para la evaluación en el ensayo con metotrexato (Ejemplo 5) fue el ACR estandar que incluye CRP entre los componentes del núcleo mientras que el ensayo con etanercept (Ejemplo 6) los criterios para evaluación fueron el ACR modificado que excluye CRP.

~~50~~ 510

Conclusión

La evaluación preliminar del estudio a los seis meses encontró que CTLA4Ig (2 mg/kg) en combinación con etanercept redujo los signos y síntomas de la artritis reumatoide en comparación con el etanercept solamente. Los incrementos en los ensayos ACR20 y ACR 70 modificados fueron estadísticamente importantes. La eficacia de CTLA4Ig más la terapia con etanercept se observó dentro de un mes del comienzo del tratamiento. CTLA4Ig fue generalmente seguro y bien tolerado cuando se administra en combinación con etanercept con un perfil de seguridad similar a la terapia con etanercept sola. CTLA4Ig no fue inmunogénico durante el periodo de ensayo de seis meses. Adicionalmente, la eficacia de la terapia de CTLA4Ig en combinación con etanercept (Ejemplo 6) fue similar a la misma dosis de CTLA4Ig con metotrexato (Ejemplo 5).

EJEMPLO 7

Resultados de un año del estudio controlado con placebo de doble ciego, aleatorio multicentro de fase IIB para evaluar la seguridad y eficacia clínica de dos dosis diferentes de BMS-188667 administradas por vía intravenosa a sujetos con artritis reumatoide activa mientras reciben metotrexato

El siguiente Ejemplo proporciona los resultados de un año de un estudio clínico controlado con placebo de doble

50X511

ciego, aleatorio multicentro de fase IIB, para evaluar la seguridad y eficacia clínica de administrar dos dosis diferentes de CTLA4Ig en combinación con metotrexato para tratar pacientes con artritis reumatoide activa (RA). El estudio presentado en este ejemplo es una continuación del estudio de seis meses presentado en el Ejemplo 5.

Con base en los resultados de eficacia preliminares del Ejemplo 3, arriba, y la práctica estándar de agregar otras terapias al MTX en el tratamiento de RA, este estudio se diseñó para probar la hipótesis de que CTLA4Ig(BMS-188667) combinado con MTX puede tener una eficacia clínica mayor cuando se compara con MTX más placebo en sujetos RA quienes todavía tienen la enfermedad activa en vez de tratamiento MTX.

Los resultados presentados en este reporte de estudio clínico se basan en los datos de un análisis realizado después de que todos los sujetos completaron 6 meses de tratamiento y nuevamente después de que todos los sujetos completaron 12 meses de tratamiento.

A través de este Ejemplo, el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig más MTX puede referirse como el grupo 10 mg/kg, el grupo 2 mg/kg más MTX se refiere como el grupo 2mg/kg, y el grupo CTLA4Ig(BMS-188667) placebo más MTX se refiere como el grupo placebo.

512

Metodología del Estudio

Este estudio compara la eficacia clínica de dos diferentes dosis (10 y 2 mg/kg) de CTLA4Ig (BMS-188667) combinado con metotrexato (MTX) o con MTX más placebo en 5 sujetos con RA activo como se evalúa por ACR a intervalos de 6 meses y 12 meses. Este estudio enrola sujetos adultos con RA activo que tienen una respuesta inadecuada al MTX.

Los resultados después de un año de monitorear sujetos con artritis reumatoide activa a los cuales se les administra 10 intravenosamente: 1) CTLA4Ig a una dosis de 2 mg/kg de peso corporal con metotrexato, 2) CTLA4Ig a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal con metotrexato, o 3) placebo con metotrexato (de aquí en adelante conocido como placebo), se presentan aquí.

15 Los sujetos con RA activa, a pesar del tratamiento con MTX y que cumplen los criterios de inclusión/exclusión para este estudio se colocaron aleatoriamente 1:1:1 para recibir uno de los siguientes tratamiento en un respaldo de terapia MTX: CTLA4Ig (BMS-188667) 10 mg/kg, CTLA4Ig (BMS-188667) 2 20 mg/kg, o placebo. Los sujetos deberán tratarse con MTX (10 mg hasta 30 mg semanalmente) durante al menos 6 semanas, a una dosis estable por 28 días antes del Día 1.

Grupos de Tratamiento: Los sujetos se colocaron aleatoriamente 1:1:1 para uno de los tres grupos de 25 tratamiento:

513

1) Grupo 1: CTLA4Ig (BMS-188667) 10 mg/kg por infusión intravenosa

2) Grupo 2: CTLA4Ig (BMS-188667) 2 mg/kg por infusión intravenosa

5 3) Grupo3: CTLA4Ig (BMS-188667) placebo por infusión intravenosa.

Las dosis de infusión se basan en el peso corporal del paciente desde una visita previa al tratamiento inmediatamente antes de la visita del Día 1 (para un sujeto en monoterapia MTX, el peso se obtiene en la visita de selección; para un sujeto en terapia de combinación MTX [en combinación con otros DMARDs], el peso se obtiene de la visita de eliminación, Día 2). Las infusiones no se modifican durante el Día 1 hasta el Día 360.

15 Las infusiones se presentan aproximadamente al mismo tiempo del día a través del estudio. Todas las dosis del medicamento de estudio se administran en un volumen fijo de 75 mL a una relación constante durante aproximadamente 30 minutos. La bolsa y la línea intravenosa se mojan con 25 mL de dextrosa al 5% en solución acuosa (D5W) al final de cada infusión. Todas las infusiones intravenosas se administran con el sujeto en la posición de sentado. Los sujetos se observan para Eventos Adversos (Aes) y cambios en los signos vitales (presión sanguínea, ritmo cardíaco, temperatura corporal) desde el inicio de cada infusión (previo a la

20

25

510
514

dosis, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 minutos) y por un mínimo de 2 horas después de que inicio la infusión. El periodo de observación podrá extenderse, si se indica clínicamente.

Durante la fase primaria (Día 1 hasta Día 180) del estudio, se permite la administración concomitante de medicamentos seleccionados. Los medicamentos permitidos incluye:

MTX: Uso continuo de dosis actual (sin incrementos, y reducciones sólo por toxicidad)

10 Corticosteroides sistémicos (no tópicos): Con la condición de que la dosis sea estable y la dosis total sea menor a o igual al equivalente de prednisona 10 mg/día. Inyecciones intra-articulares se evitarán; sin embargo, si es necesario, se permiten hasta dos inyecciones intra-articulares.

15 NOTA: Una articulación que recibe una inyección intra-articular se cuenta como "activa" en TODOS los ensayos/evaluaciones posteriores.

NSAIDs, incluyendo ASA: con la condición de que la dosis sea estable

20 Acetaminofen, productos de combinación que incluyen acetaminofen y analgésicos narcóticos (esto es, acetaminofen con fosfato de codeína, acetaminofen con napsilato de propoxifeno, acetaminofen con 25 clorohidrato de oxicodona, acetaminofen con

5

· evaluaciones de estudio.

10 Programa de Procedimientos y Evaluaciones de Estudio

[illegible]

25

314 518

^a Se realizaron rayos X del pecho y ECG si no se realizan dentro de 6 meses o no se presentan.

^b Si el sujeto se trata con DMARD en la cima de la terapia de metotrexato y no reúne los criterios de entrada iniciales, los DMARD deberán lavarse por al menos 28 días antes del Día 1.

^c Esta visita se requiere sólo si el sujeto está en terapia MTX.

^d Prueba de embarazo de orina y suero realizada dentro de 48 horas antes de dosificar, para todas las mujeres de potencial embarazo. La prueba de embarazo de suero se procesa localmente.

^e Los sujetos que se descontinúan deberán tener una visita de "terminación temprana". Las evaluaciones en esta visita fueron idénticas a las evaluaciones realizadas el Día 360. Las evaluaciones para esta visita reemplazar las que pueden programarse en el día de la discontinuación. Los cambios en DMARD actual, esteroide, o terapia de NSAID no se permiten hasta después de que estas evaluaciones se realizaron. Los sujetos se contactan 30 días después de la discontinuación para capturar datos de seguridad (eventos adversos).

^f Cada esfuerzo deberá hacerse para asegurar que el mismo evaluador complete la evaluación para cada sujeto.

^g Deberá usarse el peso más reciente para calcular la dosis de fármaco del estudio. Todas las dosis administradas durante

~~516~~ 519

el estudio se basan en este peso.1

^a Para el Día 15, se permite una ventana de visita +/- 3 día.
Para visitas posteriores, se permite una ventana de visita
+/- 7 día.

5 ¹ Sólo examen físico completo.

³ Todas las evaluaciones deberán realizarse o administrarse
antes de la administración del fármaco del estudio, salvo que
se indique de otra manera.

^k Los resultados de todas las evaluaciones deberán revisarse
10 para requerimientos de elegibilidad antes de poner en
contacto con el Central Randomization System para colocar en
forma aleatoria.

¹ Ver Sección 2.1.4.3 del protocolo para racionalización de
mamografía. Si no se realiza dentro de 6 meses (la
15 documentación deberá presentarse) antes del consentimiento
firmado. Los sujetos que se descontinúan del estudio después
del Día 1 requieren un mamograma de seguimiento al cumplir un
año del mamograma que se realizó durante el periodo de
selección.

20 ^m El peso corporal del sujeto se proporciona al sistema de
colocación aleatoria central.

ⁿ No se requieren evaluaciones radiográficas en la visita
final para los sujetos que se descontinuaron dentro de los
primeros nueve meses de tratamiento.

25 ^o Los sujetos que terminaron tempranamente que tienen eventos

~~5/1/7~~ 520

adversos y medicamentos concomitantes se registran 30 y 60 días después de la última dosis para medicamento de estudio.

Evaluaciones de Eficacia

5 Mediciones y Respuestas Clínicas

La respuesta clínica se evalúa usando el Conjunto de Datos de Núcleo y Definiciones de Respuesta del Colegio Americano de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés). Para esta evaluación, los datos se colectan en siete
10 componentes: 1) cuenta de articulación sensible (68 cuentas de articulación estandarizadas); 2) cuenta de articulación hinchada (66 cuentas de articulación estandarizadas); 3) evaluación global de dolor del sujeto; 4) evaluación global de actividad de la enfermedad del sujeto; 5) evaluación
15 global de la actividad de la enfermedad del médico; 6) evaluación de la función física del sujeto (MHAQ); y 7) un valor de reactivo de fase aguda CRP.

La definición ACR 20, ACR 50, y ACR 70 de la respuesta corresponde a una mejora del 20%, 50%, o 70%,
20 respectivamente, sobre la línea base en articulación sensibles e hinchadas componentes 1 y 2) y una mejora del 20%, 50%, y 70%, respectivamente, en tres de las cinco mediciones del conjunto de datos de núcleo restantes (componentes 3 hasta 7). Una Respuesta Clínica Mayor se
25 define como el mantenimiento de una respuesta ACR 70 sobre un

~~18/10~~ 521

periodo de 6 meses continuo. Ver la Tabla 1 para los días en los datos para cada componente se colectan.

Los análisis de eficacia primarios se prueban para diferencias en la respuesta ACR 20 entre los dos grupos de tratamiento CTLA4Ig (BMS-188667) y el grupo placebo a los 6 meses (Día 180). Se emplea un procedimiento de prueba secuencial. Primero, se usa una prueba de cuadrado Chi para comparar los datos para el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig con los datos para el grupo placebo en el nivel de 0.05 de importancia. Si esto es importante, los datos para el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig se comparan con el grupo placebo al nivel 0.05. este procedimiento de prueba conserva el nivel alfa general a 5%. Se llevan a cabo análisis similares para las respuestas ACR 50 y ACR 70 a 6 meses. Las diferencias en respuestas ACR 20, ACR 50 y ACR 70 entre cada grupo de tratamiento CTLA4Ig (BMS-188667) y el grupo placebo se resumen usando los estimados de punto y los intervalos de confianza al 95%. Los sujetos que se les descontinúa del estudio debido a la carencia de eficacia (esto es, RA agravado) se consideran que no responden a ACR en todos los puntos de tiempo posteriores. Para todos los sujetos que se les descontinúa por otras razones, se lleva adelante su última respuesta ACR.

Las relaciones de respuesta ACR 20, ACR 50, y ACR 70 el día 360 se comparan entre cada grupo de tratamiento CTLA4Ig (BMS-188667) y el placebo al nivel de importancia ajustado

114/52

Dunnett 0.027 (dos extremidades).

La proporción de respondedores que alcanzan una respuesta ACR 20 en cada punto de tiempo también se agrupan durante el tiempo, y la prueba Cochran Mantel-Haenszel (W. G. Cochran, 1954, Some Methods of Strengthening the Common Chi-Square Test, Biometrics 10:417-451; N. Mantel and W. Haenszel, 1959, Biostatistical Aspects of the Analysis of Data from Retrospective Studies of Disease, J Nat Cancer Inst, 22: 719-748) se usa para comparar la frecuencia de los sujetos que alcanzan una respuesta ACR 20 en cada grupo CTLA4Ig (BMS-188667) contra el grupo placebo.

Las respuestas ACR 20, ACR 50, y ACR 70 los Días 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, y 360 también se presentan para los dos grupos CTLA4Ig (BMS-188667) y el grupo placebo. Las diferencias en las respuestas ACR entre los grupos CTLA4Ig (BMS-188667) y grupo placebo se resumen usando los intervalos de confianza al 95%. Los datos ACR que se agrupan durante el tiempo se usan para evaluar la acción de inicio y para determinar el tiempo de respuesta máximo.

Una Respuesta Clínica Mayor se define como el mantenimiento de una respuesta ACR 70 sobre un periodo de 6 meses continuo. En el análisis de 12 meses, la proporción de sujetos que alcanzan una Respuesta Clínica Mayor entre los tres grupos se resumen.

Con objeto de evaluar la integridad de los análisis

~~520~~ 523

planeados, todos los sujetos que reciben medicamento de estudio y descontinúan el estudio por cualquier razón, se consideran que no responden a ACR en todas las visitas de estudio programadas posteriores a la discontinuación.

5 El índice acumulativo, ACR-N, se evaluó en cada evaluación seguida, y el AUC se evaluó durante hasta 6 meses y hasta 12 meses. La regla trapezoidal se uso para computar el AUC. El ACR-N AUC se comparó entre los dos grupos de tratamiento CTLA4Ig (BMS-188667) y el grupo placebo usando un
10 análisis de variación (ANOVA) para datos de 6 y 12 meses. Esto permite la evaluación de la respuesta del sujeto a través del estudio. Estos análisis se llevan a cabo en los conjuntos de datos LOCF.

Las suposiciones de distribución con respecto a la
15 normalidad de los datos ACR-N AUC se revisaron usando la prueba Shapiro-Wilks en residuos estandarizados a partir del modelo ANOVA al nivel del 10% de importancia.

Los biomarcadores substitutos también se usan para evaluar la eficacia de los regímenes de tratamiento CTLA4Ig +
20 MTX o placebo + MTX. Los biomarcadores potenciales para inmunomodulación o inflamación en RA incluyen CRP, IL-2r soluble, RF, ICAM-1 soluble, E-selectina, IL-6 de suero, y TNF α . Estos parámetros se resumen por el grupo de tratamiento, usando frecuencias y cambio medio de la línea
25 base hasta el Día 180 y Día 360.

82/524

Un Evento Adverso (AE) se define como cualquier enfermedad nueva o empeorada, síntoma de señal o anormalidad de prueba de laboratorio clínicamente importante notada por el investigador durante el curso del estudio, sin considerar la casualidad. Un evento adverso serio (SAE) se define como un AE que cumple cualesquiera de los siguientes criterios: fue fatal; amenazó la vida; resulta en o prolonga la hospitalización; resulta en una discapacidad o incapacidad persistente o importante, fue cáncer, fue un defecto de nacimiento/anormalidad congénita, resulta en una sobredosis, resulta en el desarrollo de una dependencia al fármaco o abuso del fármaco, o fue un evento médico importante.

La medición de los signos vitales se obtiene al seleccionar y en cada visita de estudio durante y después de la administración del fármaco de estudio. Las mediciones de signos vitales (presión sanguínea en reposo, ritmo cardíaco, y temperatura corporal) se resumen por el grupo de tratamiento usando medias.

Los dos grupos de tratamiento CTLA4Ig (BMS-188667) (10 y 2 mg/kg) se comparan con el grupo placebo. El análisis primaria fue la comparación de una relación de respuesta ACR de 6 meses para grupos 10 mg/kg y placebo, seguido por la comparación de 2 mg/kg con placebo solamente si el anterior fue importante. Los tamaños de muestra se basan en un nivel del 5% (dos extremidades) de importancia. La relación de

522/525

respuesta ACR 20 para el grupo placebo a 6 meses se estima que es de alrededor del 25% (Weinblatt M, Kremer JM, Bankhurst AD et. al. A trial of etanercept, a recombinant TNF:Fc fusion protein in patients with RA receiving methotrexato. NEJM 1999; 340:253-259). Una muestra de 107 sujetos por grupo de tratamiento (ajustado para una relación de discontinuación del 15% posible) se determina para proporcionar una energía del 94% para detectar una diferencia del 25% en el nivel del 5% (dos extremidades). La Tabla 2 resume la energía necesaria para detectar las diferencias de tratamiento específicas en las respuestas ACR 20, ACR 50, y ACR 70 a 6 meses.

TABLA 2

15. Relaciones de Respuesta y Energía con 107* Sujetos por Grupo

Respuesta	Relación de Control (%)	Diferencia de Tratamiento	Energía (%)
ACR 20	25	25	94
ACR 50	5	20	95
ACR 70	1	14	90

* El tamaño de muestra se ajusta para una relación de discontinuación del 15% posible; el tamaño de la muestra actual fue 91.

~~527~~ 526

Si las comparaciones primarias del 10 mg/kg CTLA4Ig con placebo fueron importantes, entonces para la comparación para el 2 mg/kg CTLA4Ig con grupos placebo, la energía de la prueba sería de al menos 0.88, 0.90, y 0.81 para la
5 comparación que involucra respuestas ACR 20, ACR 50, y ACR 70 a 6 meses, respectivamente (Koch DD, Gansky SA. Statistical considerations for multiplicity in confirmatory protocols. Drug Info Journal 1996; 30: 523-534).

10

Análisis Estadísticos

Población de Estudio

Disposición de Sujetos

De los 524 sujetos que se enrolaron en este estudio, 339 sujetos se colocaron aleatoriamente: 115 al grupo 10 mg/kg;
15 105 al grupo 2 mg/kg; y 119 al grupo placebo (Figura 68). La razón más frecuente para no colocarse aleatoriamente fue la falla para cumplir los criterios de inclusión y/o exclusión.

Fase Primaria (Días 1-180)

20 Un total de 256 sujetos (75.5% de aquellos colocados aleatoriamente) completan la fase primaria del estudio; 83 sujetos se descontinúan durante este periodo (Tabla 3). En general, la descontinuación fue más de 2 veces mayor con placebo en comparación con el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig. La
25 descontinuación que se debe a la carencia de eficacia y la

527/527

descontinuación que se debe a un AE también fueron más de 2 veces mayor con placebo que con el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig.

TABLA 3

5 Razones para Descontinuación: Fase Primaria (Días 1-180)

10

15

	CTLA4Ig (BMS 188667)			
	10 mg/kg	2 mg/kg	Placebo	Total
No. Tratado, n	115	105	119	339
No. Descontinuación, n(%)	17 (14.8)	25 (23.8)	41 (34.5)	83 (24.5)
Evento Adverso	3 (2.6)	7 (6.7)	9 (7.6)	19 (5.16)
Carencia de Eficacia	12 (10.4)	16 (15.2)	28 (23.5)	56 (16.5)
Retiro del Consenso	2 (1.7)	2 (1.9)	4 (3.4)	8 (2.4)
Completado 180 Días de Terapia, n(%)	98 (85.2)	80 (76.2)	78 (65.5)	256 (75.5)

Descontinuaciones Acumuladas (Días 1-360)

Un total de 235 sujetos (69.3% de aquellos colocados aleatoriamente) completan ambas fases del estudio; 104 sujetos se descontinúan el Día 360 (Tabla 4). Se nota el mismo patrón general en las descontinuaciones en la fase primaria (una incidencia 2 veces mayor con placebo en comparación con el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig) también se observa en general (Días 1-360). Esto incluye la relación de descontinuación general, las descontinuaciones se deben

526/528

a la carencia de,eficacia y las discontinuaciones se deben a un AE.

TABLA 4

5 Razones para Descontinuación: Ambas Fases (Días 1-360)

10

15

	CTLA4Ig (EMS 188667)			
	10 mg/kg	2 mg/kg	Placebo	Total
No. Tratado, n	115	105	109	339
No. Descontinuación, n(%)	25 (21.7)	31 (29.5)	48 (40.3)	104 (30.7)
Evento Adverso	5 (4.3) ^b	9 (8.6)	11 (9.2)	25 (7.4)
Muerte	0	1 (1.0)	0	1 (0.3)
Pérdida a Seguir	1 (0.9)	2 (1.9)	0	3 (0.9)
Otro ^a	1 (0.9)	0	1 (0.8)	2 (0.6)
Carencia de Eficacia	13 (11.3)	17 (16.2)	30 (25.2)	60 (17.7)
Retiro del Consenso	5 (4.3)	2 (1.9)	6 (5.0)	13 (3.8)
Completado 360 Días de Terapia, n(%)	90 (78.3)	74 (70.5)	71 (59.7)	235 (69.3)

20 ^a Otras razones para la discontinuación se refieren a complicación

^b El sujeto IM101100-32-5 en el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig reportó un AE que se registró resultando en la discontinuación del estudio; sin embargo, este sujeto no se incluye en esta tabla.

25 Un lote Kaplan-Meier de la proporción acumulada de

~~12/529~~

sujetos que se descontinúan por cualquier razón durante los primeros 12 meses, se presenta en la Figura 69; la proporción acumulada de los sujetos que se descontinúan debido a la carencia de eficacia se presenta en la Figura 70. Notar que en ambas gráficas después de aproximadamente 30 días de terapia, las relaciones de descontinuación con placebo fueron consistentemente mayores en comparación con ambos grupos CTLA4Ig (BMS-188667). Adicionalmente, después de aproximadamente 150 días de terapia, las relaciones de descontinuación para el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig fueron mayores que aquellas para 10 mg/kg.

Características Demográficas y del Sujeto

En general, las características demográficas de línea base y las características de RA clínicas de línea base son generalmente comparables a través de los tres grupos de tratamiento, y típicamente son de RA relativamente avanzado encontrados en la práctica clínica (Tabla 5 y Tabla 6). La mayoría de los sujetos fueron mujeres blancas de aproximadamente 55 años de edad con una duración media de RA de aproximadamente 9 hasta 10 años, un número relativamente grande de articulaciones activas (aproximadamente 29 articulaciones sensibles y 21 hinchadas) y registros análogos visuales (VAS) de aproximadamente 59-65 mm (escala 100 mm).

530

TABLA 5
Características Demográficas de Línea Base

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg	2 mg/kg	Placebo
No. de Colocados Aleatoriamente	115	105	119
Edad (años)			
Media $\pm$ SD	55.8 $\pm$ 12.5	54.4 $\pm$ 11.3	54.7 $\pm$ 12.0
(rango)	(17, 83)	(23, 80)	(23, 80)
Peso (kg)			
Media $\pm$ SD	77.8 $\pm$ 18.6	78.7 $\pm$ 21.4	79.9 $\pm$ 17.6
(rango)	(40.1, 144.0)	(48.4, 186.8)	(44.0, 140.0)
Género			
Hombres, n (%)	29 (25)	39 (37)	40 (34)
Mujeres, n (%)	86 (75)	66 (63)	79 (66)
Raza			
Blanca, n (%)	100 (87)	91 (87)	104 (87)
Negra, n (%)	6 (5)	0	3 (3)
Otra, n (%)	9 (8)	14 (13)	12 (10)
Duración de RA (años)			
Media $\pm$ SD	n=114*	n=105	n=117*
(rango)	9.7 $\pm$ 9.8 (0, 38)	9.7 $\pm$ 8.1 (0, 36)	8.9 $\pm$ 8.3 (0, 41)

La duración del RA no se reporta para 3 sujetos.

531

No obstante que no es un componente de los criterios de ACR, la duración del entumecimiento matutino también se evaluó y fue cercana a las 2 horas en cada uno de los tres grupos. También se evalúan los resultados positivos para RF en la línea base, y los grupos de tratamiento CTLA4Ig (BMS-188667) tienen porcentajes más altos de los sujetos que probaron positivo para RF (86% para ambos grupos 10 mg/kg y 2 mg/kg CTLA4Ig en comparación al 76% para el grupo placebo).

10

TABLA 6

Características de Artritis Reumatoide Clínica de Línea Base

15

20

25

Características	CTLA4Ig (BMS-188667)		Placebo (n=119)
	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	
Articulaciones sensibles, n	115	105	119
Media ± SD	30.8±12.2	28.2±12.0	29.2±13.0
Rango	11.0, 66.0	3.0, 62.0	4.0, 68.0
Articulaciones Hinchadas, n	115	105	119
Media ± SD	21.3±8.4	20.2±8.9	21.8±8.8
Rango	9.0, 54.0	4.0, 48.0	8.0, 64.0
Dolor (VAS 100 mm), n	113	104	119
Media ± SD	62.1±21.4	64.3±22.3	65.2±22.1
Rango	0.0, 99.0	8.0, 100.0	3.0, 95.0

~~532~~ 532

		CTLA4Ig (BMS-188667)		
5	Función Física (MHAQ 0-3), n	115	105	119
	Media $\pm$ SD	1.0 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.6
	Rango	0.0, 2.5	0.0, 2.5	0.0, 2.3
10	Evaluación Global del Sujeto (VAS 100 mm), n	113	105	119
	Media $\pm$ SD	60.1 $\pm$ 20.7	59.4 $\pm$ 23.4	62.8 $\pm$ 21.6
	Rango	10.0, 100.0	8.0, 99.0	4.0, 94.0
15	Evaluación Global MD (VAS 100 mm), n	113	105	119
	Media $\pm$ SD	62.1 $\pm$ 14.8	61.0 $\pm$ 16.7	63.3 $\pm$ 15.5
	Rango	20.0, 98.0	8.0, 95.0	18.0, 93.0
20	CRP (mg/dL), n	112	99	115
	Media $\pm$ SD	2.9 $\pm$ 2.8	3.2 $\pm$ 2.5	3.2 $\pm$ 3.2
	Rango	0.2, 19.9	0.2, 10.8	0.2, 20.9
25	Entumecimiento Matutino (en minutos), n	115	103	119
	Media $\pm$ SD	97.9 $\pm$ 63.1	104.1 $\pm$ 63.9	106.0 $\pm$ 64.2
	Rango	0.0, 180.0	0.0, 180.0	0.0, 180.0
25	Factor Reumatoide (IU/mL), n	99	90	90
	% Positivo	86%	86%	76%

Las características demográficas y RA de línea base de la población general de sujetos que tienen al menos una dosis de fármaco de estudio y que se descontinúan debido a la carencia de eficacia, generalmente son comparables con la población del estudio completa, sin embargo, una proporción mayor de sujetos en esta subpoblación se ha diagnosticado con RA por >10 años (45% en comparación con la población de estudio general (34%).

10

Hallazgos Históricos Médicos y Medicamentos Previos

Los hallazgos históricos médicos para sujetos en este estudios son consistentes con el RA relativamente avanzado y fueron generalmente similares entre los grupos de tratamiento. Los hallazgos más frecuentemente presentados (en >40% de los sujetos) fueron hallazgos músculoesqueléticos (sin incluir síntomas RA; 59.3%), hallazgos gastrointestinales (45.1%), y hallazgos genitourinario (42.2%). Otros hallazgos históricos médicos importantes incluyen enfermedad cardiovascular en aproximadamente 39% de los sujetos en todos los grupos de tratamiento y hallazgos endocrinos/metabólicos en aproximadamente 29% de todos los sujetos.

25

El uso general de MTX, corticosteroides sistémicos

2534

(no tópicos), DMARDs y medicamentos RA biológicos antes de entrar al estudio son generalmente comparables a través de los tres grupos de tratamiento (Tabla 7). Todos los sujetos que han recibido tratamiento previo con medicamentos reumáticos, incluyendo MTX, son elegibles para el estudio. Un tratamiento previo con MTX no se registró para 4 sujetos. El uso de corticosteroides sistémicos (no tópicos) antes de la colocación aleatoria fue comparable entre los tres grupos de tratamiento, con ligeramente más sujetos en los grupos 2 mg/kg CTLA4Ig y placebo tomando corticosteroides sistémicos (~67-68%) en comparación con sujetos en el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig (60.0%). El uso de otros DMARDs y medicamento RA biológicos antes de entrar al estudio varía desde 0 hasta 12% a través de los grupos de tratamiento sin predominancia general en ningún grupo de tratamiento. La dosis media de MTX y de corticosteroides sistémicos (no tópicos) el Día 1 fueron comparables entre los tres grupos de tratamiento (~15-16 mg/sem, ~6-7 mgs/día), respectivamente.

TABLA 7

Resumen de Medicamentos Reumáticos Antes del Enrolamiento

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Antes de Medicamento Reumático, n (%) ^a			
No. de Sujetos con Medicamentos Previos	114 (99.1)	103 (98.1)	118 (99.2)
Metotrexato ^b	114 (99.1)	103 (98.1)	118 (99.2)
Corticosteroides Sistémicos (no tópicos)	69 (60.0)	71 (67.6)	80 (67.2)
Otros DMARDs	19 (16.5)	19 (18.1)	25 (21.0)
Sulfasalazina	9 (7.8)	2 (1.9)	10 (8.4)
Hidroxicloroquina	8 (7.0)	6 (5.7)	14 (11.8)
Ciclosporina	2 (1.7)	4 (3.8)	4 (3.4)
Infliximab	2 (1.7)	2 (1.9)	2 (1.7)
Etanercept	1 (0.9)	4 (3.8)	1 (0.8)
Cloroquina	1 (0.9)	0	0
Leflunomida	0	2 (1.9)	2 (1.7)

^a Las categorías de medicamentos reumáticos previos no son mutuamente exclusivas

^b La administración de MTX no se registró para 4 sujetos.

53/536

Terapia de Estudio

De los tres grupos de tratamiento, el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig tiene la duración media más larga de exposición para ambas fases de estudio y el grupo placebo tiene la duración media más corta de exposición para ambas fases de estudio (Día 180: 163 días, 156 días, 140 días; Día 360: 286 días, 268 días, y 234 días; 10 mg/kg, 2 mg/kg, y placebo, respectivamente).

El Día 180 (final de la fase primaria), la proporción de sujetos que reciben infusiones fue más alta en el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig (85%) en comparación con el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig (79%) y el grupo placebo (66%) (Tabla 8). El Día 330 (día de la última infusión programada en la fase secundaria), la proporción de sujetos que reciben infusiones también fue mayor en el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig (78%) en comparación con el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig (70%) y el grupo placebo (59%).

TABLA 8**Sujetos Que Reciben Infusiones en los Días de Estudio Dados**

	Número (%) de Sujetos		
	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Día	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
1	115 (100)	105 (100)	119 (100)
15	114 (99)	104 (99)	117 (98)
30	113 (98)	101 (96)	111 (93)

57/537

	Número (%) de Sujetos		
	CTLA4Ig (BMS-188667)		
60	108 (94)	97 (92)	103 (87)
90	106 (92)	94 (90)	94 (79)
120	100 (87)	86 (82)	83 (70)
150	98 (85)	83 (79)	81 (68)
180	98 (85)	83 (79)	78 (66)
210	94 (82)	80 (86)	78 (66)
240	95 (83)	78 (74)	76 (64)
270	93 (81)	77 (73)	73 (61)
300	90 (78)	74 (70)	72 (61)
330	90 (78)	73 (70)	70 (59)

15 Metotrexato

Los sujetos se trataron con una dosis "estable" de MTX (10-30 mg semanalmente) durante al menos 6 meses, durante 28 días antes del Día 1. Con excepción de 4 sujetos, todos los sujetos reciben entre 10 y 30 mg de MTX semanalmente además de CTLA4Ig (BMS-188667) durante la fase primaria (Día 1-180). Durante la fase secundaria (Día 181-360), la dosis de MTX se ajustaría con la condición de que se mantenga entre 10 y 30 mg semanalmente.

538

Medición de Acatamiento del Tratamiento

Durante la fase primaria, el número de infusiones perdidas del fármaco de estudio fue ≤ 2 en cualquier punto de tiempo (Tabla 9). Durante la fase secundaria, los sujetos en el grupo placebo parecen tener algunas infusiones ligeramente perdidas más que los sujetos en los grupos CTLA4Ig (BMS-188667). Sin embargo, más sujetos en el placebo que en el CTLA4Ig (BMS-188667) se descontinúan por estos últimos puntos de tiempo (ver supra).

10

TABLA 9

Número de Infusiones Perdidas del Fármaco de Estudio

15

20

25

	CTLA4Ig (BMS-188667)		Placebo (n=119)
	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	
Día 1	0	0	0
Día 15	1	1	0
Día 30	0	1	1
Día 60	0	0	0
Día 90	0	0	0
Día 120	0	1	2
Día 150	1	2	0
Día 180	1	0	1
Día 210	4	0	0
Día 240	1	2	1
Día 270	0	2	0
Día 300	1	1	0
Día 330	0	0	0

327/539

Terapia Concomitante

Los corticosteroides sistémicos (no tópicos) usados generalmente son comparables entre los tres grupos durante la selección/enrolamiento (58-67%) y durante la fase primaria del estudio (67-71%), Tablas 10 y 11, respectivamente. Aunque el corticosteroide usado se reduce en los tres grupos de tratamiento por el Día 360, más sujetos en el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig toman corticosteroides sistémicos (no tópicos) (63.5%) en comparación con los otros dos grupos de tratamiento (53.3% y 45.4% para los grupos 2 mg/kg CTLA4Ig y placebo, respectivamente). Varios sujetos (CTLA4Ig: 0-3%, placebo: 0-10%) reciben DMARDs diferentes al MTX durante la selección/enrolamiento.

15

TABLA 10

Resumen de Medicamentos Concomitantes Reumáticos Durante la Selección/Enrolamiento

20

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Medicamento Reumático, n (%) ^a	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
No. de Sujetos con Medicamentos Previos	114 (99.1)	103 (98.1)	118 (99.2)
Metotrexato	114 (99.1)	103 (98.1)	118 (99.2)

548 540

5

10

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Medicamento Reumático, n (%) ^a	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Corticosteroides Sistémicos (no tópicos)	67 (58.3)	70 (66.7)	75 (63.0)
Otros DMARDs	5 (4.3)	6 (5.7)	14 (11.8)
Sulfasalazina	3 (2.6)	1 (1.0)	4 (3.4)
Hidroxicloroquina	2 (1.7)	3 (2.9)	12 (10.1)
Ciclosporina	1 (0.9)	1 (1.0)	2 (1.7)
Etanercept	0	1 (1.0)	0

^a Las categorías del fármaco no son exclusivas mutuamente

TABLA 11

15 **Sujetos Que Reciben Medicamentos Concomitantes Clínicamente Relevantes Durante Ambas Fases del Estudio**

20

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Medicamento ^a	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Corticosteroides sistémicos (no tópicos) (Fase Primaria)	77 (67.0)	71 (67.6)	85 (71.4)
Corticosteroides sistémicos (no tópicos) (Fase Secundaria)	73 (63.5)	56 (53.3)	54 (45.4)

25 ^a Las categorías del fármaco no son exclusivas mutuamente

541

Nota: El sujeto. IM101100-83-3 (10 mg/kg CTLA4Ig) toma mefloquina y el sujeto IM101100-28-7 (placebo) toma quinina entre los Días 1 y 180; el sujeto IM101100-18-11 (10 mg/kg CTLA4Ig) toma quinina entre los Días 181 y 360 como un medicamento antimalaria, y no se considera una violación importante al protocolo.

Resultados de Eficacia

El grupo CTLA4Ig (BMS-188667) 10 mg/kg tiene una eficacia superior en comparación con el grupo placebo en el Día 180 y Día 360. Para el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig, los resultados para algunos parámetros de eficacia fueron significativamente mejores en comparación con el grupo placebo, lo que resulta que la mayoría de los otros parámetros de eficacia sean numéricamente mayores en comparación con placebo.

Respuestas ACR el Día 180

Los análisis de variable de eficacia primaria para este estudio, relación de respuesta ACR20 el Día 180, muestra que el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig es significativamente más efectivo ($p < 0.001$) que el placebo (Tabla 12, Figura 71A y Figura 71B).

Las respuestas ACR50 y ACR70 el Día 180 para el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig también fueron significativamente mayores en comparación con el grupo placebo (Tabla 12, Figura 71A y

440
542

Figura 71B). Las respuestas ACR50 y ACR70 el Día 180 para el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig fueron significativamente mayores en comparación con el grupo placebo. La respuesta ACR20 el Día 180 para el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig fue ligeramente mayor en comparación con el grupo placebo; sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente importantes.

TABLA 12

Respuestas ACR el Día 180

10		CTLA4Ig (BMS-188667)		
		10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
	ACR 20			
	n (%)	70 (60.9)	44 (41.9)	42 (35.3)
15	CI	25.6 (12.8, 38.4)	6.6 (-6.2, 19.4)	N/A
	Valor p	<0.001 ^a	0.31	N/A
	ACR 50			
	n (%)	42 (36.5)	24 (22.9)	14 (11.8)
20	CI	24.8 (13.8, 35.7)	11.1 (1.2, 20.9)	N/A
	Valor p	<0.001 ^a	0.027 ^a	N/A
	ACR 70			
	n (%)	19 (16.5)	11 (10.5)	2 (1.7)
	CI	14.8 (7.5, 22.2)	8.8 (2.7, 14.9)	N/A
25	Valor p	<0.001 ^a	0.005 ^a	N/A

54/543

^a Diferencia estadísticamente importante para la comparación de BMS-188667 vs placebo.

Respuestas ACR el Día 360

5 El Día 360, las respuestas ACR20, ACR50 y ACR70 por el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig fueron significativamente mayores (p<0.001) en comparación con el grupo placebo (Tabla 13, Figura 72A y Figura 72B). No obstante que las mismas relaciones de respuestas para el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig son
10 numéricamente mayores en comparación con el grupo placebo, estas diferencias no son estadísticamente importantes.

TABLA 13

Respuestas ACR el Día 360

15

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
ACR 20			
N (%)	72 (62.6)	43 (41.0)	43 (36.1)
20 CI	26.5 (13.7, 39.3)	4.8 (-7.9, 17.6)	N/A
Valor p	<0.001 ^a	0.459	N/A

542
544

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
ACR 50			
N (%)	18 (41.7)	23 (21.9)	24 (20.2)
CI	21.6 (9.7, 33.4)	1.7 (-8.9, 12.4)	N/A
Valor p	<0.001 ^a	0.75	N/A
ACR 70			
N (%)	24 (20.9)	13 (12.4)	9 (7.6)
CI	13.3 (4.4, 22.2)	4.8 (-3.0, 12.6)	N/A
Valor p	0.003 ^a	0.227	N/A

^a Diferencia estadísticamente importante para la comparación del grupo 10/mg/kg CTLA4Ig vs placebo.

Respuestas ACR por Visita

Para la comparación del grupo 10 mg/kg CTLA4Ig al grupo placebo, se observan mejoras estadísticamente importante para las tres relaciones de respuesta (ACR 20, ACR 50, y ACR 70) por el Día 90, y estos valores se mantienen estadísticamente importantes en cada punto de tiempo e incluyen el Día 360 ($p \leq 0.008$ para las tres relaciones de respuesta ACR) (Figura 73A, Figura 73B, y Figura 73C). De hecho, las mejoras

~~545~~

estadísticamente importantes en respuestas ACR 50 y ACR 70 para el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig se presentan tan temprano como el Día 30 ($p=0.039$ y $p=0.04$, respectivamente).

Para el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig, se observan mejoras estadísticamente importantes en comparación con el placebo en respuestas ACR 50 y ACR 70 el Día 180 ($p=0.027$ y $p=0.005$, respectivamente). El Día 360, las mejoras en respuesta ACR fueron ligeramente mayores en el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig en comparación con el grupo placebo; sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente importantes.

Después de ajustar para la visita usando la prueba Cochran-Mantel Haenszel, se observa una diferencia importante en la respuesta ACR 20 para el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig en comparación con el grupo placebo tanto en el Día 180 como el Día 360. No se observa diferencia importante entre los grupos 2 mg/kg CTLA4Ig y placebo en ambos puntos de tiempo. Se obtienen resultados similares para respuesta ACR 50 en ambos puntos de tiempo. Para la respuesta ACR 70 en ambos puntos de tiempo, se observa una diferencia importante para ambos grupos de tratamiento CTLA4Ig (BMS-188667) en comparación con el grupo placebo.

Resumen de Respuesta Clínica Mayor

La Respuesta Clínica Mayor se define como el mantenimiento de una respuesta ACR 70 durante un periodo

546

continuo de 6 meses. Los porcentajes de sujetos que alcanzan una Respuesta Clínica Mayor el Día 360 fueron significativamente mayores en ambos de los grupos 10 mg/kg y 2 mg/kg CTLA4Ig (7.8% y 5.7%, respectivamente) cuando se comparan con el grupo placebo (0.8%; p=0.008 y 0.036, respectivamente) (Tabla 14).

TABLA 14
Resumen de Respuesta Clínica Mayor el Día 360

10		CTLA4Ig (BMS-188667)		
		10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
	No. de Sujetos con una Respuesta Mayor	9 (7.8)	6 (5.7)	1 (0.8)
15	Dif (CI)	7.0 (1.8, 12.2)	4.9 (0.3, 9.4)	N/A
	Valor p	0.008 ^a	0.036 ^a	N/A

^a Indica una diferencia estadísticamente importante para la comparación de BMS-188667 vs placebo.

ACR Numérico Medio (ACR-N) y ACR-N de Area bajo la Curva
(ACR-N- AUC)

En general, el ACR numérico medio (ACR-N) para todos los grupos de tratamiento se incrementan durante el tiempo durante

~~547~~ 547

los primeros 6 meses del estudio (Figura 74). Durante los segundos 6 meses, el ACR-N medio incrementa ligeramente con 10 mg/kg CTLA4Ig, pero se mantiene relativamente sin cambio con 2 mg/kg CTLA4Ig y placebo. En cada visita de estudio, el ACR-N fue consistentemente mayor para el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig en comparación con los grupos 2 mg/kg CTLA4Ig y placebo.

En comparación con el grupo placebo, las diferencias en los valores para ACR-N AUC (área bajo la curva) para el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig fue significativamente ($p < 0.001$) mayor por el Día 360.

Mejora en Porcentaje de la Línea Base el Día 180

Para el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig, las mejoras en cada componente ACR individual (cuentas de articulaciones sensibles e hinchadas, CRP, dolor, evaluación global del sujeto, evaluación global del médico, y función física) el Día 180 fueron estadísticamente importantes con relación a las mejoras para el grupo placebo (Tabla 15).

Para el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig, las mejoras estadísticamente importantes en comparación con el grupo placebo se observan en la evaluación global del médico y CRP el Día 180. Adicionalmente, los niveles CRP en el grupo placebo se empeoran actualmente el Día 180. El cambio desde la línea base en la duración media de entumecimiento matutino fue comparable entre los tres grupos de tratamiento el Día 180.

38/548

TABLA 15

Porcentaje Medio de Mejora desde la Línea Base el Día 180
(Componentes Individuales de Criterios ACR)

		CTLA4Ig (BMS-188667)		
5	Componente	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
	Articulaciones sensibles	n=114	n=104	n=118
	% de Cambio Medio	59.78*	43.15	31.88
	Articulaciones Hinchadas	n=114	n=104	n=118
10	% de Cambio Medio	55.28*	45.34*	33.49
	CRP	n=108	n=98	n=114
	% de Cambio Medio	31.79*	16.41*	-23.43
	Dolor	n=109	n=102	n=118
	% de Cambio Medio	46.19*	22.09*	8.20
15	Evaluación Global del Sujeto	n=111	n=103	n=118
	% de Cambio Medio	40.76*	9.07	17.48
	Evaluación Global MD	n=111	n=103	n=116
	% de Cambio Medio	51.91*	38.71*	25.14
	Función Física	n=107	n=98	n=110
20	% de Cambio Medio	41.21*	21.63	13.71
	Duración del Entumecimiento Matutino	n=98	n=82	n=80
	Medio ± SD (Minutos)	61.9±55.4	60.8±66.1	55.9±66.2

31/0549

*Indica $p < 0.05$ en comparación con placebo ya que el 95% CI no incluye cero.

Mejora en Porcentaje desde la Línea Base el Día 360

5 Para el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig, las mejoras en cada
componente ACR individual (cuentas de articulaciones
sensibles e hinchadas, CRP, dolor, evaluación global del
sujeto, evaluación global del médico, y función física) el
Día 360 fueron estadísticamente importantes con relación a
10 las mejoras para el grupo placebo. Las mejoras en porcentaje
medias desde la línea base hasta día 360 se presentan en la
Tabla 16 para todos los parámetros clínicos de los criterios
ACR.

15 Para el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig, las mejoras
estadísticamente importantes en comparación con el grupo
placebo se observan en evaluación global del médico y CRP el
Día 360. Adicionalmente, los niveles CRP en el grupo placebo
se empeoran actualmente el Día 360. El Día 360, los grupos de
tratamiento CTLA4Ig (BMS-188667) tienen cambios mayores desde
20 la línea base en la duración del entumecimiento matutino en
comparación con el grupo placebo.

TABLA 16

Porcentaje Medio de Mejora desde la Línea Base el Día 360

(Componentes Individuales de Criterios ACR)

5	Componente	CTLA4Ig (BMS-188667)		Placebo (n=119)
		10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	
	Articulaciones sensibles	n=115	n=105	n=119
	% de Cambio Medio	66.39*	43.54*	29.97
	Articulaciones Hinchadas	n=115	n=105	n=119
10	% de Cambio Medio	59.74*	46.40	36.17
	CRP	n=112	n=98	n=115
	% de Cambio Medio	27.59*	10.31*	-31.26
	Dolor	n=112	n=104	n=119
	% de Cambio Medio	44.93*	26.26	12.55
15	Evaluación Global del Sujeto	n=113	n=105	n=119
	% de Cambio Medio	41.01*	16.08	1.99
	Evaluación Global MD	n=113	n=105	n=119
	% de Cambio Medio	53.48*	37.87*	24.14
	Función Física	n=109	n=100	n=111
20	% de Cambio Medio	42.32*	22.94	10.25
	Duración del Entumecimiento Matutino	n=88	n=71	n=72
	Medio $\pm$ SD (Minutos)	66.2 $\pm$ 59.5*	66.6 $\pm$ 72.2	49.7 $\pm$ 73.9

~~551~~

*Indica $p < 0.05$ en comparación con placebo ya que el 95% CI no incluye cero.

Articulaciones Activas Nuevas

5 La proporción de articulaciones activas nuevas se determina usando la cuenta de 28 articulaciones validada (de 68 articulaciones sensibles totales y de 66 total articulaciones hinchadas totales) propuesta por Smollen et al (Smollen JS, Breedveld FC, Eberl G, Jones I et al. Validity and reliability of the twenty-eight-joint count for the assessment of RA activity. Arthritis & Rheum 1993; 38:38-43). La proporción de articulaciones activas nuevas (tanto sensibles como hinchadas) el Día 180 fue menor para sujetos que reciben 10 mg/kg CTLA4Ig (Figura 75).

15 El Día 180, los porcentajes de sujetos que no reportan articulaciones sensibles nuevas y no articulaciones hinchadas nuevas fue más alto en el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig (Figura 76A, Figura 77A). El porcentaje de sujetos que no reportan articulaciones sensibles nuevas y no articulaciones hinchadas nuevas fue de aproximadamente 59% y 52%, respectivamente, en el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig; 38% y 44%, respectivamente, en el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig; y 41% y 37%, respectivamente, en el grupo placebo.

25 La proporción de articulaciones activas nuevas (tanto sensibles como hinchadas) el Día 360 fue menor para sujetos

552

que reciben 10 mg/kg CTLA4Ig (Figura 78). Este patrón para la proporción de articulaciones activas nuevas refleja el patrón apreciado el Día 180.

5 Similarmente, el Día 360, la proporción de sujetos que no reportan articulaciones sensibles nuevas y no articulaciones hinchadas nuevas fue más alto en el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig (Figura 76B, y Figura 77B). El porcentaje de sujetos que no reportan articulaciones hinchadas nuevas y sensibles nuevas fue de aproximadamente 71% y 61%,
10 respectivamente, en el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig; 41% y 44%, respectivamente, en el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig; y 42% para ambas cuentas en el grupo placebo.

15 **Mejora en los Parámetros Clínicos Entre Sujetos con una Respuesta ACR**

Entre los que responden a ACR 20, ACR 50, y ACR 70, la mejora en los componentes de núcleo de los criterios ACR fueron ligeramente mayores para los dos grupos de tratamiento CTLA4Ig (BMS- 188667) en comparación con placebo.

20 El inicio de acción para sujetos que reciben la dosis 10 mg/kg CTLA4Ig se presenta después de aproximadamente 15 días, con incrementos importantes en mejora ACR 20 que se presenta en $\geq$ Día 60 para ACR50 en $\geq$ Día 90 para ACR70 en $\geq$ Día 30 y en cada caso, continúa hasta día 360 (ver Figura 73A, Figura 73B
25 y Figura 73C).

252
553

**Cambios desde la Línea Base para los Resultados de Salud de
Cuestionario de Forma Corta (SF-36)**

El impacto de CTLA4Ig (BMS-188667) en la calidad de vida relacionada con la salud se evaluó usando el Cuestionario de Forma Corta de Resultados de Salud SF-36 (registros resumidos en el rango desde 0 hasta 100 con registros mayores que indican una mejor calidad de vida). Los análisis se realizaron en el conjunto de datos LOCF (última observación adelantada) así como el conjunto de datos observados.

10 Para el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig, las mejoras estadísticamente importantes desde la línea base en comparación con el grupo placebo se observan en los cuatro dominios de salud mental y cuatro dominios de salud física del SF-36 el Día 180, usando el análisis LOCF (esto es, 95% CIs no incluyen 0) (Figuras 79A, 79B). Para el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig, fueron mejoras numéricas en los dominios de salud mental o salud física en comparación con placebo el Día 180, sin embargo, estas mejoras no son estadísticamente importantes.

20 Los resultados de los análisis realizados en el conjunto de datos como se observa fueron similares a aquellos observados para el conjunto de datos LOCF, excepto que el dominio de "papel emocional" el Día 180 no se mejora significativamente (pero se mejora numéricamente) para la

554

comparación entre los grupos 10 mg/kg CTLA4Ig y placebo grupos usando el conjunto de datos como se observa.

El componente físico y el componente de salud mental medidos en resumen el Día 180 se muestran en la Tabla 17.

5

TABLA 17

Cambio Medio desde la Línea Base hasta el Día 180 para el SF-36 (Componentes de Salud Física y Mental)

10

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Registro Resumido			
Componente de Salud Mental	n=115	n=103	n=118
Línea Base Media	44.52	43.06	41.75
Línea base Posterior Media	48.69	45.59	44.04
15 Cambio Medio desde la Línea Base	4.17	2.53	2.30
95% CI	(2.46, 5.88)	(0.39, 4.67)	(0.42, 4.17)
Componente Físico	n=115	n=103	n=118
Línea Base Media	31.13	30.80	32.33
20 Línea base Posterior Media	39.30	35.47	35.21
Cambio Medio desde la Línea Base	8.16	4.67	2.88
95% CI	(6.33, 9.99)	(3.25, 6.09)	(1.54, 4.22)

20

25

~~SSS~~

Los resultados de los Resultados de Salud el Día 360 fueron similares a aquellos apreciados el Día 180. Para el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig, las mejoras estadísticamente importantes desde la línea base en comparación con el grupo placebo se observaron en todos los cuatro dominios mentales y los cuatro físicos del SF-36 el Día 360, usando el análisis LOCF (esto es, 95% CIs no incluye 0) (Figuras 80A, y 80B). Para el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig, se observa una diferencia estadísticamente importante en tres de los cuatro dominios físicos el Día 360 y uno de los cuatro dominios mentales el Día 360 en comparación con el grupo placebo.

Los resultados de los análisis realizados en el conjunto de datos como se observa fueron similares a aquellos observados por el conjunto de datos LOCF.

El componente de salud físico y mental resumido medido el Día 360 se muestra en la Tabla 18.

20

25

556

TABLA 18

Cambio Medio desde la Línea Base hasta el Día 360 para el
SF-36 (Resumen del Componente de Saludo Físico y el
Componente de Salud Mental) -

5		CTLA4Ig (BMS-188667)		
		10 mg/kg	2 m/kg	Placebo
	Registro Resumido	(n=115)	(n=105)	(n=119)
	Componente de Salud Mental	n=115	n=103	n=118
	Línea Base Media	44.52	43.06	44.75
10	Línea base Posterior Media	48.83	45.65	43.22
	Cambio Medio desde la Línea Base	4.31	2.59	1.47
	95% CI	(2.64, 5.98)	(0.64, 4.55)	(-0.14, 3.08)
	Componente Físico	n=115	n=103	n=118
15	Línea Base Media	31.13	30.80	32.33
	Línea base Posterior Media	38.93	36.49	34.93
	Cambio Medio desde la Línea Base	7.79	5.69	2.60
	95% CI	(5.90, 9.68)	(4.10, 7.28)	(1.09, 4.11)
20				

Biomarcador y Datos Farmacodinámicos

Hay mejoras importantes (reducciones) en 5 de los 6
parámetros biomarcador/farmacodinámico (PD) con 10 mg/kg
25 CTLA4Ig el Día 180 (IL-2r soluble, factor reumatoide

557

(RF), ICAM-1, E-selectina e IL-6) y una reducción numérica en TNF- α (Tabla 19). Hay mejoras importantes (reducciones) en 3 de los 6 parámetros biomarcador/PD con 2 mg/kg CTLA4Ig el Día 180 (IL-2r soluble, RF e IL-6) y una mejora numérica en ICAM-1. No hay cambios importantes en ninguno de los parámetros biomarcador/PD con placebo el Día 180. Parece que hay una relación de respuesta a la dosis con las mejoras (reducciones) en parámetros biomarcador/PD.

10

TABLA 19

Mediciones Farmacodinámicas el Día 180

15

20

25

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Parámetro			
IL-2r soluble (Rango normal: 640-2543 pg/mL)	n=95	n=84	n=76
Línea Base Media ($\pm$ SD)	1426.19 $\pm$ 751.76	1396.82 $\pm$ 610.21	1429.13 $\pm$ 667.84
Línea Base Posterior Media ($\pm$ SD)	1112.62 $\pm$ 699.68	1261.31 $\pm$ 473.66	1470.03 $\pm$ 637.75
Cambio Medio	-316.23	-135.51	43.59
95% CI	(-417.73, -214.72)	(-241.48, -29.53)	(-71.24, 158.43)

X 558

	Parámetro	CTLA4Ig (BMS-188667)		Placebo (n=119)
		10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	
5	Factor Reumatoide (Rango Normal: 0-20 IU/mL)	n=95	n=84	n=74
	Línea Base Media ($\pm$ SD)	289.71 $\pm$ 401.95	256.19 $\pm$ 307.92	196.11 $\pm$ 265.48
10	Línea Base Posterior Media ($\pm$ SD)	185.43 $\pm$ 269.52	227.82 $\pm$ 276.27	204.36 $\pm$ 320.09
	Cambio Medio	-104.27	-28.12	-0.62
	95% CI	(-151.53, -57.01)	(-52.13, -4.11)	(-31.67, 30.43)
15	ICAM-1	n=95	n=82	n=75
	Línea Base Media ($\pm$ SD)	404.89 $\pm$ 137.72	393.47 $\pm$ 150.85	387.33 $\pm$ 230.93
	Línea Base Posterior Media ($\pm$ SD)	364.74 $\pm$ 109.47	387.25 $\pm$ 142.73	386.17 $\pm$ 163.82
20	Cambio Medio	-40.42	-6.22	1.09
	95% CI	(-58.06, - 22.78)	(-27.49, 15.05)	(-31.88, 34.05)
	E-selectina	n=89	n=80	n=71
25	Línea Base Media ($\pm$ SD)	68.07 $\pm$ 32.93	67.32 $\pm$ 37.13	68.23 $\pm$ 43.09

17/559

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Parámetro	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Línea Base Posterior Media (±SD)	61.01± 31.53	67.86± 40.20	67.37± 35.66
Cambio Medio	-8.41	0.54	-0.68
95% CI	(-13.24, - 3.58)	(-5.95, 7.03)	(-6.7, 5.51)
Suero IL-6 (Rango Normal: 0.3-14.8 pg/mL)	n=86	n=74	n=69
Línea Base Media (±SD)	28.47± 38.28	31.75± 42.29	21.20± 26.51
Línea Base Posterior Media (±SD)	9.25± 15.85	16.00± 22.13	23.98± 37.92
Cambio Medio	-20.30	-16.10	1.98
95% CI	(-27.55, - 13.06)	(-24.20, -8.00)	(-7.21, 11.17)
TNFα (1.2-8.0 pg/mL)	n=84	n=74	n=69
Línea Base Media (±SD)	11.17± 23.72	7.51± 13.25	13.12± 23.20
Línea Base Posterior Media (±SD)	7.57 ± 7.90	6.20± 4.48	9.59 ± 11.21
Cambio Medio	-3.66	-1.21	-3.54
95% CI	(-8.62, 1.30)	(-4.32, 1.90)	(-7.82, 0.75)

11/11/560

- En general, el patrón en los cambios en los datos biomarcador/PD el Día 360 fueron similares a los que se aprecian el Día 180. Hay mejoras importantes (reducciones) en 5 de los 6 parámetros biomarcador/PD con 10 mg/kg CTLA4Ig el
- 5 Día 360 (IL-2r soluble, RF, ICAM-1, E-selectina e IL-6) y una numérica, pero no las mejoras estadísticamente importantes observadas para TNF- α (Tabla 20). Hay una mejora importante (reducción) en IL-6 sólo con 2 mg/kg CTLA4Ig el Día 360, sin embargo, las mejoras numéricas se aprecian con RF y ICAM-1.
- 10 No hay cambios importantes en ninguno de los parámetros biomarcador/PD con placebo el Día 360. Como se aprecia con los datos del Día 180, parece que todas las mejoras (reducciones) en parámetros biomarcador/PD se presentan en una manera que responde a la dosis.
- 15 Una comparación para las líneas base posteriores medias para los parámetros biomarcador/PD el Día 180 a aquellos el Día 360 revela tendencias importantes. Para el grupo 10 mg/kg CTLA4Ig, todas las mediciones biomarcadores/PD continúan a la reducción, con la excepción de IL-2r soluble que se
- 20 incrementa ligeramente. Para el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig, los valores medios para 3 de los parámetros biomarcadores/PD ya sea que se reducen ligeramente (ICAM-1, IL-6 suero) o se mantienen relativamente constantes (E-selectina) y los valores medios APRA las otras 3 mediciones biomarcadores/PD
- 25 se incrementan ligeramente (IL-2r soluble, RF, TNF α). Para

561

el grupo placebo, los valores medios para todos los parámetros biomarcadores/PD se incrementan ligeramente el Día 360, con la excepción de TNF α que se mantiene relativamente sin cambio.

5

TABLA 20

Mediciones Farmacodinámicas el Día 360

10

15

20

25

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Medición	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
IL-2r soluble (Rango normal: 640-2543 pg/mL)	n=68	n=56	n=55
Línea Base Media ($\pm$ SD)	1372.10 $\pm$ 770.11	1373.86 $\pm$ 567.75	1459.93 $\pm$ 695.07
Línea Base Posterior Media ($\pm$ SD)	1185.51 $\pm$ 638.95	1413.84 $\pm$ 452.50	1666.59 $\pm$ 611.97
Cambio Medio	-194.31	39.99	206.22
95% CI	(-305.67, -82.96)	(-69.87, 149.84)	(35.88, 376.56)
Factor Reumatoide (Rango Normal: 0-20 IU/mL)	n=69	n=55	n=58
Línea Base Media ($\pm$ SD)	261.43 $\pm$ 333.58	258.42 $\pm$ 318.65	179.12 $\pm$ 207.72

562

		CTLA4Ig (BMS-188667)		
	Medición	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
5	Línea Base Posterior Media ($\pm$ SD)	143.13 $\pm$ 180.80	236.61 $\pm$ 287.36	206.42 $\pm$ 256.27
	Cambio Medio	-118.30	-25.64	20.90
	95% CI	(-175.19, -61.42)	(-58.50, 7.23)	(-10.72, 52.51)
10	ICAM-1	n=77	n=68	n=64
	Línea Base Media ($\pm$ SD)	406.44 $\pm$ 145.22	393.41 $\pm$ 132.97	405.67 $\pm$ 245.16
	Línea Base Posterior Media ($\pm$ SD)	354.90 $\pm$ 111.40	380.42 $\pm$ 113.20	405.07 $\pm$ 194.15
15	Cambio Medio	-55.15	-12.98	1.47
	95% CI	(-74.80, -35.49)	(-35.36, 9.39)	(-26.41, 29.35)
	E-selectina	n=75	n=68	n=62
20	Línea Base Media ($\pm$ SD)	68.84 $\pm$ 34.38	66.75 $\pm$ 37.10	69.72 $\pm$ 44.38
	Línea Base Posterior Media ($\pm$ SD)	58.77 $\pm$ 26.61	67.58 $\pm$ 31.50	71.90 $\pm$ 47.43
	Cambio Medio	-10.89	0.83	2.34
25	95% CI	(-15.70, -6.08)	(-5.62, 7.28)	(-4.53, 9.20)

212
563

		CTLA4Ig (BMS-188667)		
		10 mg/kg	2 m/kg	Placebo
	Medición	(n=115)	(n=105)	(n=119)
5	Suero IL-6 (Rango Normal: 0.3-14.8 pg/mL)	n=56	n=47	n=48
	Línea Base Media (±SD)	27.68± 38.56	27.19± 32.45	17.27± 22.47
	Línea Base Posterior Media (±SD)	7.64± 14.21	13.93± 19.00	17.72± 29.76
10	Cambio Medio	-20.88	-12.72	-0.19
	95% CI	(-31.56, -10.19)	(-22.49, -2.94)	(-7.55, 7.18)
	TNFα (1.2-8.0 pg/mL)	n=61	n=48	n=50
15	Línea Base Media (±SD)	9.71± 22.80	6.27± 3.62	10.81± 21.24
	Línea Base Posterior Media (±SD)	6.67 ± 4.80	7.18± 8.14	9.36 ± 26.43
	Cambio Medio	-3.02	1.08	-1.41
20	95% CI	(-8.70, 2.67)	(-1.26, 3.42)	(-5.14, 2.33)

Los datos se muestran gráficamente para estas mediciones de biomarcador/PD, así como para cambios en los niveles CRP, en las Figuras 81 hasta 87.

Con objeto de evaluar la integridad de los análisis
25 proyectados, todos los sujetos que reciben medicamento de

564

estudio y se descontinúan del estudio por cualquier razón, se consideran que no responden a ACR en todas las visitas de estudio programadas después de la descontinuación. Los resultados de estos análisis (Tabla 21) son consistentes con los resultados de eficacia ya presentados. La proporción de sujetos que reciben 10 mg/kg CTLA4Ig y alcanzan una respuesta ACR 20, ACR 50, o ACR 70 el Día 180 fue significativamente ($p<0.001$) mayor en comparación con la proporción de sujetos que reciben placebo. Para el grupo 2 mg/kg CTLA4Ig, una proporción significativamente ($p<0.009$) mayor de sujetos alcanzan ya sea una respuesta ACR 50 ó ACR 70.

TABLA 21

Respuesta ACR el Día 180 (que no completan igual que no responden)

15

20

25

	CTLA4Ig (BMS-188667)		Placebo (n=119)
	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	
ACR 20, n (%)	67 (58.3)	41 (39.0)	38 (31.9)
Dif (CI)	26.3 (13.6, 39.1)	7.1 (-5.4, 19.7)	N/A
Valor p	<0.001 ^a	0.266	N/A
ACR 50, n (%)	41 (35.7)	24 (22.9)	N/A
Dif (CI)	25.6 (14.8, 36.3)	12.8 (3.1, 22.4)	N/A
Valor p	<0.001 ^a	0.009 ^a	N/A
ACR 70, n (%)	19 (16.5)	11 (10.5)	2 (1.7)
Dif (CI)	14.8 (7.5, 22.2)	8.8 (2.7, 14.9)	N/A
Valor p	<0.001 ^a	0.005 ^a	N/A

7/2/565

* Indica una diferencia estadísticamente importante para la comparación de BMS-188667 vs placebo.

Además, todos los análisis de eficacia primarios se
5 realizaron en el conjunto de datos WOCF (peor observación
realizada). Las respuestas ACR basadas en el conjunto de
datos WOCF fueron ligeramente más bajas que aquellas
reportadas en la Tabla 13 y son comparables con aquellas
presentadas en la Tabla 21. estos hallazgos confirman la
10 consistencia de las relaciones de respuesta ACR en los grupos
de tratamiento CTLA4Ig (BMS-188667).

Las dosis de medicamentos concomitantes anti-reumáticos
se colectan para evaluar la necesidad de estos medicamentos
en 6 y 12 meses; sin embargo, los datos disponibles son
15 inadecuados para realizar estos análisis. Sólo los valores de
línea base para la dosis media de metotrexato y
corticosteroides (no tópicos) sistémicos se proporcionan.

Conclusiones de Eficacia

20 CTLA4Ig (BMS-188667) administrado a 10 mg/kg (+ MTX)
tuvo una eficacia comparada al placebo (+ MTX) en el día 180
y el día 360. Para los siguientes parámetros de eficacia, la
administración de 10 mg/kg de CTLA4Ig fue significativamente
mejor que el placebo:

25 Eficacia primaria variable: respuesta de ACR20 el día 180

($p < 0.001$).

Respuesta de ACR50 y ACR70 el día 180 ($p < 0.001$)

Respuestas de ACR20, ACR50 y ACR70 el día 360 ($p \leq 0.003$)

5 Se observaron respuestas estadísticamente significativas en ACR50 y ACR70 el día 30 ($p = 0.039$ y $p = 0.04$), se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las 3 relaciones de la respuesta (ACR 20, ACR50 y ACR70) en el día 90; estos valores permanecieron con una estadística
10 importante en un intervalo de tiempo que incluye el día 360 ($p < 0.008$).

Proporciones *de sujetos que obtienen una respuesta Clínica Principal (mantenimiento de una respuesta ACR 70 durante un periodo continuo de 6 meses) en el día 360
15 ($p = 0.008$).

Media numérica ACR-AUC para el día 360 ($p < 0.001$).

Media mejorada en porcentaje en cada componente ACR individual el día 180 y el día 360 ($p < 0.05$, 95% CIs no incluye 0)

20 Las mejoras en todos los cuatro dominios mentales y físicos de la evaluación superada de Salud (SF-36) tanto en el Día 180 como en el día 360 ($p < 0.05$, 95% CIs no incluye 0). Además de las diferencias estadísticamente significativas, el grupo CTLA4Ig 10 mg/kg obtuvo un número reducido de nuevas
25 uniones y un número alto de sujetos que no reportaron