06-10049

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SIC

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

06-10049

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TITULO** METODOS PARA TRATAR ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES USANDO UNA MOLECULA SOLUBLE CTLA4

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** A61K38/17, A61P9/10.

71. **SOLICITANTE** BRISTOL - MYERS SQUIBB COMPANY

DOMICILIO PRINCETON, NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **SANTAFE DE BOGOTA, D.C.** _____

PETITORIO

AS: 100.356

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05018049 00000000 Folios: 732
Fecha (AMD): 2006-02-02 16:13:34
Tramite : 011 PCT-PATENT 370 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 04-03-2006.

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: **BRISTOL – MYERS SQUIBB COMPANY** Dirección: P.O. Box 4000, Route 206 and Province Line Road, Princeton, NJ 08543-4000, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos Lugar de Constitución: Estados Unidos Teléfono: Fax: E-mail	**IDENTIFICACION** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____ Número
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9 Teléfono: 380-2200 Fax: 380-2700 E-mail:	**IDENTIFICACION** C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____ Número 80.410.337 TP 57492
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: James Rusnak Dirección: 540 Pineville Road, Newtown, Pennsylvania 18940, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América	

5 PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2004/024840 Fecha 03-08-2004
Publicación Internacional No. WO 2005/016266 A2 Fecha 24-02-2005

Título (54): MÉTODOS PARA TRATAR ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES USANDO UNA MOLÉCULA SOLUBLE CTLA4

7 Clasificación Internacional (51) A61K 38/17, A61P 9/10

8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US	04-08-2003	60/492,430

9 Comprobante de pago No. 06-1524 **Fecha** 01-02-2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. $463.000
- [x] Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada
- [ ] Documento de cesión del Inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros: Tarjeta de Propietarios

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:

C.C. 80.410.337 de Usaquén T.P. 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

7 3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 1,524
FECHA : ENERO 10 DE 2006

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 06010049 00000000 Folios: 732
Fecha (AMD): 2006-02-02 16:13:34
Tramite : 011 PCT-PATENT 370 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	12602354	10/01/2006	13,787,700.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL : $	463,000.

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

RETIRO FOLIO 4 PARA TARJETERO/

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
24 February 2005 (24.02.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/016266 A2

(51) International Patent Classification[7]: A61K

(21) International Application Number: PCT/US2004/024840

(22) International Filing Date: 3 August 2004 (03.08.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/492,430 4 August 2003 (04.08.2003) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US]; P.O. BOX 4000, ROUTE 206 & PROVINCE LINE ROAD, PRINCETON, New Jersey 08543 (US).

(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (*for US only*): RUSNAK, James [US/US]; 540 Pinoville Road, Newtown, Pennsylvania 18940 (US).

(74) Agents: SHER, Audrey, F. et al.; P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS FOR TREATING CARDIOVASCULAR DISEASE USING A SOLUBLE CTLA4 MOLECULE

Demographic -1-

		Placebo N=32	CTLA 5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA 5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	Total N=214
Gender	Male	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
	Female	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
Race	White	30 (94%)	23 (88%)	30 (94%)	30 (94%)	29 (91%)	25 (86%)	27 (87%)	194 (91%)
	Black	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (3 %)	3 (10%)	2 (6%)	9 (4%)
	Other	0 (0%)	3 (12%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	11 (5%)
Disease Duration	<2 years	12 (38%)	5 (19%)	8 (25%)	12 (38%)	10 (31%)	10 (34%)	11 (35%)	68 (32%)
	2-5 years	14 (44%)	11 (42%)	18 (56%)	13 (41%)	14 (44%)	14 (48%)	12 (39%)	96 (45%)
	5-7 years	6 (19%)	8 (31%)	6 (19%)	6 (19%)	6 (19%)	5 (17%)	7 (23%)	44 (21%)
	>7years	0 (0%)	2 (8%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (6%)	0 (0%)	1 (3%)	6 (3%)
Duration Disease (years)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Mean	3.2	4.2	3.3	3.4	3.7	3.1	3	3.4
	Std	2	2	1.7	2.1	2	1.8	2.2	2
	Min	0.3	0.2	0.4	0	0.7	0.4	0	0
	Max	7	7.5	6.8	7.3	7.6	7	7.1	7.6

(57) Abstract: The present invention relates to compositions and methods for treating cardiovascular system diseases by administering to a subject soluble CTLA4 molecules that block endogenous B7 molecules from binding their ligands.

WO 2005/016266 A2

METHODS FOR TREATING CARDIOVASCULAR DISEASE USING A SOLUBLE CTLA4 MOLECULE

Throughout this application various publications are referenced. The disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by reference into this application in order to more fully describe the state of the art to which this invention pertains.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to the field of cardiovascular diseases. In particular, the invention relates to methods and compositions for treating or preventing cardiovascular diseases by administering to a subject an effective amount of soluble CTLA4 molecules alone, or in conjunction with other therapeutic agents.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Approximately 62 million Americans have one or more types of cardiovascular disease with coronary heart disease (CHD) and stroke afflicting more than 17 million patients in the United States alone (Ref: American Heart Association. *2002 Heart and Stroke Statistical Update*. Dallas, Tex.: American Heart Association; 2001). Despite numerous therapeutic options and technological advances, morbidity and mortality from these diseases are exceedingly high; in fact, cardiovascular diseases are the leading cause of death in the United States claiming 2 of every 5 deaths. Consequently, new approaches to the treatment and prevention of cardiovascular diseases are needed.

The concept that atherosclerosis, the leading cause of CHD, is a process of passive accumulation of lipid in arterial walls eventually leading to the development of symptomatic cardiovascular disease is no longer tenable (Ref: Scientific American 2002 (May): 46-55). Instead, this hypothesis is being replaced by evidence that cardiovascular disease represents a chronic inflammatory process (Ref: Circulation 2002; 105:1135-43). It has been proposed that underlying and preceding acute coronary or cerebrovascular events are "vulnerable" (or high-risk) atherosclerotic

plaque(s). Inflammation is thought to be a major contributing factor to plaque instability and rupture leading to unstable angina (UA) and acute myocardial infarction (AMI). Vulnerable plaques have been shown to be frequently present in numerous anatomically distinct locations rather than isolated to a single (culprit) lesion (Ref: Circulation 2003;107:2072-2075). The multifocal nature of vulnerable plaques has been documented in autopsy series and in studies using angiographic, intravascular ultrasound (IVUS), angioscopic, or thermography techniques. Clinical endpoint data (e.g., death, myocardial infarction, stroke) that further support these hypotheses are derived from epidemiological data, retrospective hypothesis-generating analyses of completed clinical trials, and prospective evaluation in clinical trials (summarized below).

Epidemiological data from the Physician's Health Study provides compelling evidence that markers of inflammation (e.g., C-reactive protein [CRP], fibrinogen, interleukin-6, soluble intracellular adhesion molecule-1 [sICAM-1]) are predictive of the future risk of developing AMI (Ref: Circulation 1999;100:1148-1150). Subsequently, more than a dozen population-based epidemiological studies have reported similar observations (Ref: Circulation 2002; 105:1135-43). CRP (and high sensitivity CRP [hs-CRP]) has been the most widely studied inflammatory marker across these epidemiological studies. CRP appears to be an independent predictor of subsequent cardiovascular events (AMI, death) in both primary prevention and secondary prevention patient populations.

Experimental and clinical evidence supports the notion that reduction of inflammation leads to a reduction in clinical events. Aspirin has been shown in the Physician's Health Study to be associated with a reduction of inflammation, as measured by CRP, and is associated with a concomitant reduction of coronary events (Ref: Circulation 1999;100:1148-1150). To what extent anti-inflammatory effects/CRP reduction vs. antiplatelet effects of aspirin had on this finding in a population of apparently healthy men is not known. Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors ("statins"; e.g., pravastatin, simvastatin, atorvastatin, fluvastatin, and lovastatin) serve as a second example of an existing therapy that has anti-inflammatory properties. In addition to their effects on serum lipids, statins also reduce CRP (Ref: Circulation 2002; 105:1135-43). The Pravastatin in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) study provided the first

clinical evidence that statin therapy lowers CRP in a fashion unrelated to low-density lipoprotein (LDL) or high-density lipoprotein (HDL) cholesterol. The magnitude of relative risk reduction for subsequent cardiovascular events in this hypercholesterolemic population was greater among subjects who also had evidence of inflammation (i.e., CRP elevation) as compared with those without evidence of inflammation (Ref: Circulation 1999;100:230-235). This observation was prospectively validated in the Pravastatin Inflammation CRP Evaluation (PRINCE) study and also reported in analysis of several other trials with a variety of statins (Ref: Circulation 2002; 105:1135-43).

Evidence dissociating the benefits of statin therapy in patients with elevations in CRP from those with elevation of cholesterol are derived from the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS; Ref: New Engl J Med 2001;344:1959-1965). This study was a primary prevention study using lovastatin in a population with low to moderate cardiovascular risk. In this study, the magnitude of risk reduction afforded by lovastatin as compared with placebo was nearly as great in the patients with low levels of LDL / high levels of CRP as compared with those with high levels of LDL / low levels of CRP.

The above findings suggest that inflammation represents a novel risk category that is not currently addressed as standard of care in clinical practice guidelines. Since approximately half of all heart attacks occur in populations with normal cholesterol levels, identification and modulation of newly identified risk factors would be an important strategy for reducing cardiovascular morbidity and mortality. The population that fits within this cohort of low-LDL/high-CRP has been estimated to be approximately 25 million Americans (Ref: Circulation 2002; 105:1135-43). The elevation of CRP appears to occur in a graded fashion consistent with subsequent risk of cardiovascular events. Specifically, elevated CRP (>3 mg/dL) is found in 10% of healthy individuals, but is elevated in <20%, >65%, and >90% in patients with chronic stable angina, unstable angina (Braunwald class IIIb), and AMI preceded by USA, respectively (Ref: Circulation 2002; 105:1135-43). Therefore, inflammatory markers represent an opportunity for identification and pharmacological intervention in populations at risk for the development of cardiovascular events.

Other markers of inflammation are emerging that may either replace or augment the utility of CRP measurement. Recently, novel markers of inflammation, including increases in soluble CD40 ligand (sCD40L) and decreases in serum interleukin-10 (IL-10) concentration, have been associated with increased cardiovascular morbidity and mortality. Evidence suggests that CD40L is important in atherosclerotic plaque destabilization. CD40L shed from stimulated lymphocytes is pro-inflammatory causing upregulation of inflammatory cytokines and adhesion molecules. Moreover, CD40L also promotes coagulation by inducing expression of tissue factor in macrophages and endothelial cells and also activates glycoprotein IIb/IIIa (Refs: Proc. Natl. Acad. Sci. 1997;94:1931-1936; Nature 1998;394:200-203; Circulation 2002;106:896-899).

Epidemiological evidence from the Women's Health Study demonstrated elevated serum sCD40L concentrations are associated with a graded and continuous rise in cardiovascular risk (Ref: Circulation 2001;104:2266-2268). The increase in cardiovascular risk was nearly 12-fold higher among women with the highest sCD40L concentrations. Similar findings were also observed in the c7E3 Fab Antiplatelet Therapy in Unstable Refractory Angina (CAPTURE) study (Ref: NEJM 2003;348:1104-1111). In this study, a graded and continuous rise in cardiovascular risk (death or nonfatal myocardial infarction) was noted among placebo-treated subjects based upon quintiles of baseline sCD40L. This difference in cardiovascular risk was evident at both early (24 hour) and late (6 month) endpoint determinations. A similar analysis from the CAPTURE trial investigating the anti-inflammatory cytokine IL-10 revealed that placebo-treated patients with high levels of IL-10 (i.e., high anti-inflammatory cytokine levels) had a reduced risk of death (Ref: Circulation 2003; 107:2109-2114). Patients in the highest quartile of serum concentrations of the anti-inflammatory cytokine IL-10 had a >50% reduction in mortality rate as compared with those patients in the lowest quartile of serum IL-10 levels. Moreover, if at the time of hospital discharge patient populations are dichotomized as either high or low IL-10 levels there was an observed adjusted hazard ratio for mortality of 0.38 (i.e., a 62% relative risk reduction) at 6 months favoring subjects with high (anti-inflammatory) IL-10 levels.

In summary, the concept of cardiovascular diseases occurring as a passive process mediated by lipid deposition alone is antiquated. There is a substantial

increase in experimental and clinical evidence that suggests cardiovascular disease is a manifestation of a chronic inflammatory process and that intervention in this inflammation may reduce patient morbidity and mortality. Currently, however, the cellular and molecular mediators of these processes are only now being elucidated. Elucidation for these processes is hampered by the lack of an appropriate preclinical model for acute coronary syndrome (ACS). Despite the lack of knowledge of these precise mechanisms, the anti-inflammatory effects of statins appear to validate the concept that pharmacological intervention in patients with elevated markers inflammation leads to reductions of cardiovascular morbidity and mortality. Notably, these benefits are afforded through the serendipitous pleiotropic anti-inflammatory activities of statins. Further understanding of the cellular and molecular processes may lead to the development of specific and more efficacious anti-inflammatory agents to further reduce cardiovascular morbidity and mortality among these patients.

In general, the magnitude of the T-cell response is determined by the co-stimulatory response elicited by the interaction between T-cell surface molecules and their ligands (Mueller, et al., 1989 *Ann. Rev. Immunol.* 7:445-480). Key co-stimulatory signals are provided by the interaction between T-cell surface receptors, CD28 and CTLA4, and their ligands, such as B7-related molecules CD80 (i.e., B7-1) and CD86 (i.e., B7-2), on antigen presenting cells (Linsley, P. and Ledbetter, J. 1993 *Ann. Rev. Immunol.* 11:191-212). T-cell activation in the absence of co-stimulation results in anergic T-cell response (Schwartz, R. H., 1992 *Cell* 71:1065-1068) wherein the immune system becomes nonresponsive to stimulation.

Soluble forms of CD28 and CTLA4 have been constructed by fusing variable (V)-like extracellular domains of CD28 and CTLA4 to immunoglobulin (Ig) constant domains resulting in CD28Ig and CTLA4Ig. A nucleotide and amino acid sequence of CTLA4Ig is shown in Figure 24 with the protein beginning with methionine at position +1 or alanine at position -1 and ending with lysine at position +357. CTLA4Ig binds both CD80-positive and CD86-positive cells more strongly than CD28Ig (Linsley, P., et al., 1994 *Immunity* 1:793-80). Many T-cell-dependent immune responses have been found to be blocked by CTLA4Ig both *in vitro and in vivo*. (Linsley, P., et al., 1991b, *supra*; Linsley, P., et al., 1992a *Science* 257:792-795; Linsley, P., et al., 1992b *J. Exp. Med.* 176:1595-1604; Lenschow, D.J., et al. 1992

Science 257:789-792; Tan, P., et al., 1992 *J. Exp. Med.* 177:165-173; Turka, L.A., 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11102-11105).

To alter binding affinity to natural ligands, such as B7, soluble CTLA4Ig fusion molecules were modified by mutation of amino acids in the CTLA4 portion of the molecules. Regions of CTLA4 that, when mutated, alter the binding affinity or avidity for B7 ligands include the complementarity determining region 1 (CDR-1 as described in U.S. Patents 6,090,914, 5,773,253, 5,844,095; in copending U.S. Patent Application Serial Number 60/214,065; and by Peach et al, 1994. J. Exp. Med., 180:2049-2058) and complementarity determining region 3 (CDR-3)-like regions (CDR-3 is the conserved region of the CTLA4 extracellular domain as described in U.S. Patents 6,090,914, 5,773,253 and 5,844,095; in copending U.S. Patent Application Serial Number 60/214,065; and by Peach, R.J., et al *J Exp Med* 1994 180:2049-2058; the CDR-3-like region encompasses the CDR-3 region and extends, by several amino acids, upstream and/or downstream of the CDR-3 motif). The CDR-3-like region includes a hexapeptide motif MYPPPY (SEQ ID NO.: 20) that is highly conserved in all CD28 and CTLA4 family members. Alanine scanning mutagenesis through the hexapeptide motif in CTLA4, and at selected residues in CD28Ig, reduced or abolished binding to CD80 (Peach, R.J., et al *J Exp Med* 1994 180:2049-2058; U.S. Patent No. 5,434,131; U.S. Patent No. 6,090,914; U.S. Patent No. 5,773,253.

Further modifications were made to soluble CTLA4Ig molecules by interchanging homologous regions of CTLA4 and CD28. These chimeric CTLA4/CD28 homologue mutant molecules identified the MYPPPY hexapeptide motif common to CTLA4 and CD28, as well as certain non-conserved amino acid residues in the CDR-1- and CDR-3-like regions of CTLA4, as regions responsible for increasing the binding avidity of CTLA4 with CD80 (Peach, R. J., *et al.*, 1994 *J Exp Med* 180:2049-2058).

Soluble CTLA4 molecules, such as CTLA4Ig, CTLA4 mutant molecules or chimeric CTLA4/CD28 homologue mutants as described *supra*, introduce a new group of therapeutic drugs to treat cardiovascular diseases.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides compositions and methods for treating cardiovascular diseases, by administering to a subject a molecule that blocks B7 interactions with CTLA4 and/or CD28, thereby inhibiting endogenous B7 molecules on B7-positive cells from binding CTLA4 and/or CD28 on T-cells. Soluble CTLA4 molecules used in the methods of the invention include CTLA4Ig and soluble CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg.

The present invention provides compositions and methods for treating cardiovascular diseases, by administering to a subject soluble CTLA4 molecules, which bind to B7 molecules on B7-positive cells, thereby inhibiting endogenous B7 molecules from binding CTLA4 and/or CD28 on T-cells. Soluble CTLA4 molecules used in the methods of the invention include CTLA4Ig and soluble CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg.

The present invention also provides methods for treating (e.g. reducing symptoms of) cardiovascular diseases by administering to a subject suffering from symptoms of cardiovascular disease, soluble CTLA4 molecules such as CTLA4Ig and/or soluble CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg and/or a mix of any soluble CTLA molecule. CTLA4Ig and the CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg e.g. beginning with methionine at position +1 or alanine at position -1 and ending with lysine at position +357, as shown in Figure 19, are preferred for use in the methods of the invention.

The present invention also provides a pharmaceutical composition for treating cardiovascular comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a biologically effective agent, such as soluble CTLA4 molecules, alone or in conjunction with other therapeutic drugs.

Kits comprising pharmaceutical compositions therapeutic for cardiovascular disease are also encompassed by the invention. In one embodiment, a kit comprising one or more of the pharmaceutical compositions of the invention is used to treat a cardiovascular disease. For example, the pharmaceutical composition comprises an effective amount of soluble CTLA4 molecules that bind to B7 molecules on B7-positive cells, thereby blocking the B7 molecules from binding CTLA4 and/or CD28 on T-cells. Further, the kit may contain one or more other therapeutic agents used in conjunction with the pharmaceutical compositions of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1A: Demographic data of patient cohorts. Demographic data including gender, race, and disease duration as described in Example 3, *infra*.

Figure 1B: Demographic data of patient cohorts. Demographic data including gender, age, weight, and disease activity, evaluated by the patient and by the physician, as described in Example 3, *infra*.

Figure 1C: Demographic data of patient cohorts as described in Example 3, *infra*. Demographic data including disease activity, erythrocyte sedimentation rate (ESR), physical function (disability evaluated by health questionnaire), and C-reactive protein (CRP).

Figure 1D: Demographic data of patient cohorts as described in Example 3, *infra*. Demographic data including joint swelling, joint tenderness, morning stiffness, and pain.

Figure 1E: Demographic data of patient cohorts as described in Example 3, *infra*. Demographic data including prior treatments.

Figure 2: Summary of discontinuations at day 85 by reason as described in Example 3, *infra*.

Figure 3A: ACR responses at Day 85 as described in Example 3, *infra*: ACR-20, -50, and -70 responses.

Figure 3B: ACR-20 responses at Day 85, including placebo response, as described in Example 3, *infra*: ACR-20 response with 95% confidence limits.

Figure 3C: ACR-20 responses at Day 85 as described in Example 3, *infra*: Difference in ACR-20 response with respect to 95% confidence intervals.

Figure 4A: Basic (20% improvement) clinical responses in swollen and tender joint count in percentage of patients at Day 85 as described in Example 3, *infra*: basic clinical response, ACR-20.

Figure 4B: Clinical responses (in percentage improvement) in swollen and tender joint count in percentage of patients at Day 85 as described in Example 3, *infra*: change in clinical response in percentage improvement.

Figure 5A: Pain response (by Likert scale by mean unit change from baseline) in percentage of patients at Day 85 as described in Example 3, *infra*: pain score changes from baseline.

Figure 5B: Patient global disease changes (by Likert scale by mean unit change from baseline) in percentage of patients at Day 85 as described in Example 3, *infra*: patient global disease activity changes.

Figure 5C: Physician global disease changes (by Likert scale by mean unit change from baseline) in percentage of patients at Day 85 as described in Example 3, *infra*: physician global disease activity changes.

Figure 5D: Pain (by Likert scale by mean unit change from baseline) in percentage of patients at Day 85 as described in Example 3, *infra*: pain changes from baseline.

Figure 6A: Patient global assessment of disease activity change from baseline by range of 2 units at Day 85 as described in Example 3, *infra*; disease activity improvement.

Figure 6B: Physician global assessment of disease activity change from baseline by range of 2 units at Day 85 as described in Example 3, *infra*; disease activity improvement.

Figure 7A: Percent reduction in C-reactive protein (CRP) levels at Day 85 as described in Example 3, *infra*: percentage reduction in CRP levels from baseline.

Figure 7B: Difference in reduction in C-reactive protein (CRP) levels at Day 85 as described in Example 3, *infra*: percent reduction difference in CRP levels with 95% confidence intervals.

Figure 7C: Mean reduction in C-reactive protein (CRP) levels at Day 85 as described in Example 3, *infra*: mean change from baseline.

Figure 8: Reduction in soluble IL-2 receptor levels mean change from baseline at Day 85 as described in Example 3, *infra*.

Figure 9A: The effect of CTLA4Ig on tender joints over time as described in Example 3, *infra*: median difference from baseline.

Figure 9B: The effect of CTLA4Ig on tender joints over time as described in Example 3, *infra*: mean difference from baseline.

Figure 10A: The effect of CTLA4Ig on swollen joints over time as described in Example 3, *infra*: median difference from baseline.

Figure 10B: The effect of CTLA4Ig on swollen joints over time as described in Example 3, *infra*: mean difference from baseline.

Figure 11: The effect of CTLA4Ig on pain assessment mean difference from baseline over time as described in Example 3, *infra*.

Figure 12A: The effect of CTLA4Ig on patient assessment of disease activity mean difference from baseline over time as described in Example 3, *infra*.

Figure 12B: The effect of CTLA4Ig on physician assessment of disease activity mean difference from baseline over time as described in Example 3, *infra*.

Figure 13A: The effect of L104EA29YIg on tender joints over time as described in Example 3, *infra*: median difference from baseline.

Figure 13B: The effect of L104EA29YIg on tender joints over time as described in Example 3, *infra*: mean change from baseline.

Figure 14A: The effect of L104EA29YIg on swollen joints over time as described in Example 3, *infra*: median difference from baseline.

Figure 14B: The effect of L104EA29YIg on swollen joints over time as described in Example 3, *infra*: mean change from baseline.

Figure 15: The effect of L104EA29YIg on pain assessment over time as described in Example 3, *infra*: mean change from baseline over time.

Figure 16A: The effect of L104EA29YIg on patient assessment of disease activity mean difference from baseline over time as described in Example 3, *infra*.

Figure 16B: The effect of L104EA29YIg on physician assessment of disease activity mean difference from baseline over time as described in Example 3, *infra*.

Figure 17: Percent improvement in patient disability assessed by Health Assessment Questionnaire (HAQ) compared to the baseline at Day 85 with CTLA4Ig and L104EA29YIg treatment as described in Example 3, *infra*.

Figure 18: Nucleotide and amino acid sequence of L104EIg (SEQ ID NOs: 6-7) as described in Example 1, *infra*.

Figure 19: Nucleotide and amino acid sequence of L104EA29YIg (SEQ ID NOs: 8-9) as described in Example 1, *infra*.

Figure 20: Nucleotide and amino acid sequence of L104EA29LIg (SEQ ID NOs: 10-11) as described in Example 1, *infra*.

Figure 21: Nucleotide and amino acid sequence of L104EA29TIg (SEQ ID NOs: 12-13) as described in Example 1, *infra*.

Figure 22: Nucleotide and amino acid sequence of L104EA29WIg (SEQ ID NOs: 14-15) as described in Example 1, *infra*.

Figure 23: Nucleotide and amino acid sequence of CTLA4 receptor (SEQ ID NOs: 16-17).

Figure 24: Nucleotide and amino acid sequence of CTLA4Ig (SEQ ID NOs: 18-19).

Figure 25: SDS gel (FIG. 25A) for CTLA4Ig (lane 1), L104EIg (lane 2), and L104EA29YIg (lane 3A); and size exclusion chromatographs of CTLA4Ig (FIG. 25B) and L104EA29YIg (FIG. 25C).

Figures 26 (left and right depictions): A ribbon diagram of the CTLA4 extracellular Ig V-like fold generated from the solution structure determined by NMR spectroscopy. FIG. 26 (right depiction) shows an expanded view of the CDR-1 (S25-R33) region and the MYPPPY region indicating the location and side-chain orientation of the avidity enhancing mutations, L104 and A29.

Figures 27A and 27B: FACS assays showing binding of L104EA29YIg, L104EIg, and CTLA4Ig to human CD80- or CD86-transfected CHO cells as described in Example 2, *infra*.

Figures 28A and 28B: Graphs showing inhibition of proliferation of CD80-positive and CD86-positive CHO cells as described in Example 2, *infra*.

Figures 29A and 29B: Graphs showing that L104EA29YIg is more effective than CTLA4Ig at inhibiting proliferation of primary and secondary allostimulated T cells as described in Example 2, *infra*.

Figures 30A-C: Graphs illustrating that L104EA29YIg is more effective than CTLA4Ig at inhibiting IL-2 (FIG. 30A), IL-4 (FIG. 30B), and gamma (γ)-interferon (FIG. 30C) cytokine production of allostimulated human T cells as described in Example 2, *infra*.

Figure 31: A graph demonstrating that L104EA29YIg is more effective than CTLA4Ig at inhibiting proliferation of phytohemaglutinin- (PHA) stimulated monkey T cells as described in Example 2, *infra*.

Figure 32: A graph showing the equilibrium binding analysis of L104EA29YIg, L104EIg, and wild-type CTLA4Ig to CD86Ig.

Figures 33A and 33B: Reduction in soluble ICAM-1 and soluble E-selectin levels mean change from baseline at Day 85 as described in Example 3, *infra*.

Figure 34: A graph showing the summary of ACR20 response by visit day in response to methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) therapy, as described in Example 5, *infra*.

Figure 35: A graph showing the summary of ACR50 response by visit day in response to methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) therapy, as described in Example 5, *infra*.

Figure 36: A graph showing the summary of ACR70 response by visit day in response to methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) therapy, as described in Example 5, *infra*.

Figure 37: A graph showing the mean ACR-N over time in response to methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) therapy, as described in Example 5, *infra*.

Figure 38: A bar graph showing the ACR response in response to methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) therapy on day 180 with a 95% confidence interval, as described in Example 5, *infra*.

Figure 39: A bar graph showing the proportion of New Active Joints in response to methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) therapy on day 180, as described in Example 5, *infra*.

Figure 40: A bar graph showing ACR response after therapy with methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) on day 180, as described in Example 5, *infra*.

Figure 41: A graph showing percent improvement in tender joints after therapy with methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) - mean percent improvement from baseline, as described in Example 5, *infra*.

Figure 42: A graph showing percent improvement in swollen joints after therapy with methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) - mean percent improvement from baseline, as described in Example 5, *infra*.

Figure 43: A graph showing percent improvement in pain after therapy with methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) - mean percent improvement from baseline, as described in Example 5, *infra*.

Figure 44: A graph showing percent improvement in regard to disease activity as reported by the subject after therapy with methotrexate alone or

methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) - mean percent improvement from baseline, as described in Example 5, *infra*.

Figure 45: A graph showing percent improvement in regard to disease activity as reported by the physician after therapy with methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) - mean percent improvement from baseline, as described in Example 5, *infra*.

Figure 46: A graph showing percent improvement regarding physical function after therapy with methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) - mean percent improvement from baseline as measured by HAQ, as described in Example 5, *infra*.

Figure 47: A graph showing percent improvement in CRP levels function after therapy with methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) - mean percent improvement from baseline, as described in Example 5, *infra*.

Figure 48: A graph showing percent improvement in CRP levels function after therapy with methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) - median percent improvement from baseline, as described in Example 5, *infra*.

Figure 49: A graph showing the difference in ACR response rate on day 180 in two groups after therapy with CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) in comparison to a group treated with methotrexate (MTX) only (95% Confidence Limits), as described in Example 5, *infra*.

Figure 50: A graph showing the change from baseline for SF-36 Physical Health Component on day 180, in two groups after therapy with CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) compared to a group treated with methotrexate only (95% Confidence Limits), as described in Example 5, *infra*.

Figure 51: A graph showing the change from baseline for SF-36 Mental Health Component on Day 180, in two groups after therapy with CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg) compared to a group treated with methotrexate only (95% Confidence Limits), as described in Example 5, *infra*.

Figure 52: A bar graph showing CRP levels at day 180 after therapy with methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg), as described in Example 5, *infra*.

Figure 53: A bar graph showing Rheumatoid Factor levels on day 180 after therapy with methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg), as described in Example 5, *infra*.

Figure 54: A bar graph showing IL-2r levels on day 180 after therapy with methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg), as described in Example 5, *infra*.

Figure 55: A bar graph showing IL-6 levels on day 180 after therapy with methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg), as described in Example 5, *infra*.

Figure 56: A bar graph showing TNFα levels on day 180 after therapy with methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 and 10 mg/kg), as described in Example 5, *infra*.

Figure 57: A table of the univariate methotrexate dose at screening/enrollment for treatment group BMS 10 - treated with CTLA4Ig at 10 mg/kg body weight as described in Example 5, *infra*.

Figure 58: A table of the univariate methotrexate dose at screening/enrollment for treatment group BMS 2 - treated with CTLA4Ig at 2 mg/kg body weight as described in Example 5, *infra*.

Figure 59: A table of the univariate methotrexate dose at screening/enrollment for the placebo group, as described in Example 5, *infra*.

Figure 60: A table of the univariate methotrexate dose up to and including day 180 of the study for treatment group BMS 10 - treated with CTLA4Ig at 10 mg/kg body weight as described in Example 5, *infra*.

Figure 61: A table of the univariate methotrexate dose up to and including day 180 of the study for treatment group BMS 2 - treated with CTLA4Ig at 2 mg/kg body weight as described in Example 5, *infra*.

Figure 62: A table of the univariate methotrexate dose up to and including day 180 of the study for the placebo group, as described in Example 5, *infra*.

Figure 63: A bar graph showing the difference in modified ACR response rates on day 180 in two groups after therapy with etanercept alone (25 mg twice weekly) or in combination with CTLA4Ig (2mg/kg), as described in Example 6, *infra*.

Figure 64A-C: Graphs showing percentage improvement of individual components of the modified ACR criteria as assessed on each visit day after therapy

with etanercept alone (25 mg twice weekly) or in combination with CTLA4Ig (2 mg/kg) as described in Example 6, *infra*. A. Tender Joint Count. B. Swollen Joint Count. C. Pain Assessment.

Figure 65: A. A graph showing the change from baseline for SF-36 Physical Health Component on day 180, in two groups after therapy with etanercept (25 mg biweekly) alone or in combination with CTLA4Ig (2 mg/kg) (95% Confidence Limits), as described in Example 6, *infra*. B. A graph showing the change from baseline for SF-36 Mental Health Component on day 180, in two groups after therapy with etanercept (25 mg biweekly) alone or in combination with CTLA4Ig (2 mg/kg) (95% Confidence Limits), as described in Example 6, *infra*.

Figure 66: Nucleotide sequence of a CTLA4Ig encoding a signal peptide; a wild type amino acid sequence of the extracellular domain of CTLA4 starting at methionine at position +1 to aspartic acid at position +124, or starting at alanine at position -1 to aspartic acid at position +124; and an Ig region (SEQ ID NO.: 21).

Figure 67: Amino acid sequence of a CTLA4Ig having a signal peptide; a wild type amino acid sequence of the extracellular domain of CTLA4 starting at methionine at position +1 to aspartic acid at position +124, or starting at alanine at position -1 to aspartic acid at position +124; and an Ig region (SEQ ID NO.: 22).

Figure 68: A schematic diagram showing the disposition of subjects into three cohorts as described in Example 7, *infra*.

Figure 69: A Kaplan-Meier plot of the cumulative proportion of subjects who discontinued for any reason during the first 12 months of the study, as described in Example 7, *infra*.

Figure 70: A Kaplan-Meier plot of the cumulative proportion of subjects who discontinued due to lack of efficacy during the first 12 months of study, as described in Example 7, *infra*.

Figure 71A: A graph showing the ACR Responses on Day 180 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 71B: A graph showing the 95 Percent Confidence Intervals for Differences in ACR Responses on Day 180 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 72A: A graph showing the ACR Responses on Day 360 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 72B: A graph showing the 95 Percent Confidence Intervals for Differences in ACR Responses on Day 360 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 73A: A graph summarizing the ACR 20 Response by Visit during a one year interval for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 73B: A graph summarizing the ACR 50 Response by Visit during a one year interval for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 73C: A graph summarizing the ACR 70 Response by Visit during a one year interval for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 74: A graph showing the Mean ACR-N over a one year time interval for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 75: A graph showing the Proportion of New Active Joints at Day 180 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 76A: A graph showing the Frequency of New Tender Joints per Subject at Day 180 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 76B: A graph showing the Frequency of New Tender Joints per Subject at Day 360 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 77A: A graph showing the Frequency of New Swollen Joints per Subject at Day 180 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 77B: A graph showing the Frequency of New Swollen Joints per Subject at Day 360 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 78: A graph showing the Proportion of New Active Joints at Day 360 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 79: Graphs showing the: A) Change from Baseline in the Physical Health Domains on Day 180, and B) Change from Baseline in the Mental Health Domains on 180, for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 80: Graphs showing the: A) Change from Baseline in the Physical Health Domains on Day 360, and B) Change from Baseline in the Mental Health Domains on Day 360, for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 81: A graph showing the Soluble IL-2r Levels at Baseline, Days 180 and 360 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 82: A graph showing the Rheumatoid Factor Levels at Baseline, Days 180 and 360 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 83: A graph showing the ICAM-1 Levels at Baseline, Days 180 and 360 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 84: A graph showing the e-Selectin Levels at Baseline, Days 180 and 360 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 85: A graph showing the Serum IL-6 at Baseline, Days 180 and 360 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 86A: A graph showing the CRP Levels at Baseline, Days 180 and 360 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 86B: A graph showing the TNFα Levels at Baseline, Days 180 and 360 for patients administered methotrexate alone or methotrexate and CTLA4Ig (2 or 10 mg/kg body weight) as described in Example 7, *infra*.

Figure 87: Percentage of activated T-cells in atherectomy specimens.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

All scientific and technical terms used in this application have meanings commonly used in the art unless otherwise specified. As used in this application, the following words or phrases have the meanings specified.

As used herein, "ligand" refers to a molecule that specifically recognizes and binds another molecule, for example, a ligand for CTLA4 is a B7 molecule. In a further example, a ligand for the B7 molecule is a CTLA4 and/or CD28 molecule. The interaction of a molecule and its ligand can be regulated by compositions of the invention. For example, CTLA4 interaction with its ligand B7 can be blocked by administration of CTLA4Ig molecules. Alternatively, Tumor Necrosis Factor (TNF), a ligand, interacts with its receptor , the TNF receptor (TNFR), and can be blocked by administration of etanercept or other TNF/TNFR blocking molecules.

As used herein "wild type CTLA4" or "non-mutated CTLA4" has the amino acid sequence of naturally occurring, full length CTLA4 as shown in Figure 23 (also as described in U.S. Patent Nos. 5,434,131, 5,844,095, and 5,851,795 herein incorporated by reference in their entirety), or any portion or derivative thereof, that recognizes and binds a B7 or interferes with a B7 so that it blocks binding to CD28 and/or CTLA4 (e.g., endogenous CD28 and/or CTLA4). In particular embodiments, the extracellular domain of wild type CTLA4 begins with methionine at position +1 and ends at aspartic acid at position +124, or the extracellular domain of wild type CTLA4 begins with alanine at position -1 and ends at aspartic acid at position +124 as shown in Figure 23. Wild type CTLA4 is a cell surface protein, having an N-terminal extracellular domain, a transmembrane domain, and a C-terminal cytoplasmic domain. The extracellular domain binds to target molecules, such as a B7 molecule. In a cell, the naturally occurring, wild type CTLA4 protein is translated as an immature polypeptide, which includes a signal peptide at the N-terminal end.

The immature polypeptide undergoes post-translational processing, which includes cleavage and removal of the signal peptide to generate a CTLA4 cleavage product having a newly generated N-terminal end that differs from the N-terminal end in the immature form. One skilled in the art will appreciate that additional post-translational processing may occur, which removes one or more of the amino acids from the newly generated N-terminal end of the CTLA4 cleavage product. Alternatively, the signal peptide may not be removed completely, generating molecules that begin before the common starting amino acid methionine. Thus, the mature CTLA4 protein may start at methionine at position +1 or alanine at position -1. The mature form of the CTLA4 molecule includes the extracellular domain or any portion thereof, which binds to B7.

As used herein, a "CTLA4 mutant molecule" means wildtype CTLA4 as shown in Figure 23 or any portion or derivative thereof, that has a mutation or multiple mutations (preferably in the extracellular domain of wildtype CTLA4). A CTLA4 mutant molecule has a sequence that it is similar but not identical to the sequence of wild type CTLA4 molecule, but still binds a B7. The mutations may include one or more amino acid residues substituted with an amino acid having conservative (e.g., substitute a leucine with an isoleucine) or non-conservative (e.g., substitute a glycine with a tryptophan) structure or chemical properties, amino acid deletions, additions, frameshifts, or truncations. CTLA4 mutant molecules may include a non-CTLA4 molecule therein or attached thereto. The mutant molecules may be soluble (i.e., circulating) or bound to a cell surface. Additional CTLA4 mutant molecules include those described in U.S. Patent Application Serial Numbers 09/865,321, 60/214,065 and 60/287,576; in U.S. Patent Numbers 6,090,914 5,844,095 and 5,773,253; and as described by Peach, R. J., *et al.*, in *J Exp Med* 180:2049-2058 (1994)). CTLA4 mutant molecules can be made synthetically or recombinantly.

"CTLA4Ig" is a soluble fusion protein comprising an extracellular domain of wildtype CTLA4 that binds B7, or a portion thereof, joined to an immunoglobulin constant region (Ig), or a portion thereof. A particular embodiment comprises the extracellular domain of wild type CTLA4 (as shown in Figure 23) starting at methionine at position +1 and ending at aspartic acid at position +124, or starting at alanine at position -1 to aspartic acid at position +124; a junction amino acid residue

glutamine at position +125; and an immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357 (DNA encoding CTLA4Ig was deposited on May 31, 1991 with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 under the provisions of the Budapest Treaty, and has been accorded ATCC accession number ATCC 68629; Linsley, P., et al., 1994 *Immunity* 1:793-80). CTLA4Ig-24, a Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line expressing CTLA4Ig was deposited on May 31, 1991 with ATCC identification number CRL-10762). The soluble CTLA4Ig molecules used in the methods and/or kits of the invention may or may not include a signal (leader) peptide sequence. Typically, in the methods and/or kits of the invention, the molecules do not include a signal peptide sequence.

"L104EA29YIg" is a fusion protein that is a soluble CTLA4 mutant molecule comprising an extracellular domain of wildtype CTLA4 with amino acid changes A29Y (a tyrosine amino acid residue substituting for an alanine at position 29) and L104E (a glutamic acid amino acid residue substituting for a leucine at position +104), or a portion thereof that binds a B7 molecule, joined to an Ig tail (included in Figure 19; DNA encoding L104EA29YIg was deposited on June 20, 2000 with ATCC number PTA-2104; copending in U.S. Patent Application Serial Numbers 09/579,927, 60/287,576 and 60/214,065, incorporated by reference herein). The soluble L104EA29YIg molecules used in the methods and/or kits of the invention may or may not include a signal (leader) peptide sequence. Typically, in the methods and/or kits of the invention, the molecules do not include a signal peptide sequence.

As used herein, "soluble" refers to any molecule, or fragments and derivatives thereof, not bound or attached to a cell, i.e., circulating. For example, CTLA4, B7 or CD28 can be made soluble by attaching an immunoglobulin (Ig) moiety to the extracellular domain of CTLA4, B7 or CD28, respectively. Alternatively, a molecule such as CTLA4 can be rendered soluble by removing its transmembrane domain. Typically, the soluble molecules used in the methods, compositions and/or kits of the invention do not include a signal (or leader) sequence.

As used herein, "soluble CTLA4 molecules" means non-cell-surface-bound (i.e. circulating) CTLA4 molecules or any functional portion of a CTLA4 molecule that binds B7 including, but not limited to: CTLA4Ig fusion proteins (e.g. encoded by DNA deposited with ATCC accession number 68629), wherein the extracellular

domain of CTLA4 is fused to an immunoglobulin (Ig) moiety such as IgCγ1 (IgCgamma1), IgCγ2 (IgCgamma2), IgCγ3 (IgCgamma3), IgCγ4 (IgCgamma4), IgCμ(IgCmu), IgCα1 (IgCalpha1), IgCα2 (IgCalpha2), IgCδ (IgCdelta) or IgCεIgCepsilon), rendering the fusion molecule soluble, or fragments and derivatives thereof; proteins with the extracellular domain of CTLA4 fused or joined with a portion of a biologically active or chemically active protein such as the papillomavirus E7 gene product (CTLA4-E7), melanoma-associated antigen p97 (CTLA4-p97) or HIV env protein (CTLA4-env gp120) (as described in U.S. Patent No. 5,844,095, herein incorporated by reference in its entirety), or fragments and derivatives thereof; hybrid (chimeric) fusion proteins such as CD28/CTLA4Ig (as described in U.S. Patent No. 5,434,131, herein incorporated by reference in its entirety), or fragments and derivatives thereof; CTLA4 molecules with the transmembrane domain removed to render the protein soluble (Oaks, M. K., et al., 2000 *Cellular Immunology* 201:144-153, herein incorporated by reference in its entirety), or fragments and derivatives thereof. "Soluble CTLA4 molecules" also include fragments, portions or derivatives thereof, and soluble CTLA4 mutant molecules, having CTLA4 binding activity. The soluble CTLA4 molecules used in the methods of the invention may or may not include a signal (leader) peptide sequence. Typically, in the methods, compositions and/or kits of the invention, the molecules do not include a signal peptide sequence.

As used herein "the extracellular domain of CTLA4" is the portion of CTLA4 that recognizes and binds CTLA4 ligands, such as B7 molecules. For example, an extracellular domain of CTLA4 comprises methionine at position +1 to aspartic acid at position +124 (Figure 23). Alternatively, an extracellular domain of CTLA4 comprises alanine at position -1 to aspartic acid at position +124 (Figure 23). The extracellular domain includes fragments or derivatives of CTLA4 that bind a B7 molecule. The extracellular domain of CTLA4 as shown in Figure 23 may also include mutations that change the binding avidity of the CTLA4 molecule for a B7 molecule.

As used herein, the term "mutation" means a change in the nucleotide or amino acid sequence of a wildtype molecule, for example, a change in the DNA and/or amino acid sequences of the wild-type CTLA4 extracellular domain. A mutation in DNA may change a codon leading to a change in the amino acid

sequence. A DNA change may include substitutions, deletions, insertions, alternative splicing, or truncations. An amino acid change may include substitutions, deletions, insertions, additions, truncations, or processing or cleavage errors of the protein. Alternatively, mutations in a nucleotide sequence may result in a silent mutation in the amino acid sequence as is well understood in the art. In that regard, certain nucleotide codons encode the same amino acid. Examples include nucleotide codons CGU, CGG, CGC, and CGA encoding the amino acid, arginine (R); or codons GAU, and GAC encoding the amino acid, aspartic acid (D). Thus, a protein can be encoded by one or more nucleic acid molecules that differ in their specific nucleotide sequence, but still encode protein molecules having identical sequences. The amino acid coding sequence is as follows:

Amino Acid	Symbol	One Letter Symbol	Codons
Alanine	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Cysteine	Cys	C	UGU, UGC
Aspartic Acid	Asp	D	GAU, GAC
Glutamic Acid	Glu	E	GAA, GAG
Phenylalanine	Phe	F	UUU, UUC
Glycine	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Histidine	His	H	CAU, CAC
Isoleucine	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Lysine	Lys	K	AAA, AAG
Leucine	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Methionine	Met	M	AUG
Asparagine	Asn	N	AAU, AAC
Proline	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Glutamine	Gln	Q	CAA, CAG
Arginine	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Serine	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Threonine	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Valine	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Tryptophan	Trp	W	UGG
Tyrosine	Tyr	Y	UAU, UAC

The mutant molecule may have one or more mutations.

As used herein, a "non-CTLA4 protein sequence" or "non-CTLA4 molecule" means any protein molecule that does not bind B7 and does not interfere with the binding of CTLA4 to its target. The non-CTLA4 molecule, attached to the

extracellular domain of a CTLA4 molecule can alter the solubility or affinity of the CTLA4 molecule. An example includes, but is not limited to, an immunoglobulin (Ig) constant region or portion thereof. Preferably, the Ig constant region is a human or monkey Ig constant region, e.g., human C(gamma)1, including the hinge, CH2 and CH3 regions. The Ig constant region can be mutated to reduce its effector functions (U.S. Patents 5,637,481, 5,844,095 and 5,434,131).

As used herein, a "fragment" or "portion" is any part or segment of a molecule e.g. CTLA4 or CD28, preferably the extracellular domain of CTLA4 or CD28 or a part or segment thereof, that recognizes and binds its target, e.g., a B7 molecule.

As used herein, "B7" refers to the B7 family of molecules including, but not limited to, B7-1 (CD80) (Freeman et al, 1989, J Immunol. 143:2714-2722, herein incorporated by reference in its entirety), B7-2 (CD86) (Freeman et al, 1993, Science 262:909-911 herein incorporated by reference in its entirety; Azuma et al, 1993, Nature 366:76-79 herein incorporated by reference in its entirety) that may recognize and bind CTLA4 and/or CD28. A B7 molecule can be expressed on an activated B cell.

As used herein, "CD28" refers to the molecule that recognizes and binds B7 as described in U.S. Serial No. 5,580,756 and 5,521,288 (herein incorporated by reference in their entirety).

As used herein, "B7-positive cells" are any cells with one or more types of B7 molecules expressed on the cell surface.

As used herein, a "derivative" is a molecule that shares sequence similarity and activity of its parent molecule. For example, a derivative of CTLA4 includes a soluble CTLA4 molecule having an amino acid sequence at least 70% similar to the extracellular domain of wildtype CTLA4, and which recognizes and binds B7 e.g. CTLA4Ig or soluble CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg. A derivative means any change to the amino acid sequence and/or chemical quality of the amino acid e.g., amino acid analogs.

As used herein, to "regulate" an immune response is to activate, stimulate, up-regulate, inhibit, block, down-regulate or modify the immune response. The cardiovascular diseases described herein, may be treated by regulating an immune response e.g., by regulating functional CTLA4- and/or CD28- positive cell interactions with B7-positive cells. For example, a method for regulating an immune

response comprises contacting the B7-positive cells with a soluble CTLA4 molecule of the invention so as to form soluble CTLA4/B7 complexes, the soluble CTLA4 molecule interfering with reaction of an endogenous CTLA4 and/or CD28 molecule with said B7 molecule.

As used herein, to "block" or "inhibit" a receptor, signal or molecule means to interfere with the activation of the receptor, signal or molecule, as detected by an art-recognized test. For example, blockage of a cell-mediated immune response can be detected by determining reduction of immune disease associated symptoms. Blockage or inhibition may be partial or total.

As used herein, "blocking B7 interaction" means to interfere with the binding of B7 to its ligands, such as CD28 and/or CTLA4, thereby obstructing T-cell and B7-positive cell interactions. Examples of molecules that block B7 interactions with CTLA4 and/or CD28 include, but are not limited to, molecules such as an antibody (or portion or derivative thereof) that recognizes and binds to the any of CTLA4, CD28 or B7 molecules (e.g. B7-1, B7-2); a soluble form (or portion or derivative thereof) of the molecules such as soluble CTLA4; a peptide fragment or other small molecule designed to interfere with the cell signal through the CTLA4/CD28/B7-mediated interaction. In a preferred embodiment, the blocking agent is a soluble CTLA4 molecule, such as CTLA4Ig (ATCC 68629) or L104EA29YIg (ATCC PTA-2104), a soluble CD28 molecule such as CD28Ig (ATCC 68628), a soluble B7 molecule such as B7Ig (ATCC 68627), an anti-B7 monoclonal antibody (e.g. ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341 and monoclonal antibodies as described in by Anderson et al in U.S. Patent 6,113,898 or Yokochi et al., 1982. J. Immun., 128(2)823-827), an anti-CTLA4 monoclonal antibody (e.g. ATCC HB-304, and monoclonal antibodies as described in references 82-83) and/or an anti-CD28 monoclonal antibody (e.g. ATCC HB 11944 and mAb 9.3 as described by Hansen (Hansen et al., 1980. Immunogenetics 10: 247-260) or Martin (Martin et al., 1984. J. Clin. Immun., 4(1):18-22)). Also included are small molecules that block B7 interactions with CTLA4 and/or CD28. Blocking B7 interactions can be detected by art-recognized tests such as determining reduction of immune disease (e.g., cardiovascularic disease) or inflammatory disease associated symptoms, by determining reduction in T-cell/B7-cell interactions, or by determining

reduction in B7 interaction with CTLA4 and/or CD28. Blockage may be partial or total.

As used herein, an "effective amount" of a molecule is defined as an amount that blocks the interaction of the molecule with its ligand. For example, an effective amount of a molecule that blocks B7 interaction with CTLA4 and/or CD28 may be defined as the amount of the molecule that, when bound to B7 molecules on B7-positive cells, inhibit B7 molecules from binding endogenous ligands such as CTLA4 and CD28. Alternatively, an effective amount of a molecule that blocks B7 interaction with CTLA4 and/or CD28 may be defined as the amount of the molecule that, when bound to CTLA4 and/or CD28 molecules on T cells, inhibit B7 molecules from binding endogenous ligands such as CTLA4 and CD28. The inhibition or blockage may be partial or complete.

As used herein, "treating" a disease means to manage a disease by medicinal or other therapies. Treatment of a disease may ameliorate or alleviate the symptoms of a disease, reduce the severity of a disease, alter or prevent the course of disease progression, prevent disease occurrence, and/or ameliorate or alleviate or cure the basic disease problem. Symptoms of cardiovascular disease include, but are not limited to: dysrhythmias; chest pain; myocardial ischemia; angina; reduced exercise tolerance; fatigue; dyspnea on exertion; paroxysmal nocturnal dyspnea, claudication; transient ischemic attacks and quality of life.For example, to treat a cardiovascular disease may be accomplished by regulating an immune response e.g., by regulating functional CTLA4- and/or CD28- positive cell interactions with B7-positive cells. Alternatively, treating a cardiovascualar disease may be accomplished by preventing the disease from occurring or progressing through the use of the compositions described herein.

As used herein, "cardiovascular disease" has the meaning commonly used in the field, and includes, but is not limited to, the following diseases or conditions: thromboembolic disorders, including arterial cardiovascular thromboembolic disorders, venous cardiovascular thromboembolic disorders, and thromboembolic disorders in the chambers of the heart; ahtherosclerosis; restensosis; peripheral arterial disease; coronary bypass grafting surgery; carotid artery disease; arteritis; myocarditis; cardiovascular inflammation; vascular inflammation; coronary heart disease (CHD); unstable angina (UA); unstable refractory angina; stable angina (SA);

chronic stable angina; acute coronary syndrome (ACS); first or recurrent myocardial infarction; acute myocardial infarction (AMI); myocardial infarction; non-Q wave myocardial infarction; non-STE myocardial infarction; coronary artery disease; cardiac ischemia; ischemia; ischemic sudden death; transient ischemic attack; stroke; atherosclerosis; peripheral occlusive arterial disease; venous thrombosis; deep vein thrombosis; thrombophlebitis; arterial embolism; coronary arterial thrombosis; cerebral arterial thrombosis; cerebral embolism; kidney embolism; pulmonary embolism; thrombosis resulting from (a) prosthetic valves or other implants, (b) indwelling catheters, (c) stents, (d) cardiopulmonary bypass, (e) hemodialysis, or (f) other procedures in which blood is exposed to an artificial surface that promotes thrombosis; thrombosis resulting from atherosclerosis, surgery or surgical complications, prolonged immobilization, arterial fibrillation, congenital thrombophilia, cancer, diabetes, effects of medications or hormones, and complications of pregnancy; cardiac arrhytmias including supraventricular arrhythmias, atrial arrhythmias, atrial flutter, atrial fibrillation; other diseases listed in Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 2 Volume Set, 6th Edition, 2001, Eugene Braunwald, Douglas P. Zipes, Peter Libby, Douglas D. Zipes.

Preferred cardiovascular diseases are: atherosclerosis; coronary heart disease (CHD); restensosis; peripheral arterial disease; coronary bypass grafting surgery; carotid artery disease; arteritis; myocarditis; cardiovascular inflammation; vascular inflammation; unstable angina (UA); unstable refractory angina; stable angina (SA); chronic stable angina; acute coronary syndrome (ACS); myocardial infarction; acute myocardial infarction (AMI), including first or recurrent myocardial infarction, non-Q wave myocardial infarction, non-ST elevation myocardial infarction, and ST-segment elevation myocardial infarction.

More preferred cardiovascular diseases are: atherosclerosis; coronary heart disease (CHD); unstable angina (UA); unstable refractory angina; stable angina (SA); chronic stable angina; acute coronary syndrome (ACS); myocardial infarction; acute myocardial infarction (AMI), including first or recurrent myocardial infarction, non-Q wave myocardial infarction, and non-ST-segmentelevation myocardial infarction, and ST-segment elevation myocardial infarction.

As used herein, "gene therapy" is a process to treat a disease by genetic manipulation. Gene therapy involves introducing a nucleic acid molecule into a cell

and the cell expressing a gene product encoded by the nucleic acid molecule. For example, as is well known by those skilled in the art, introducing the nucleic acid molecule into a cell may be performed by introducing an expression vector containing the nucleic acid molecule of interest into cells *ex vivo* or *in vitro* by a variety of methods including, for example, calcium phosphate precipitation, diethyaminoethyl dextran, polyethylene glycol (PEG), electroporation, direct injection, lipofection or viral infection (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989); Kriegler M. *Gene Transfer ad Expression: A Laboratory Manual* (W. H. Freeman and Co, New York, N.Y., 1993) and Wu, *Methods in Enzymology* (Academic Press, New York, 1993), each of which is incorporated herein by reference). Alternatively, nucleotide sequences of interest may be introduced into a cell *in vivo* using a variety of vectors and by a variety of methods including, for example: direct administration of the nucleic acid into a subject (Williams *et al*, 1991 *PNAS* 88:2726-2730); or insertion of the nucleic acid molecule into a viral vector, production of the recombinant virus or viral particle, and infection of the subject with the recombinant virus (Battleman *et al*, 1993 *J Neurosci* 13:94-951; Carroll *et al*, 1993 *J Cell Biochem* 17E:241; Lebkowski *et al*, U.S. Patent 5,354,678; Davison and Elliott, Molecular Virology: A Practical Approach (IRL Press, New York, 1993)). Other methods used for *in vivo* transfer include encapsulation of the nucleic acid into liposomes, and direct introduction of the liposomes, or liposomes combined with a hemagglutinating Sendai virus, into a subject (U.S. Patent 5,824,655, incorporated by reference herein). The transfected or infected cells express the protein products encoded by the nucleic acid in order to ameliorate a disease or the symptoms of a disease.

As used herein, "alleviate" refers to lessening or making less severe, one or more of the symptoms of a disease, such as one or more symptoms of a cardiovascular disease, including, but not limited to: dysrhythmias; chest pain; myocardial ischemia; angina; reduced exercise tolerance; fatigue; dyspnea on exertion; paroxysmal nocturnal dyspnea, claudication; transient ischemic attacks and quality of life.

In order that the invention herein described may be more fully understood the following description is set forth.

COMPOSITIONS AND METHODS OF THE INVENTION

The present invention provides compositions and methods for treating cardiovascular diseases by administering to a subject an effective amount of a molecule that blocks B7 interactions with CTLA4 and/or CD28. For example, such ligands include: soluble CTLA4 molecules (such as CTLA4Ig, CTLA4-E7, CTLA4-p97, CTLA4-env gp120, and mutant CTLA4 molecules such as, CTLA4/CD28Ig, L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg and/or L104EA29WIg), soluble CD28 molecules, soluble B7-1 molecules, soluble B7-2 molecules, and monoclonal antibodies that recognize and bind B7, CD28 and/or CTLA4 (e.g., an anti-CTLA4 monoclonal antibody, an anti-CD28 monoclonal antibody, an anti-B7-1 monoclonal antibody or an anti-B7-2 monoclonal antibody.

An effective amount of a molecule that blocks B7 interaction with CTLA4 and/or CD28 may be defined as the amount of anti-B7 monoclonal antibodies, soluble CTLA4 and/or soluble CD28 molecules that, when bound to B7 molecules on B7-positive cells, inhibit B7 molecules from binding endogenous ligands such as CTLA4 and CD28. The inhibition may be partial or complete.

Alternatively, an effective amount of a molecule that blocks B7 interaction with CTLA4 and/or CD28 may be defined as the amount of anti-CTLA4 monoclonal antibody, anti-CD28 monoclonal antibody or soluble B7 (B7-1 or B7-2) molecules that, when bound to CTLA4 and/or CD28 molecules on T cells, inhibit B7 molecules from binding endogenous ligands such as CTLA4 and CD28. The inhibition may be partial or complete.

An effective amount of a molecule that blocks B7 interaction with CTLA4 and/or CD28 is an amount about 0.1 to 100 mg/kg weight of a subject. In another embodiment, the effective amount is an amount about 0.5 to 100 mg/kg weight of a subject, 0.5 to 5 mg/kg weight of a subject, 0.1 to 5 mg/kg weight of a subject, about 5 to 10 mg/kg weight of a subject, about 10 to 15 mg/kg weight of a subject, about 15 to 20 mg/kg weight of a subject, about 20 to 25 mg/kg weight of a subject, about 25 to 30 mg/kg weight of a subject, about 30 to 35 mg/kg weight of a subject, about 35 to 40 mg/kg weight of a subject, about 40 to 45 mg/kg of a subject, about 45 to 50 mg/kg weight of a subject, about 50 to 55 mg/kg weight of a subject, about 55 to 60 mg/kg weight of a subject, about 60 to 65 mg/kg weight of a subject, about 65 to 70

mg/kg weight of a subject, about 70 to 75 mg/kg weight of a subject, about 75 to 80 mg/kg weight of a subject, about 80 to 85 mg/kg weight of a subject, about 85 to 90 mg/kg weight of a subject, about 90 to 95 mg/kg weight of a subject, or about 95 to 100 mg/kg weight of a subject.

In an embodiment, the effective amount of a molecule that blocks B7 interaction with CTLA4 and/or CD28 is an amount about 2 mg/kg to about 10 mg/kg weight of a subject. The preferred amount is 10 mg/kg weight of a subject. In another embodiment, the effective amount is an amount about 0.1 to 4 mg/kg weight of a subject. In another embodiment the effective amount is an amount about 0.1 to 0.5 mg/kg weight of a subject, about 0.5 to 1.0 mg/kg weight of a subject, about 1.0 to 1.5 mg/kg weight of a subject, about 1.5 to 2.0 mg/kg weight of a subject, about 2.0 to 2.5 mg/kg weight of a subject, about 2.5 to 3.0 mg/kg weight of a subject, about 3.0 to 3.5 mg/kg weight of a subject, about 3.5 to 4.0 mg/kg weight of a subject, about 4.0 to 4.5 mg/kg weight of a subject, about 4.5 to 5.0 mg/kg weight of a subject, about 5.0 to 5.5 mg/kg weight of a subject, about 5.5 to 6.0 mg/kg weight of a subject, about 6.0 to 6.5 mg/kg weight of a subject, about 6.5 to 7.0 mg/kg weight of a subject, about 7.0 to 7.5 mg/kg weight of a subject, about 7.5 to 8.0 mg/kg weight of a subject, about 8.0 to 8.5 mg/kg weight of a subject, about 8.5 to 9.0 mg/kg weight of a subject, about 9.0 to 9.5 mg/kg weight of a subject, about 9.5 to 10.0 mg/kg weight of a subject.

In another embodiment, the effective amount is an amount about 0.1 to 20 mg/kg weight of a subject. In another embodiment, the effective amount is an amount about 0.1 to 2 mg/kg weight of a subject, about 2 to 4 mg/kg weight of a subject, about 4 to 6 mg/kg weight of a subject, about 6 to 8 mg/kg weight of a subject, about 8 to 10 mg/kg weight of a subject, about 10 to 12 mg/kg weight of a subject, about 12 to 14 mg/kg weight of a subject, about 14 to 16 mg/kg weight of a subject, about 16 to 18 mg/kg weight of a subject or about 18 to 20 mg/kg weight of a subject.

In another embodiment, the effective amount is about 2 mg/kg weight of a subject. In yet another embodiment, the effective amount is about 10 mg/kg weight of a subject.

In a specific embodiment, the molecule that blocks B7 interaction with CTLA4 and/or CD28 is a soluble CTLA4 molecule and the effective amount of a

soluble CTLA4 molecule is about 2 mg/kg weight of a subject. In another specific embodiment, the effective amount of a soluble CTLA4 molecule is about 10 mg/kg weight of a subject. In another specific embodiment, an effective amount of a soluble CTLA4 is 500 mg for a subject weighing less than 60 kg, 750 mg for a subject weighing between 60-100 kg, and 1000 mg for a subject weighing more than 100 kg.

An effective amount of the molecule that blocks B7 interaction with CTLA4 and/or CD28 is soluble CTLA4 may be administered to a subject daily, weekly, monthly and/or yearly, in single or multiple times per hour/day/week/month/year, depending on need. For example, in one embodiment, the molecule may initially be administered once every two weeks for a month, and then once every month thereafter.

In a preferred embodiment, the cardiovascular disease is: atherosclerosis; coronary heart disease (CHD); unstable angina (UA); unstable refractory angina; stable angina (SA); chronic stable angina; acute coronary syndrome (ACS); first or recurrent myocardial infarction; acute myocardial infarction (AMI); myocardial infarction; non-Q wave myocardial infarction; or non-STE myocardial infarction.

Herein (Examples 3-7) is presented clinical data supporting the use of molecules that block CD28-B7 interactions in the prevention or treatment of cardiovascular diseases. In clinical studies for RA, CTLA4Ig has lowered CRP, IL-6, and TNF-α, all markers of inflammation that also correlate with cardiovascular diseases. These findings suggest that a novel mechanism of action – blocking the CD28-B7 pathway – may be useful to treat cardiovascular diseases. Further studies are discussed in Examples 8 and 9. We present as our invention methods for treating cardiovascular diseases by administering to a subject an effective amount of a molecule that blocks B7 interactions with CTLA4 and/or CD28.

While some supporting data discussed herein for this new method of treating cardiovascular diseases is derived from the published medical literature, our invention is not diminished. The concept that immunology/inflammation may play a critical role in cardiovascular diseases is a relatively recent and incomplete paradigm shift. The breadth of research across cardiology, immunology, and infectious disease is substantial, so discoveries in one field do not become integrated across the divide of these disciplines. Conversely, once a new discovery is made its implications into treatments and complete mechanisms of actions may not be immediately transparent

to investigators/scientists. Additionally, it has been reported in one study that the dominant T-cell population in patients with USA were $CD4^{+}CD28^{null}$ cells (Ref: Circulation 2000;102:2883-2888). This finding suggests that interference with CD28-B7 mediated signaling would not be efficacious in UA patients.

Inhibition of CD28-B7 interaction, such as by CTLA4Ig or L104EA29YIg, to reduce cardiovascular morbidity and mortality or improve cardiovascular function and quality of life is new. The use of these agents across the spectrum of cardiovascular diseases is supported by: (1) cellular and biochemical similarities between patients with rheumatoid arthritis (RA) and atherosclerosis/unstable angina; (2) the mechanism of action of CTLA4Ig and L104EA29YIg seeming appropriate for intervention in cardiovascular diseases; (3) anti-inflammatory effects of CTLA4Ig and/or L104EA29YIg in animal models and clinical studies presented herein; (4) recently reported finding on the importance of B7-CD28 interaction in atherosclerosis. Much of these data exists in disparate preclinical studies (cellular and animal models), as well as in clinical studies presented herein, and is summarized below.

(1) Cellular and biochemical similarities between patients with rheumatoid arthritis and atherosclerosis/unstable angina

There are biochemical and cellular similarities between these two pathological processes (Table 1). Additionally, the premature deaths of patients with RA have been recently linked to acute coronary syndromes (Refs: J Rheumatology 1999;26:2562-2571; Rheumatology 1999;38:668-674).

TABLE 1

Biochemical and Cellular Similarities Between Rheumatoid Arthritis and Atherosclerosis/Unstable Angina

	Atherosclerosis/ Unstable Angina	Rheumatoid Arthritis
Biochemical Similarities		
Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)	↑	↑
Metalloproteinase expression	↑	↑
Interleukin-6 (IL-6)	↑	↑
C-reactive Protein (CRP)	↑	↑↑
Adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, P-selectin)	↑	↑

	Atherosclerosis/ Unstable Angina	Rheumatoid Arthritis
Endothelin	↑	↑
Cellular Similarities		
Mast-cell activation	↑	↑
T-cell activation	↑	↑
B-cell activation	0 or ↑	0 or ↑
Possible Antigens		
Heat shock proteins (HSPs)	Reported	Reported
Infections agents	Reported	Reported
Oxidized-LDL	Reported	
Collagen II		Reported
Cartilage antigens		Reported

Notes: Adapted from Paceri and Teh, (Ref: Circulation 1999;100:2124-2126). The symbols 0 denote no appreciable increase or decrease in parameter from control populations; ↑ denotes increase in parameter from control populations; Reported denotes presence of supporting evidence available in the medical literature.

These similarities suggest that there may be common pathophysiological processes underlying each of these diseases.

(2) The mechanisms of action of CTLA4Ig and L104EA29YIg seem appropriate for intervention in cardiovascular diseases

T-cells are present in early atheroma as well as vulnerable/ruptured plaques

There are lines of evidence that support the notion that T-cell activation is important across the spectrum of cardiovascular diseases from atherosclerosis to acute plaque rupture. T-cells are among the most common cells present in human atherosclerotic lesions (Ref: New Engl J Med 1999; 340:115-126) and are present in both early lesions and in vulnerable or ruptured plaques. Pathological studies of vulnerable or ruptured plaques have shown that T-cells (mostly $CD4^+$) are present and located in the shoulder region of the atheromatous lesion - the most likely site of tissue erosion (Refs: Am. J. Cardiol. 1991;68:36B-50B. Circulation 1994;89:36-44).

Cytokines elaborated by T-cells are poised to promote inflammation and plaque rupture

T- cells are known to secrete inflammatory cytokines including interferon-γ (IFN-γ); TNFα, and interleukin-2 (IL-2) (Refs: Atherosclerosis 1986;6:131-138. J Clin Invest 1985;76:125-131). The actions of T-cells in atheromatous plaques are thought to be two-fold. First, T-cells can regulate the actions of macrophages that in turn are thought to release digestive enzymes, disrupt the covering matrix and smooth muscle layer, and promote plaque rupture. Secondly, T-cells can directly produce a reduction of collagen synthesis in the fibrous caps of atheroma by secreting IFN-γ to vascular smooth muscle cells. Collectively, these T-cell activities are thought to represent a coordinated process that promotes atheromatous plaque instability and rupture.

Within atheroma, T-cells are activated in situ to a degree that parallels the severity of clinical symptoms

T-cells are not only present in atheroma, but there is also evidence for their *in situ* activation within these lesions. In a study of T-cell activation in coronary atheroma, van der Wal *et. al.* has shown from atherectomy specimens that T-cells are activated as evidenced by IL-2 receptor (IL-2r) expression and IL-2 secretion (Ref: Heart 1998;80:14-18). The increase in T-cell expression of IL-2r in this study was in proportion to the severity of clinical symptoms of patients undergoing atherectomy. Figure 87 shows the percentage of activated T-cells in atherectomy specimens.

HSP60 or other novel antigens may directly promote cardiovascular inflammation

Studies have suggested a possible link between infectious agents and the establishment of cardiovascular diseases. A number of infectious agents have been suggested including, *Chlamydia pneumoniae (Cp), Helicobacter pylori*, cytomegalovirus (CMV), adenoviruses, coxsackieviruses, several Herpesviridae, and a variety of dental infections have been liked to CHD. The evidence substantiating causality among these agents with respect to coronary atherosclerosis, however, varies widely. *C. pneumoniae*, a human respiratory pathogen, has most often been found in association with CHD.

The role of persistent elevation of CRP, and presence of antibodies to *C. pneumoniae* (Cp) or antibodies to human HSP60 (hu-HSP60) has been investigated in a nested case-control study of the Helsinki Heart Study (Ref: Circulation

2003;107:2566-2570). This study, a prospective double-blinded placebo-controlled primary prevention trial, randomized 4081 subjects and observed 241 coronary events (coronary death or non-fatal MI) over a 8.5-year follow-up. The importance of persistent seropositivity (as defined by an elevation of CRP, serum antibodies to Cp or serum antibodies to hu-HSP60 at both baseline and 3 to 6 months prior to the index coronary event) for the prediction of subsequent coronary events was investigated (Table 2).

TABLE 2

Odds Ratios (OR) for the Development of Coronary Death or Non-fatal MI with Persistence of Risk Factors in the Helsinki Heart Study

	Unadjusted OR (95%CI)	Adjusted OR (95%CI)
CRP-		
Cp-	1	1
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-		
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)
hu-HSP60+	6.06 (2.23 – 16.47)	4.36 (1.53 – 12.39)

These data indicate that in a population of middle-aged males with no known coronary heart disease, persistently elevated seropositivity for Cp or hu-HSP60 when present with an elevated CRP, predicted subsequent coronary events (Table 2). Of note, patients who were persistently CRP+, Cp+, and hu-HSP60+ had an adjusted OR of 16.87 (2.06 – 137.9) for the development of subsequent coronary events. Only 1/138 control patients met this criteria for a persistent elevation in all 3 markers, whereas 17 were identified in index cases. These findings suggest the presence of novel antigenic risk factors for the prospective identification of individuals at risk of developing cardiovascular events.

A separate recent study, reported that chlamydial heat shock protein 60 (Cp-HSP60) is strongly associated with ACS (Ref: Biasucci, *et. al.*Circulation 2003;107:3015-3017). Unlike the asymptomatic patients in the Helsinki Heart Study, this study investigated patients at the other end of the CHD spectrum. In this study, 219 patients admitted to a Coronary Care Unit (CCU) with either UA (Braunwald Class IIIb) or AMI were compared to healthy patients or patients with stable angina (SA). The presence of an antibody response in patients to Cp-HSP60 (anti-Cp-HSP60) was measured in 100 control subjects, 40 subjects with SA, 179 subjects with UA, and 40 subjects with AMI (Table 3).

TABLE 3

Serological Characteristics of Study Population as Reported by Biasucci, *et.al.*

	Control Subjects (N = 100)	Stable Angina Patients (N = 40)	Unstable Angina Patients (N = 179)	AMI Patients (N = 40)
Cp seropositivity	30%	60%	68%	65%
HSP60 seropositivity	0%	20%	98%	99%
CRP > 3 mg/dL	8%	25%	59%	62%
Median CRP, mg/dL	1.4	2.1	5.05	6.02

Note: The antibody used for HSP60 seropositivity determination in this study does not discriminate between Cp-HSP60 and hu-HSP60. Because of this lack of specificity these data do not support a direct association between anti-HSP60 response and infection.

The above findings are supportive of the notion that a specific antigenic response exists in patients with UA and AMI. These two studies represent extremes of patient populations in the spectrum of cardiovascular disease. The Helsinki Heart Study shows that patients without history of coronary heart (or other major) diseases could be identified as having an increased risk of coronary death or non-fatal MI based upon CRP elevation and a persistent antibody response to Cp or hu-HSP60. The prevalence of these risk factors in a healthy primary prevention population, however, was low. In stark contrast, patients in the study by Biasucci, *et. al.* indicates that HSP60 seropositivity is nearly universal in patients with UA or AMI. In addition, the presence of 20% seropositivity to HSP60 in patients with stable angina

suggests that a graded relationship may exist between the presence of antibodies to HSP-60 and cardiovascular events.

Antigenic response to HSP60 is mediated through CD28-B7 interactions

In animal models, macrophages (a common cell type in human atheroma) have been identified as the main inducer of IFN-γ in T-cells upon administration of either mouse or hu-HSP60 (Ref: Int. Immunol. 2002;14:1247-1253). This process appears to occur through a classic "two-signal" model for T-cell activation involving CD28-B7 pathways. In this model, the activation of T-cells by either murine or hu-HSP60 is blocked by administration of CTLA4Ig (Ref: Int. Immunol. 2002;14:1247-1253). Given the high sequence homologies between human, murine, chlamydial and bacterial heat shock proteins, this finding may be conserved across species. In fact, it may be this high homology between the HSPs of infectious agents and hu-HSPs that may serve to promote autoimmunity through molecular mimicry.

HSP60 signaling through CD28-B7 may afford an opportunity for intervention in human disease

There appears to be a number of similarities between preclinical models surrounding HSP60 and that aforementioned clinical trials (Helsinki Heart Study; Biasucci, *et. al.*). First, murine models have shown that the strongest autoimmune response (i.e., T-cell proliferation and antibody production to self HSP60) are achieved only by concurrent administration of both murine (self) HSP60 and Cp-HSP60 (Ref: Infection and Immunity 1997;65:1669-1674). This preclinical finding in a unrelated animal model is very similar to the observed finding in the highest risk group in the Helsinki Heart Study. Of note, Cp-HSP60 and hu-HSP60 co-localization within in human atheromatous plaques has been reported (Refs: Circulation 1998;98:300-307. J Infect Dis 1997:176:292-295). In these plaques, HSP60s may subsequently regulate TNF-α, matrix metalloproteinase expression, and activate endothelium and smooth muscle cells (Ref: Circulation 2003;107:3015-3017). In addition, co-administration of both murine HSP60 and Cp-HSP60 in this animal model results in a 6-fold decline in lymphocyte IL-10 production and a 12-fold increase in the ratio of IFN-γ/IL-10 production. The coincident decline in IL-10 levels may translate into a clinically meaningful observations as low serum IL-10

concentrations have been associated with a concentration-dependent risk of death following AMI (Ref: Heeschen, *et. al.* Circulation 2003; 107:2109-2114). Given the parallels between these animal studies and data from clinical trials, inhibition of CD28-B7 signaling through the use of CTLA4Ig or L104EA29YIg may represent a specific mechanistically rational intervention for prevention and/or treatment of cardiovascular disease.

Use of CTLA4Ig or L104EA29YIg for prevention and/or treatment of cardiovascular disease may not be limited to HSP60

HSP60 serves as a hypothetical model for the mechanistic rationale of CTLA4Ig or L104EA29YIg in the prevention and/or treatment of cardiovascular disease. HSP60 however, does not represent the sole antigenic stimulation that may be interrupted by CTLA4Ig or L104EA29YIg treatment. For example, recent epidemiological evidence from the Women's Health Study (Ref: Circulation 2001;104:2266-2268) and the observational data from the CAPTURE study (Ref: NEJM 2003;348:1104-1111) have independently demonstrated the existence of a graded and continuous rise in cardiovascular risk (death or nonfatal myocardial infarction) based upon serum sCD40L levels. Consequently, CD40-CD40L interactions are becoming recognized as important mediators of inflammation in cardiovascular disease. There is also evidence that suggests interactions between the CD28-B7 pathways and CD40-CD40L pathways in patients with unstable angina. Specifically, it has been shown that CD40L expressing (CD40L+) T-cells are present in atheromatous lesions (Ref: Proc. Natl. Acad. Sci. 1997;94:1931-1936). *In vitro* ligation of CD40 on atheroma-associated cells has been shown to increase the production of pro-inflammatory cytokines, matrix metalloproteinases, adhesion molecules, and tissue factor (Ref: Nature 1998;394:200-203). In other model systems, CD40 interaction with CD40L on antigen presenting cells (APC) increases expression of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) - the stimulatory molecules for CD28-mediated T-cell activation (J. Immunol. 2000;165:3506-3518). In addition, *ex-vivo* treatment of T-cells from patients with unstable angina using stimulatory antibodies against CD3 and CD28 stimulates the release of sCD40L (Ref: Circulation 1999;100:614-620). Together, these observations may suggest that CD28-B7 and CD40-CD40L signaling pathways may collectively work to promote conditions that

predispose to atherosclerotic plaque progression and rupture. Furthermore, interference with this process through use of CTLA4Ig or L104EA29YIg may be therapeutically beneficial. Finally, other, yet undiscovered, CD28-B7-mediated processes (perhaps via novel ischemia-related antigens, see below) may have important roles in cardiovascular disease; use of CTLA4Ig or L104EA29YIg in these process may be clinically useful.

(3) Anti-inflammatory effects of CTLA4Ig and/or L104EA29YIg in animal models and clinical studies

Inhibition of CD28-B7 signaling in animal models of renal ischemia suggests that novel self antigens are important in ischemia

The effects of CTLA4Ig on inhibition of ischemia/reperfusion injury has been evaluated in a rat model (Ref: J Clin Invest 1997;100:1199-1203). In this model, rats underwent a unilateral nephrectomy and the contralateral kidney was rendered ischemic for 45 minutes. Coadministration of CTLA4Ig, but not control immunoglobulin, largely blocked the infiltration of CD4+ T-cells, macrophages, and major histocompatability (MHC) II cells into the ischemic kidney. Coincident with this finding, was a reduction of inflammatory "Th1" cytokines (IL-2, IFN-γ, IL2r), macrophage-associated cytokines (TNF-α. IL-6, and inducible nitric oxide synthetase), and chemoattractants/growth factors (MCP-1, RANTES, TGFβ). In addition to these findings, CTLA4Ig almost completely abrogates early (i.e., elevations of plasma creatinine) or late (i.e., urine protein measurements) renal dysfunction. What is particularly striking about this observation is the ability of CTLA4Ig to inhibit this process in a model that is devoid of alloantigen. Alternatively stated, inhibition of CD28-B7 interactions in a non-transplant model of renal ischemia is afforded by CTLA4Ig administration and suggests that novel self-antigens that act through CD28-B7 pathways are important in ischemic injury. Efficacy in this animal model is supportive of a role for the use of CTLA4Ig in models of coronary ischemia that likely has some parallel physiology.

Anti-inflammatory aspects of CTLA4Ig and L104EA29YIg are consistent with their use in the prevention and/or treatment of CV disease

Data presented herein (Examples 3-7) for the clinical development of CTLA4Ig and L104EA29Ig in patients with RA are encouraging with respect to favorable alterations in inflammatory markers. It is noteworthy that patients with RA and patients with atherosclerosis or UA have a number of biochemical, cellular, and antigenic similarities (see above, Table 1). In the phase II clinical development program in RA several markers of inflammation (CRP, IL-6, TNF-α) that are shared in patients with UA were measured. In patients with RA, administration of CTLA4Ig at either 2 mg/kg or 10 mg/kg resulted in a dose-dependent decline in CRP, IL-6, TNF-α at 180 days as compared with placebo. See Figures 52, 55, and 56. This effect appears to be durable and was shown to persist throughout 360 days treatment with CTLA4Ig . See Figures 85, 86A, and 86B.

Further studies are discussed in Examples 8 and 9.

(4) Newly reported findings on the importance of B7-CD28 interactions in atherosclerosis

Since the filing of the patent application to which this patent application claims priority, two reports have appeared in the scientific literature that strongly support the role of CD28-B7 interactions in the development, progression, and instability of atheromatous lesions. First, Buono, *et. al. (Circulation 2004; 109:2009-2015)* characterized the development and progression of atheromatous lesions and plaque-antigen-specific T-cell responses in a low-density lipoprotein receptor (LDLR)-deficient (*Ldlr*$^{-/-}$) murine model. *Ldlr*$^{-/-}$ mice develop accelerated atherosclerosis when fed a cholesterol-enriched diet. In this study, *Ldlr*$^{-/-}$ mice were crossbred with B7-1$^{-/-}$B7-2$^{-/-}$ mice and the progeny were then intercrossed to generate a compound mutant B7-1$^{-/-}$B7-2$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$ line that is completely devoid of CD80 and CD86. This unique model allowed for investigation of the role of B7-CD28 interactions in an animal model prone to develop atherosclerosis. As expected, when these animals were fed a cholesterol enriched diet, both the *Ldlr*$^{-/-}$ and the B7-1$^{-/-}$B7-2$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$ mice had significantly elevated cholesterol as compared to *Ldlr*$^{-/-}$ mice fed a control diet. Importantly, however, there were no differences observed between the cholesterol levels in the *Ldlr*$^{-/-}$ mice fed a cholerterol enriched diet as compared with the B7-1$^{-/-}$B7-2$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$ mice fed a cholesterol enriched diet. Atherosclerotic lesions

in these mice were quantitated from the aortic arch and descending aorta using computerized image analysis from each of the 3 groups. At 8 weeks, there was minimal atherosclerosis in *Ldlr*$^{-/-}$ mice receiving the control diet. *Ldlr*$^{-/-}$ mice receiving a cholesterol enriched diet, however, had a marked increase in atherosclerotic lesisons in both the aortic arch and descending aorta. In contrast, B7-1$^{-/-}$B7-2$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$ mice receiving a cholesterol enriched diet had a significant reduction of atherosclerotic lesions as compared to *Ldlr*$^{-/-}$ mice receiving a cholesterol enriched diet. After 20 weeks, there was progression of atherosclerosis in all 3 treatment groups and the magnitude of difference observed bewteen the *Ldlr*$^{-/-}$ mice and the B7-1$^{-/-}$B7-2$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$ mice was somewhat diminished. Nonetheless, a statistically significant reduction in atherosclerosis between the *Ldlr*$^{-/-}$ mice and the B7-1$^{-/-}$B7-2$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$ mice in the aortic arch persisted at 20 weeks.

In addition to these morphological observations, there also appears to be functional differences between T-cells from *Ldlr*$^{-/-}$ mice and B7-1$^{-/-}$B7-2$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$ mice. Specifically, *ex-vivo* assays of CD4+ T-cells from *Ldlr*$^{-/-}$ mice and B7-1$^{-/-}$B7-2$^{-/-}$

Ldlr$^{-/-}$ mice demonstrate that only *Ldlr*$^{-/-}$ mice fed a cholesterol enriched diet produced substantial (~5-fold higher) amounts of IFN-γ when stimulated with mHSP60. This finding suggests that under conditions of hypercholesterolemia and atherosclerosis, T-cells from *Ldlr*$^{-/-}$ mice were primed to respond to self-HSP60.

In a second publication, Afek *et. al. (Experimental and Molecular Pathology 2004; 76:219-223)* utilize immunohistochemical methods to characterize the expression of CD80 and CD86 within atheroma of apolioprotein E knockout (ApoE$^{-/-}$) mice. ApoE$^{-/-}$ mice develop atherosclerosis according to their maturation age. These investigators evaluated the presence of CD80 and CD86 within atheromatous lesions at various stages of maturation. In this model, CD80 and CD86 positive immunostaining was present in both early and more advanced atheromatous lesions. Moreover, CD80 and CD86 staining was found to be colocalized with oxidized LDL – a putative autoantigen for T-cell activation.

Collectively, these two literature reports support and extend the material previously presented in the priority patent application. First, the notion that T-cells are present in atheroma and are activiated *in* situ is strengthed by the finding of CD80 and CD86 colocalization within both early and advanced atheroma. Second, the data

obtained from the B7-1$^{-/-}$B7-2$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$ mice clearly and elegantly demonstrate that interruption of B7-CD28 signaling influences the development and progression of atherosclerotic disease in a well accepted model of atherosclerosis. Finally, the observation that *ex-vivo* stimulation of CD4+ T-cells from mHSP60 results in substantial IFN-γ production supports the prior hypothesis that HSP60 serve as a novel antigen to promote cardiovascular inflammation and plaque instability (i.e., through the effects of IFN-γ on matrix metalloproteinases and collagen synthesis) through B7-CD28-dependent processes.

Compositions

The present invention provides compositions for treating cardiovascular diseases comprising molecules that block B7 interactions with CTLA4 and/or CD28, such as soluble CTLA4 molecules. Examples of soluble CTLA4 include CTLA4Ig (Figure 24) and soluble CTLA4 mutant molecules such as L104EA29YIg (Figure 19), L104EA29LIg (Figure 20), L104EA29Tig (Figure 21), and L104EA29WIg (Figure 22).

CTLA4 molecules, with mutant or wildtype sequences, may be rendered soluble by deleting the CTLA4 transmembrane segment (Oaks, M. K., et al., 2000 *Cellular Immunology* 201:144-153).

Alternatively, soluble CTLA4 molecules, with mutant or wildtype sequences, may be fusion proteins, wherein the CTLA4 molecules are fused to non-CTLA4 moieties such as immunoglobulin (Ig) molecules that render the CTLA4 molecules soluble. For example, a CTLA4 fusion protein may include the extracellular domain of CTLA4 fused to an immunoglobulin constant domain, resulting in a CTLA4Ig molecule (Figure 24) (Linsley, P. S., et al., 1994 *Immunity* 1:793-80). Examples of immunoglobulin domains that may be fused to CTLA4 include, but are not limited to IgCγ1 (IgCgamma1), IgCγ2 (IgCgamma2), IgCγ3 (IgCgamma3), IgCγ4 (IgCgamma4), IgCμ (IgCmu), IgCα1 (IgCalpha1), IgCα2 (IgCalpha2), IgCδ (IgCdelta) or IgCε (IgCepsilon).

For clinical protocols, it is preferred that the immunoglobulin moiety does not elicit a detrimental immune response in a subject. The preferred moiety is the immunoglobulin constant region, including the human or monkey immunoglobulin constant regions. One example of a suitable immunoglobulin region is human Cγ1,

including the hinge, CH2 and CH3 regions which can mediate effector functions such as binding to Fc receptors, mediating complement-dependent cytotoxicity (CDC), or mediate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The immunoglobulin moiety may have one or more mutations therein, (e.g., in the CH2 domain, to reduce effector functions such as CDC or ADCC) where the mutation modulates the binding capability of the immunoglobulin to its ligand, by increasing or decreasing the binding capability of the immunoglobulin to Fc receptors. For example, mutations in the immunoglobulin moiety may include changes in any or all its cysteine residues within the hinge domain, for example, the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine (Figure 24). The immunoglobulin moiety may also include the proline at position +148 substituted with a serine, as shown in Figure 24. Further, the mutations in the immunoglobulin moiety may include having the leucine at position +144 substituted with phenylalanine, leucine at position +145 substituted with glutamic acid, or glycine at position +147 substituted with alanine.

Additional non-CTLA4 moieties for use in the soluble CTLA4 molecules or soluble CTLA4 mutant molecules include, but are not limited to, p97 molecule, env gp120 molecule, E7 molecule, and ova molecule (Dash, B. et al. 1994 *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 6):1389-97; Ikeda, T., et al. 1994 *Gene* 138(1-2):193-6; Falk, K., et al. 1993 *Cell. Immunol.* 150(2):447-52; Fujisaka, K. et al. 1994 *Virology* 204(2):789-93). Other molecules are also possible (Gerard, C. et al. 1994 *Neuroscience* 62(3):721; Byrn, R. et al. 1989 63(10):4370; Smith, D. et al. 1987 *Science* 238:1704; Lasky, L. 1996 *Science* 233:209).

The soluble CTLA4 molecule of the invention can include a signal peptide sequence linked to the N-terminal end of the extracellular domain of the CTLA4 portion of the molecule. The signal peptide can be any sequence that will permit secretion of the molecule, including the signal peptide from oncostatin M (Malik, et al., (1989) *Molec. Cell. Biol.* 9: 2847-2853), or CD5 (Jones, N. H. et al., (1986) *Nature* 323:346-349), or the signal peptide from any extracellular protein. The soluble CTLA4 molecule of the invention can include the oncostatin M signal peptide linked at the N-terminal end of the extracellular domain of CTLA4, and the human immunoglobulin molecule (e.g., hinge, CH2 and CH3) linked to the C-terminal end of the extracellular domain (wildtype or mutated) of CTLA4. This molecule includes

the oncostatin M signal peptide encompassing an amino acid sequence having methionine at position -26 through alanine at position -1, the CTLA4 portion encompassing an amino acid sequence having methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and the immunoglobulin portion encompassing an amino acid sequence having glutamic acid at position +126 through lysine at position +357.

Specifically, the soluble CTLA4 mutant molecules of the invention, comprising the mutated CTLA4 sequences described *infra*, can be fusion molecules comprising human Ig, e.g., IgC(gamma)1 (i.e. IgCγ1) moieties fused to the mutated CTLA4 fragments.

In one embodiment, the soluble CTLA4 mutant molecules comprise IgCγ1 (IgCgamma1) fused to an extracellular domain of CTLA4 comprising a single-site mutation in the extracellular domain. The extracellular domain of CTLA4 comprises methionine at position +1 through aspartic acid at position +124 (e.g., Figure 23). The extracellular domain of the CTLA4 can comprise alanine at position –1 through aspartic acid at position +124 (e.g., Figure 23). Examples of single-site mutations include the following wherein the leucine at position +104 is changed to any other amino acid:

Single-site mutant	Codon change
L104EIg	Glutamic acid GAG
L104SIg	Serine AGT
L104TIg	Threonine ACG
L104AIg	Alanine GCG
L104WIg	Tryptophan TGG
L104QIg	Glutamine CAG
L104KIg	Lysine AAG
L104RIg	Arginine CGG
L104GIg	Glycine GGG

Further, the invention provides mutant molecules having the extracellular domain of CTLA4 with two mutations, fused to an Ig Cγ1 (IgCgamma1) moiety. Examples include the following wherein the leucine at position +104 is changed to another amino acid (e.g. glutamic acid) and the glycine at position +105, the serine at position +25, the threonine at position +30 or the alanine at position +29 is changed to any other amino acid:

Double-site mutants	Codon change
L104EG105FIg	Phenylalanine TTC
L104EG105WIg	Tryptophan TGG
L104EG105LIg	Leucine CTT
L104ES25RIg	Arginine CGG
L104ET30GIg	Glycine GGG
L104ET30NIg	Asparagine AAT
L104EA29YIg	Tyrosine TAT
L104EA29LIg	Leucine TTG
L104EA29TIg	Threonine ACT
L104EA29WIg	Tryptophan TGG

Further still, the invention provides mutant molecules having the extracellular domain of CTLA4 comprising three mutations, fused to an IgCγ1 (IgCgamma1) moiety. Examples include the following wherein the leucine at position +104 is changed to another amino acid (e.g. glutamic acid), the alanine at position +29 is changed to another amino acid (e.g. tyrosine) and the serine at position +25 is changed to another amino acid:

Triple-site Mutants	Codon changes
L104EA29YS25KIg	Lysine AAA
L104EA29YS25KIg	Lysine AAG
L104EA29YS25NIg	Asparagine AAC
L104EA29YS25RIg	Arginine CGG

Soluble CTLA4 mutant molecules may have a junction amino acid residue which is located between the CTLA4 portion and the Ig portion of the molecule. The junction amino acid can be any amino acid, including glutamine. The junction amino acid can be introduced by molecular or chemical synthesis methods known in the art.

The soluble CTLA4 proteins of the invention, and fragments thereof, can be generated by chemical synthesis methods. The principles of solid phase chemical synthesis of polypeptides are well known in the art and may be found in general texts relating to this area (Dugas, H. and Penney, C. 1981 *Bioorganic Chemistry*, pp 54-92, Springer-Verlag, New York). The soluble CTLA4 proteins may be synthesized by solid-phase methodology utilizing an Applied Biosystems 430A peptide synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) and synthesis cycles supplied by Applied Biosystems. Protected amino acids, such as t-butoxycarbonyl-protected

amino acids, and other reagents are commercially available from many chemical supply houses.

The present invention provides CTLA4 mutant molecules including a signal peptide sequence linked to the N-terminal end of the extracellular domain of the CTLA4 portion of the mutant molecule. The signal peptide can be any sequence that will permit secretion of the mutant molecule, including the signal peptide from oncostatin M (Malik, et al., 1989 *Molec. Cell. Biol.* 9: 2847-2853), or CD5 (Jones, N. H. et al., 1986 *Nature* 323:346-349), or the signal peptide from any extracellular protein.

The invention provides soluble CTLA4 mutant molecules comprising a single-site mutation in the extracellular domain of CTLA4 such as L104EIg (as included in Figure 18) or L104SIg, wherein L104EIg and L104SIg are mutated in their CTLA4 sequences so that leucine at position +104 is substituted with glutamic acid or serine, respectively. The single-site mutant molecules further include CTLA4 portions encompassing methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and an immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357. The immunoglobulin portion of the mutant molecule may also be mutated so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine, and the proline at position +148 is substituted with serine. Alternatively, the single-site soluble CTLA4 mutant molecule may have a CTLA4 portion encompassing alanine at position -1 through aspartic acid at position +124.

The invention provides soluble CTLA4 mutant molecules comprising a double-site mutation in the extracellular domain of CTLA4, such as L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg or L104EA29WIg, wherein leucine at position +104 is substituted with a glutamic acid and alanine at position +29 is changed to tyrosine, leucine, threonine and tryptophan, respectively. The sequences for L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg and L104EA29WIg, starting at methionine at position +1 and ending with lysine at position +357, plus a signal (leader) peptide sequence are shown in Figures 19-22 respectively. The double-site mutant molecules further comprise CTLA4 portions encompassing methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and an immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through

lysine at position +357. The immunoglobulin portion of the mutant molecule may also be mutated, so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine, and the proline at position +148 is substituted with serine. Alternatively, these mutant molecules can have a CTLA4 portion encompassing alanine at position -1 through aspartic acid at position +124.

The invention provides soluble CTLA4 mutant molecules comprising a double-site mutation in the extracellular domain of CTLA4, such as L104EG105FIg, L104EG105WIg and L104EG105LIg, wherein leucine at position +104 is substituted with a glutamic acid and glycine at position +105 is substituted with phenylalanine, tryptophan and leucine, respectively. The double-site mutant molecules further comprise CTLA4 portions encompassing methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and an immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357. The immunoglobulin portion of the may also be mutated, so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine, and the proline at position +148 is substituted with serine. Alternatively, these mutant molecules can have a CTLA4 portion encompassing alanine at position -1 through aspartic acid at position +124.

The invention provides L104ES25RIg which is a double-site mutant molecule comprising a CTLA4 portion encompassing methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and the immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357. The portion having the extracellular domain of CTLA4 is mutated so that serine at position +25 is substituted with arginine, and leucine at position +104 is substituted with glutamic acid. Alternatively, L104ES25RIg can have a CTLA4 portion encompassing alanine at position -1 through aspartic acid at position +124.

The invention provides soluble CTLA4 mutant molecules comprising a double-site mutation in the extracellular domain of CTLA4, such as L104ET30GIg and L104ET30NIg, wherein leucine at position +104 is substituted with a glutamic acid and threonine at position +30 is substituted with glycine and asparagine, respectively. The double-site mutant molecules further comprise CTLA4 portions encompassing methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a

junction amino acid residue glutamine at position +125, and an immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357. The immunoglobulin portion of the mutant molecule may also be mutated, so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine, and the proline at position +148 is substituted with serine. Alternatively, these mutant molecules can have a CTLA4 portion encompassing alanine at position -1 through aspartic acid at position +124.

The invention provides soluble CTLA4 mutant molecules comprising a triple-site mutation in the extracellular domain of CTLA4, such as L104EA29YS25KIg, L104EA29YS25NIg, L104EA29YS25RIg, wherein leucine at position +104 is substituted with a glutamic acid, alanine at position +29 is substituted with tyrosine, and serine at position +25 is substituted with lysine, asparagine and arginine, respectively. The triple-site mutant molecules further comprise CTLA4 portions encompassing methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and an immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357. The immunoglobulin portion of the mutant molecule may also be mutated, so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine, and the proline at position +148 is substituted with serine. Alternatively, these mutant molecules can have a CTLA4 portion encompassing alanine at position -1 through aspartic acid at position +124.

Additional embodiments of soluble CTLA4 mutant molecules include chimeric CTLA4/CD28 homologue mutant molecules that bind a B7 (Peach, R. J., *et al.*, 1994 *J Exp Med* 180:2049-2058). Examples of these chimeric CTLA4/CD28 mutant molecules include HS1, HS2, HS3, HS4, HS5, HS6, HS4A, HS4B, HS7, HS8, HS9, HS10, HS11, HS12, HS13 and HS14 (U.S. patent number 5,773,253)

Preferred embodiments of the invention are soluble CTLA4 molecules such as CTLA4Ig (as shown in Figure 24, starting at methionine at position +1 and ending at lysine at position +357) and soluble CTLA4 mutant L104EA29YIg (as shown in Figure 19, starting at methionine at position +1 and ending at lysine at position +357).

The invention further provides nucleic acid molecules comprising nucleotide sequences encoding the amino acid sequences corresponding to the soluble CTLA4 molecules of the invention. In one embodiment, the nucleic acid molecule is a DNA

(e.g., cDNA) or a hybrid thereof. For example, a CTLA4Ig molecule can comprise a GCT or GCC codon, encoding alanine, at nucleotide position +49 to +51 as shown in Figure 24. In another example, a CTLA4Ig molecule can comprise a GGT or GGG codon, encoding glycine, at nucleotide position +436 to +438 as shown in Figure 24. In yet another example, a CTLA4Ig molecule can comprise a CGG or CGT codon, encoding arginine, at nucleotide position +631 to +633 as shown in Figure 24. DNA encoding CTLA4Ig (Figure 24) was deposited on May 31, 1991with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 and has been accorded ATCC accession number ATCC 68629. DNA encoding L104EA29YIg (sequence included in Figure 19) was deposited on June 19, 2000 with ATCC and has been accorded ATCC accession number PTA-2104. Alternatively, the nucleic acid molecules are RNA or a hybrid thereof.

The nucleic acid molecules of the invention also include derivative nucleic acid molecules which differ from DNA or RNA molecules, and anti-sense molecules. Derivative molecules include peptide nucleic acids (PNAs), and non-nucleic acid molecules including phosphorothioate, phosphotriester, phosphoramidate, and methylphosphonate molecules, that bind to single-stranded DNA or RNA in a base pair-dependent manner (Zamecnik, P. C., et al., 1978 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:280284; Goodchild, P. C., et al., 1986 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:4143-4146). Peptide nucleic acid molecules comprise a nucleic acid oligomer to which an amino acid residue, such as lysine, and an amino group have been added. These small molecules, also designated anti-gene agents, stop transcript elongation by binding to their complementary (template) strand of nucleic acid (Nielsen, P. E., et al., 1993 *Anticancer Drug Des* 8:53-63). Reviews of methods for synthesis of DNA, RNA, and their analogues can be found in: *Oligonucleotides and Analogues*, eds. F. Eckstein, 1991, IRL Press, New York; *Oligonucleotide Synthesis*, ed. M. J. Gait, 1984, IRL Press, Oxford, England. Additionally, methods for antisense RNA technology are described in U. S. patents 5,194,428 and 5,110,802. A skilled artisan can readily obtain these classes of nucleic acid molecules using the herein described soluble CTLA4 polynucleotide sequences, see for example *Innovative and Perspectives in Solid Phase Synthesis* (1992) Egholm, et al. pp 325-328 or U. S. Patent No. 5,539,082.

Additionally, the invention provides a vector, which comprises the nucleotide sequences of the invention. The term vector includes, but is not limited to, plasmids, cosmids, and phagemids. In one embodiment, the vector can be an autonomously replicating vector comprising a replicon that directs the replication of the rDNA within the appropriate host cell. Alternatively, the vector can direct integration of the recombinant vector into the host cell. Various viral vectors may also be used, such as, for example, a number of well known retroviral and adenoviral vectors (Berkner 1988 *Biotechniques* 6:616-629).

The vectors can permit expression of the soluble CTLA4 transcript or polypeptide sequences in prokaryotic or eukaryotic host cells. The vectors include expression vectors, comprising an expression control element, such as a promoter sequence, which enables transcription of the inserted soluble CTLA4 nucleic acid sequences and can be used for regulating the expression (e.g., transcription and/or translation) of an operably linked soluble CTLA4 sequence in an appropriate host cell. Expression control elements are known in the art and include, but are not limited to, inducible promoters, constitutive promoters, secretion signals, enhancers, transcription terminators, and other transcriptional regulatory elements. Other expression control elements that are involved in translation are known in the art, and include the Shine-Dalgarno sequence (e.g., prokaryotic host cells), and initiation and termination codons.

Specific initiation signals may also be required for efficient translation of a soluble CTLA4 sequence. These signals include the ATG-initiation codon and adjacent sequences. In cases where the soluble CTLA4 initiation codon and upstream sequences are inserted into the appropriate expression vector, no additional translational control signals may be needed. However, in cases where only the coding sequence, or a portion thereof, is inserted, exogenous transcriptional control signals including the ATG-initiation codon may be provided. Furthermore, the initiation codon should be in the correct reading-frame to ensure translation of the entire insert. Exogenous transcriptional elements and initiation codons can be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of enhancers appropriate to the cell system in use (Scharf, D., et al, 1994 *Results Probl. Cell. Differ.* 20:125-62; Bittner, et al., 1987 *Methods in Enzymol.* 153:516-544).

The preferred vectors for expression of the soluble CTLA4 sequences in eukaryote host cells include expression control elements, such as the baculovirus polyhedrin promoter for expression in insect cells. Other expression control elements include promoters or enhancers derived from the genomes of plant cells (e. g., heat shock, RUBISCO, storage protein genes), viral promoters or leader sequences or from plant viruses, and promoters or enhancers from the mammalian genes or from mammalian viruses.

The preferred vector includes at least one selectable marker gene that encodes a gene product that confers drug resistance such as resistance to ampicillin or tetracyline. The vector also comprises multiple endonuclease restriction sites that enable convenient insertion of exogenous DNA sequences. Methods for generating a recombinant expression vector encoding the soluble CTLA4 proteins of the invention are well known in the art, and can be found in Sambrook et al., (*Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 2nd edition, Sambrook, Fritch, and Maniatis 1989, Cold Spring Harbor Press) and Ausubel et al. (1989 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York N.Y.).

The preferred vectors for generating soluble CTLA4 transcripts and/or the encoded soluble CTLA4 polypeptides are expression vectors which are compatible with prokaryotic host cells. Prokaryotic cell expression vectors are well known in the art and are available from several commercial sources. For example, pET vectors (e.g., pET-21, Novagen Corp.), BLUESCRIPT phagemid (Stratagene, LaJolla, CA), pSPORT (Gibco BRL, Rockville, MD), or ptrp-lac hybrids may be used to express soluble CTLA4 polypeptides in bacterial host cells.

Alternatively, the preferred expression vectors for generating soluble CTLA4 transcripts and/or the encoded soluble CTLA4 polypeptides are expression vectors which are compatible with eukaryotic host cells. The more preferred vectors are those compatible with vertebrate cells. Eukaryotic cell expression vectors are well known in the art and are available from several commercial sources. Typically, such vectors are provided containing convenient restriction sites for insertion of the desired DNA segment. Typical of such vectors are PSVL and pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1/pML2d (International Biotechnologies, Inc.), pTDT1 (ATCC, #31255), and similar eukaryotic expression vectors.

Examples of expression vectors for include, but are not limited to, vectors for mammalian host cells (e.g., BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPakc Vectors, pCMV vectors, pSG5 vectors (Stratagene)), retroviral vectors (e.g., pFB vectors (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) or modified forms thereof, adenoviral vectors; adeno-associated virus vectors, baculovirus vectors, yeast vectors (e.g., pESC vectors (Stratagene)).

A host vector system is also provided. The host vector system comprises the vector of the invention in a suitable host cell. Examples of suitable host cells include, but are not limited to, prokaryotic and eukaryotic cells. In accordance with the practice of the invention, eukaryotic cells are also suitable host cells. Examples of eukaryotic cells include any animal cell, whether primary or immortalized, yeast (e.g., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and *Pichia pastoris*), and plant cells. Exemplary animal cells include cells from bovine, ovine, porcine, murine, equine, monkey and ape. Myeloma, COS and CHO cells are examples of animal cells that may be used as hosts. Particular CHO cells include, but are not limited to, DG44 (Chasin, et la., 1986 *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555-556; Kolkekar 1997 *Biochemistry* 36:10901-10909), CHO-K1 (ATCC No. CCL-61), CHO-K1 Tet-On cell line (Clontech), CHO designated ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO clone 13 (GEIMG, Genova, IT), CHO clone B (GEIMG, Genova, IT), CHO-K1/SF designated ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), and RR-CHOK1 designated ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK). Exemplary plant cells include whole plants, cell culture, or callus, from tobacco, corn, soybean, and rice cells. Corn, soybean, and rice seeds are also acceptable.

The CTLA4 mutant molecules of the invention may be isolated as naturally-occurring polypeptides, or from any source whether natural, synthetic, semi-synthetic or recombinant. Accordingly, the CTLA4 mutant polypeptide molecules may be isolated as naturally-occurring proteins from any species, particularly mammalian, including bovine, ovine, porcine, murine, equine, and preferably human. Alternatively, the CTLA4 mutant polypeptide molecules may be isolated as recombinant polypeptides that are expressed in prokaryote or eukaryote host cells, or isolated as a chemically synthesized polypeptide.

A skilled artisan can readily employ standard isolation methods to obtain isolated CTLA4 mutant molecules. The nature and degree of isolation will depend on the source and the intended use of the isolated molecules.

CTLA4 mutant molecules and fragments or derivatives thereof, can be produced by recombinant methods. Accordingly, an isolated nucleotide sequence encoding wild-type CTLA4 molecules may be manipulated to introduce mutations, resulting in nucleotide sequences that encode the CTLA4 mutant polypeptide molecules. For example, the nucleotide sequences encoding the CTLA4 mutant molecules may be generated by site-directed mutagenesis methods, using primers and PCR amplification. The primers can include specific sequences designed to introduce desired mutations. Alternatively, the primers can be designed to include randomized or semi-randomized sequences to introduce random mutations. Standard recombinant methods (*Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 2nd edition, Sambrook, Fritch, and Maniatis 1989, Cold Spring Harbor Press) and PCR technology (U. S. Patent No. 4,603,102) can be employed for generating and isolating CTLA4 mutant polynucleotides encoding CTLA4 mutant polypeptides.

The invention includes pharmaceutical compositions comprising pharmaceutically effective amounts of a molecule that blocks B7 interaction with CTLA4 and/or CD28 such as soluble CTLA4 molecules, CD28 molecules, B7 (B7-1 or B7-2) molecules, anti-CTLA4 monoclonal antibodies, anti-CD28 monoclonal antibodies or anti-B7 (B7-1 or B7-2) monoclonal antibodies. The pharmaceutical compositions of the invention are useful for treatment of cardiovascular diseases. In certain embodiments, cardiovascular diseases are mediated by CD28/CTLA4/B7 interactions. The soluble CTLA4 molecules are preferably soluble CTLA4 molecules with wildtype sequence and/or soluble CTLA4 molecules having one or more mutations in the extracellular domain of CTLA4. The pharmaceutical composition can include soluble CTLA4 protein molecules and/or nucleic acid molecules, and/or vectors encoding the molecules. In preferred embodiments, the soluble CTLA4 molecules have the amino acid sequence of the extracellular domain of CTLA4 as shown in either Figures 24 or 19 (CTLA4Ig or L104EA29Y, respectively). Even more preferably, the soluble CTLA4 mutant molecule is L104EA29YIg as disclosed herein.

The compositions of the invention may additionally include one or more additional, other, or second therapeutic agents. By "administered in combination" or "combination therapy" it is meant that a compound of the present invention and one or more additional therapeutic agents are both administered to the mammal being treated. When administered in combination each component may be administered at the same time or sequentially in any order at different points in time. Thus, each component may be administered separately but sufficiently closely in time so as to provide the desired therapeutic effect.

Additional therapeutic agents, when employed in combination with the molecules of the present invention, may be used, for example, in those amounts indicated in the Physicians' Desk Reference (PDR) or as otherwise determined by one of ordinary skill in the art.

Additional, other, or second therapeutic agents include anti-coagulant or coagulation inhibitory agents, anti-platelet or platelet inhibitory agents, thrombin inhibitors, Vitamin K antagonists, glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists, thrombolytic or fibrinolytic agents, anti-arrythmic agents, anti-hypertensive agents, angiotensin converting enzyme inhibitors (ACE-Is), angiotensin receptor blockers (ARBs), beta-blockers, calcium channel blockers (L-type and T-type), cardiac glycosides, diruetics, mineralocorticoid receptor antagonists, phospodiesterase inhibitors, cholesterol/lipid lowering agents and lipid profile therapies, anti-diabetic agents, anti-depressants, anti-inflammatory agents (steroidal and non-steroidal), anti-osteoporosis agents, hormone replacement therapies, oral contraceptives, anti-obesity agents, anti-anxiety agents, anti-proliferative agents, anti-tumor agents, anti-ulcer and gastroesophageal reflux disease agents, growth hormone and/or growth hormone secretagogues, thyroid mimetics (including thyroid receptor antagonist), anti-infective agents, anti-viral agents, anti-bacterial agents, and anti-fungal agents.

Anticoagulant agents (or coagulation inhibitory agents) that may be used in combination with the compositions of this invention include warfarin and heparin (either unfractionated heparin or any commercially available low molecular weight heparin), synthetic pentasaccharide, direct acting thrombin inhibitors including hirudin and argatroban as well as factor Xa inhibitors.

The term anti-platelet agents (or platelet inhibitory agents), as used herein, denotes agents that inhibit platelet function, for example by inhibiting the

aggregation, adhesion or granular secretion of platelets. Agents include, but are not limited to, the various known non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) such as aspirin, ibuprofen, naproxen, sulindac, indomethacin, mefenamate, droxicam, diclofenac, sulfinpyrazone, piroxicam, and pharmaceutically acceptable salts or prodrugs thereof. Of the NSAIDS, aspirin (acetylsalicyclic acid or ASA) and piroxicam are preferred. Other suitable platelet inhibitory agents include IIb/IIIa antagonists (e.g., tirofiban, eptifibatide, and abciximab), thromboxane-A2-receptor antagonists (e.g., ifetroban), thromboxane-A2-synthetase inhibitors, PDE-III inhibitors (e.g., dipyridamole), and pharmaceutically acceptable salts or prodrugs thereof.

The term anti-platelet agents (or platelet inhibitory agents), as used herein, is also intended to include ADP (adenosine diphosphate) receptor antagonists, preferably antagonists of the purinergic receptors P_2Y_1 and P_2Y_{12}, with P_2Y_{12} being even more preferred. Preferred P_2Y_{12} receptor antagonists include ticlopidine and clopidogrel, including pharmaceutically acceptable salts or prodrugs thereof. Clopidogrel is an even more preferred agent. Ticlopidine and clopidogrel are also preferred compounds since they are known to be gentle on the gastro-intestinal tract in use.

The term thrombin inhibitors (or anti-thrombin agents), as used herein, denotes inhibitors of the serine protease thrombin. By inhibiting thrombin, various thrombin-mediated processes, such as thrombin-mediated platelet activation (that is, for example, the aggregation of platelets, and/or the granular secretion of plasminogen activator inhibitor-1 and/or serotonin) and/or fibrin formation are disrupted. A number of thrombin inhibitors are known to one of skill in the art and these inhibitors are contemplated to be used in combination with the present compounds. Such inhibitors include, but are not limited to, boroarginine derivatives, boropeptides, heparins, hirudin, argatroban, and melagatran, including pharmaceutically acceptable salts and prodrugs thereof. Boroarginine derivatives and boropeptides include N-acetyl and peptide derivatives of boronic acid, such as C-terminal α-aminoboronic acid derivatives of lysine, ornithine, arginine, homoarginine and corresponding isothiouronium analogs thereof. The term hirudin, as used herein, includes suitable derivatives or analogs of hirudin, referred to herein as hirulogs, such as disulfatohirudin. The term thrombolytics or fibrinolytic agents (or thrombolytics

or fibrinolytics), as used herein, denote agents that lyse blood clots (thrombi). Such agents include tissue plasminogen activator (natural or recombinant) and modified forms thereof, anistreplase, urokinase, streptokinase, tenecteplase (TNK), lanoteplase (nPA), factor VIIa inhibitors, PAI-1 inhibitors (i.e., inactivators of tissue plasminogen activator inhibitors), alpha2-antiplasmin inhibitors, and anisoylated plasminogen streptokinase activator complex, including pharmaceutically acceptable salts or prodrugs thereof. The term anistreplase, as used herein, refers to anisoylated plasminogen streptokinase activator complex, as described, for example, in EP 028,489, the disclosure of which is hereby incorporated herein by reference herein. The term urokinase, as used herein, is intended to denote both dual and single chain urokinase, the latter also being referred to herein as prourokinase.

Examples of suitable anti-arrythmic agents for use in combination with the present compounds include: Class I agents (such as propafenone); Class II agents (such as carvadiol and propranolol); Class III agents (such as sotalol, dofetilide, amiodarone, azimilide and ibutilide); Class IV agents (such as ditiazem and verapamil); K^+ channel openers such as I_{Ach} inhibitors, and I_{Kur} inhibitors (e.g., compounds such as those disclosed in WO01/40231).

Examples of suitable anti-hypertensive agents for use in combination with the compounds of the present invention include: alpha adrenergic blockers; beta adrenergic blockers; calcium channel blockers (e.g., diltiazem, verapamil, nifedipine, amlodipine and mybefradil); diuretics (e.g., chlorothiazide, hydrochlorothiazide, flumethiazide, hydroflumethiazide, bendroflumethiazide, methylchlorothiazide, trichloromethiazide, polythiazide, benzthiazide, ethacrynic acid tricrynafen, chlorthalidone, furosemide, musolimine, bumetanide, triamtrenene, amiloride, spironolactone); renin inhibitors; ACE inhibitors (e.g., captopril, zofenopril, fosinopril, enalapril, ceranopril, cilazopril, delapril, pentopril, quinapril, ramipril, lisinopril); AT-1 receptor antagonists (e.g., losartan, irbesartan, valsartan); ET receptor antagonists (e.g., sitaxsentan, atrsentan and compounds disclosed in U.S. Patent Nos. 5,612,359 and 6,043,265); Dual ET/AII antagonist (e.g., compounds disclosed in WO 00/01389); neutral endopeptidase (NEP) inhibitors; vasopepsidase inhibitors (dual NEP-ACE inhibitors) (e.g., omapatrilat, gemopatrilat and nitrates).

Examples of suitable calcium channel blockers (L-type or T-type) for use in combination with the compounds of the present invention include diltiazem, verapamil, nifedipine, amlodipine and mybefradil.

Examples of suitable cardiac glycosides for use in combination with the compounds of the present invention include digitalis and ouabain.

Examples of suitable diruetics for use in combination with the compounds of the present invention include: chlorothiazide, hydrochlorothiazide, flumethiazide, hydroflumethiazide, bendroflumethiazide, methylchlorothiazide, trichloromethiazide, polythiazide, benzthiazide, ethacrynic acid tricrynafen, chlorthalidone, furosemide, musolimine, bumetanide, triamtrenene, amiloride, and spironolactone.

Examples of suitable mineralocorticoid receptor antagonists for use in combination with the compounds of the present invention include sprionolactone and eplerenone.

Examples of suitable phospodiesterase inhibitors for use in combination with the compounds of the present invention include: PDE III inhibitors (such as cilostazol); and PDE V inhibitors (such as sildenafil).

Examples of suitable cholesterol/lipid lowering agents and lipid profile therapies for use in combination with the compounds of the present invention include: HMG-CoA reductase inhibitors (e.g., pravastatin, lovastatin, atorvastatin, simvastatin, fluvastatin, NK-104 (a.k.a. itavastatin, or nisvastatin or nisbastatin) and ZD-4522 (a.k.a. rosuvastatin, or atavastatin or visastatin)); squalene synthetase inhibitors; fibrates; bile acid sequestrants (such as questran); ACAT inhibitors; MTP inhibitors; lipooxygenase inhibitors; choesterol absorption inhibitors; and cholesterol ester transfer protein inhibitors (e.g., CP-529414).

Examples of suitable anti-diabetic agents for use in combination with the compounds of the present invention include: biguanides (e.g., metformin); glucosidase inhibitors (e.g., acarbose); insulins (including insulin secretagogues or insulin sensitizers); meglitinides (e.g., repaglinide); sulfonylureas (e.g., glimepiride, glyburide and glipizide); biguanide/glyburide combinations (e.g., glucovance), thiozolidinediones (e.g., troglitazone, rosiglitazone and pioglitazone), PPAR-alpha agonists, PPAR-gamma agonists, PPAR alpha/gamma dual agonists, SGLT2 inhibitors, inhibitors of fatty acid binding protein (aP2) such as those disclosed in

WO00/59506, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), and dipeptidyl peptidase IV (DP4) inhibitors.

Examples of suitable anti-depressant agents for use in combination with the compounds of the present invention include nefazodone and sertraline.

Examples of suitable anti-inflammatory agents for use in combination with the compounds of the present invention include: steroid compounds such as corticosteroids and glucocorticoids, including prednisone and dexamethasone; etanercept (Enbrel®); infliximab (Remicade®); protein tyrosine kinase (PTK) inhibitors; cyclooxygenase inhibitors (including NSAIDs, and COX-1 and/or COX-2 inhibitors); aspirin; indomethacin; ibuprofen; prioxicam; naproxen; celecoxib; and/or rofecoxib.

Examples of suitable anti-osteoporosis agents for use in combination with the compounds of the present invention include alendronate and raloxifene.

Examples of suitable hormone replacement therapies for use in combination with the compounds of the present invention include estrogen (e.g., congugated estrogens) and estradiol.

Examples of suitable anti-coagulants for use in combination with the compounds of the present invention include heparins (e.g., unfractioned and low molecular weight heparins such as enoxaparin and dalteparin).

Examples of suitable anti-obesity agents for use in combination with the compounds of the present invention include orlistat and aP2 inhibitors (such as those disclosed in WO00/59506).

Examples of suitable anti-anxiety agents for use in combination with the compounds of the present invention include diazepam, lorazepam, buspirone, and hydroxyzine pamoate.

Examples of suitable anti-proliferative agents for use in combination with the compounds of the present invention include cyclosporin A, paclitaxel, adriamycin; epithilones, cisplatin, and carboplatin.

Examples of suitable anti-ulcer and gastroesophageal reflux disease agents for use in combination with the compounds of the present invention include famotidine, ranitidine, and omeprazole.

Additional therapeutic agents also include: collagen, dnaJ, molecules that block TNF function (e.g., pegsunercept), molecules that block cytokine function (e.g.,

AMG719), molecules that block LFA-1 function (e.g., efalizumab) and stem cell transplants. These other treatments are currently being studied in clinical trials (www.clinicaltrials.gov) to determine their effect on rheumatoid arthritis.

Collagen, for example in the form of bovine II collagen, may be orally administered to a patient suffering from cardiovascular disease in order to alleviate one or more symptoms of cardiovascular disease.

DnaJ is a small peptide which mimics a protein contained in a gene in many patients with cardiovascular disease. The peptide is derived from *E. coli* bacteria heat shock protein. DnaJ may be orally administered to a patient suffering from cardiovascular disease in order to alleviate one or more symptoms of cardiovascular disease.

TNF is a molecule involved in the inflammatory response of patients with rheumatoid arthritis and possibly cardiovascular disease. Conceivably, any molecule that blocks TNF function e.g., by blocking TNF binding to the TNF receptor (TNFR), may help modify the progression of cardiovascular disease and alleviate some of its symptoms. Several TNF blockers such as infliximab and etanercept, have been shown to be efficacious in treating cardiovascular disease. Other TNF blockers such as pegsunercept are being developed and tested (Phase II clinical trial) for their efficacy in treating cardiovascular disease.

Cytokines e.g., Interleukin-1 (IL-1), are cell secreted molecules involved in mediating immune responses. Conceivably, any molecule that blocks cytokine function e.g., by blocking IL-1 interaction with its receptor, may help modify the progression of cardiovascular disease and alleviate one or more of its symptoms. Anakinra, a recombinant protein that blocks IL-1 interaction with its receptor (IL-1R) has been shown to be efficacious in treating cardiovascularoid arthritis. An IL-1 inhibitor, AMG719, is being developed and tested (Phase II clinical trial) for its efficacy in treating rheumatoid arthritis.

Lymphocyte function associated molecule 1 (LFA-1) is a molecule composed of two subunits, CD11a and CD18, which functions by mediating lymphocyte adhesion to various cell types such as endothelium. Conceivably, interference of LFA-1 function may help modify the progression of cardiovascular disease and alleviate one or more of its symptoms. An anti-LFA-1 antibody, efalizumab, is being

developed and tested (Phase II clinical trial) for its efficacy in treating rheumatoid arthritis.

Blockage of TNF, cytokine or LFA-1 interaction to their ligands by a potentially therapeutic molecule can be determined by any number of assays known to those skilled in the art. For example, competition assays may be used to test blockage by the molecule of interest e.g., a molecule can be exposed to a TNF/TNFR binding pair in order to compete with TNF to bind to TNFR. Alternatively, functional assays can be performed to test blockage e.g., a molecule can be tested for its ability to inhibit an inflammatory cascade, or any part of an inflammatory reaction such as swelling, redness or pain, caused by a cytokine.

Additional therapeutic agents also include: p38 MAP kinase inhibitor, soluble gp39 (also known as CD40 ligand (CD40L), CD154, T-BAM, TRAP), soluble CD29, soluble CD40, soluble CD80 (e.g. ATCC 68627), soluble CD86, soluble CD28 (e.g. ATCC accession number 68628), soluble CD56, soluble Thy-1, soluble CD3, soluble TCR, soluble VLA-4, soluble VCAM-1, soluble LECAM-1, soluble ELAM-1, soluble CD44, antibodies reactive with gp39 (e.g. ATCC HB-10916, ATCC HB-12055 and ATCC HB-12056), antibodies reactive with CD40 (e.g. ATCC HB-9110), antibodies reactive with B7 (e.g. ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341, etc), antibodies reactive with CD28 (e.g. ATCC HB-11944 or mAb 9.3 as described by Martin et al (J. Clin. Immun. 4(1):18-22, 1980), antibodies reactive with LFA-1 (e.g. ATCC HB-9579 and ATCC TIB-213), antibodies reactive with LFA-2, antibodies reactive with IL-2, antibodies reactive with IL-12, antibodies reactive with IFN-gamma, antibodies reactive with CD2, antibodies reactive with CD48, antibodies reactive with any ICAM (e.g., ICAM-1 (ATCC CRL-2252), ICAM-2 and ICAM-3), antibodies reactive with CTLA4 (e.g. ATCC HB-304),, antibodies reactive with Thy-1, antibodies reactive with CD56, antibodies reactive with CD3, antibodies reactive with CD29, antibodies reactive with TCR, antibodies reactive with VLA-4, antibodies reactive with VCAM-1, antibodies reactive with LECAM-1, antibodies reactive with ELAM-1, antibodies reactive with CD44. In certain embodiments, monoclonal antibodies are preferred. In other embodiments, antibody fragments are preferred. As persons skilled in the art will readily understand, the combination can include: the soluble CTLA4 molecules of the invention and one other agent; the soluble CTLA4 molecules with two other

agents; the soluble CTLA4 molecules with three other agents; and the like. The determination of the optimal combination and dosages can be determined and optimized using methods well known in the art.

Some specific combinations for co-administration include the following: CTLA4Ig or L104EA29YIg and CD80 monoclonal antibodies (mAbs); CTLA4Ig or L104EA29YIg and CD86 mAbs; CTLA4Ig or L104EA29YIg, CD80 mAbs, and CD86 mAbs; CTLA4Ig or L104EA29YIg and gp39 mAbs; CTLA4Ig or L104EA29YIg and CD40 mAbs; CTLA4Ig or L104EA29YIg and CD28 mAbs; CTLA4Ig or L104EA29YIg, CD80 and CD86 mAbs, and gp39 mAbs; CTLA4Ig or L104EA29YIg, CD80 and CD86 mAbs and CD40 mAbs; and CTLA4Ig or L104EA29YIg, anti-LFA1 mAb, and anti-gp39 mAb. A specific example of a gp39 mAb is MR1. Other combinations will be readily appreciated and understood by persons skilled in the art.

Additional therapeutic agents also include: a calcineurin inhibitor, e.g. cyclosporin A or FK506; an immunosuppressive macrolide, e.g. rapamycine or a derivative thereof (e.g. 40-O-(2-hydroxy)ethyl-rapamycin); a lymphocyte homing agent, e.g. FTY720 or an analog thereof; corticosteroids; cyclophosphamide; azathioprene; a dihydrofolic acid reductase inhibitor such as methotrexate; leflunomide or an analog thereof; mizoribine; mycophenolic acid; mycophenolate mofetil; 15-deoxyspergualine or an analog thereof; immunosuppressive monoclonal antibodies, e.g., monoclonal antibodies to leukocyte receptors, e.g., MHC, CD2, CD3, CD4, CD 11a/CD18, CD7, CD25, CD 27, B7, CD40, CD45, CD58, CD 137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BB or their ligands; or other immunomodulatory compounds, e.g. CTLA4/CD28-Ig, or other adhesion molecule inhibitors, e.g. mAbs or low molecular weight inhibitors including LFA-1 antagonists, Selectin antagonists and VLA-4 antagonists. The compound is particularly useful in combination with a compound that interferes with CD40 and its ligand, e.g. antibodies to CD40 and antibodies to CD40-L.

Administration of the compounds of the present invention (i.e., a first therapeutic agent) in combination with at least one additional therapeutic agent (i.e., a second therapeutic agent), preferably affords an efficacy advantage over the compounds and agents alone, preferably while permitting the use of lower doses of each (i.e., a synergistic combination). A lower dosage minimizes the potential of side

effects, thereby providing an increased margin of safety. It is preferred that at least one of the therapeutic agents is administered in a sub-therapeutic dose. It is even more preferred that all of the therapeutic agents be administered in sub-therapeutic doses. Sub-therapeutic is intended to mean an amount of a therapeutic agent that by itself does not give the desired therapeutic effect for the condition or disease being treated. Synergistic combination is intended to mean that the observed effect of the combination is greater than the sum of the individual agents administered alone.

A pharmaceutical composition comprising soluble CTLA4 can be used for methods for blocking B7 interaction with CTLA4 and/or CD28; or for treating cardiovascular diseases. Effective amounts of soluble CTLA4 in the pharmaceutical composition range about 0.1 to 100 mg/kg weight of the subject. In another embodiment, the effective amount is an amount about 0.5 to 100 mg/kg weight of a subject, 0.5 to 5 mg/kg weight of a subject, about 5 to 10 mg/kg weight of a subject, about 10 to 15 mg/kg weight of a subject, about 15 to 20 mg/kg weight of a subject, about 20 to 25 mg/kg weight of a subject, about 25 to 30 mg/kg weight of a subject, about 30 to 35 mg/kg weight of a subject, about 35 to 40 mg/kg weight of a subject, about 40 to 45 mg/kg of a subject, about 45 to 50 mg/kg weight of a subject, about 50 to 55 mg/kg weight of a subject, about 55 to 60 mg/kg weight of a subject, about 60 to 65 mg/kg weight of a subject, about 65 to 70 mg/kg weight of a subject, about 70 to 75 mg/kg weight of a subject, about 75 to 80 mg/kg weight of a subject, about 80 to 85 mg/kg weight of a subject, about 85 to 90 mg/kg weight of a subject, about 90 to 95 mg/kg weight of a subject, or about 95 to 100 mg/kg weight of a subject.

In an embodiment, the effective amount of soluble CTLA4 is an amount about 2 mg/kg to about 10 mg/kg weight of a subject. In another embodiment, the effective amount is an amount about 0.1 to 4 mg/kg weight of a subject. In another embodiment the effective amount is an amount about 0.1 to 0.5 mg/kg weight of a subject, about 0.5 to 1.0 mg/kg weight of a subject, about 1.0 to 1.5 mg/kg weight of a subject, about 1.5 to 2.0 mg/kg weight of a subject, about 2.0 to 2.5 mg/kg weight of a subject, about 2.5 to 3.0 mg/kg weight of a subject, about 3.0 to 3.5 mg/kg weight of a subject or about 3.5 to 4.0 mg/kg weight of a subject. In another embodiment, the effective amount is an amount about 0.1 to 20 mg/kg weight of a subject. In another embodiment, the effective amount is an amount about 0.1 to 2 mg/kg weight of a subject, about 2 to 4 mg/kg weight of a subject, about 4 to 6 mg/kg

weight of a subject, about 6 to 8 mg/kg weight of a subject, about 8 to 10 mg/kg weight of a subject, about 10 to 12 mg/kg weight of a subject, about 12 to 14 mg/kg weight of a subject, about 14 to 16 mg/kg weight of a subject, about 16 to 18 mg/kg weight of a subject or about 18 to 20 mg/kg weight of a subject. In an embodiment, the effective amount is 2 mg/kg weight of a subject. In another embodiment, the effective amount is about 10 mg/kg weight of a subject.

In a specific embodiment, an effective amount of soluble CTLA4 is 500 mg for a subject weighing less than 60 kg, 750 mg for a subject weighing between 60-100 kg and 1000 mg for a subject weighing more than 100 kg.

The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising the molecules of the inventon e.g., CTLA4Ig and an acceptable carrier or adjuvant which is known to those of skill of the art. The pharmaceutical compositions preferably include suitable carriers and adjuvants which include any material which when combined with the molecules of the invention (e.g., a soluble CTLA4 molecule, such as, CTLA4Ig or L104EA29Y) retain the molecule's activity, and is non-reactive with the subject's immune system. These carriers and adjuvants include, but are not limited to, ion exchangers, alumina, aluminum stearate, lecithin, serum proteins, such as human serum albumin, buffer substances such as phosphates, glycine, sorbic acid, potassium sorbate, partial glyceride mixtures of saturated vegetable fatty acids, phosphate buffered saline solution, water, emulsions (e.g. oil/water emulsion), salts or electrolytes such as protamine sulfate, disodium hydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, sodium chloride, zinc salts, colloidal silica, magnesium trisilicate, polyvinyl pyrrolidone, cellulose-based substances and polyethylene glycol. Other carriers may also include sterile solutions; tablets, including coated tablets and capsules. Typically such carriers contain excipients such as starch, milk, sugar (e.g. sucrose, glucose, maltose), certain types of clay, gelatin, stearic acid or salts thereof, magnesium or calcium stearate, talc, vegetable fats or oils, gums, glycols, or other known excipients. Such carriers may also include flavor and color additives or other ingredients. Compositions comprising such carriers are formulated by well known conventional methods. Such compositions may also be formulated within various lipid compositions, such as, for example, liposomes as well as in various polymeric compositions, such as polymer microspheres.

67

In a further embodiment of the invention, the present invention provides kits (i.e., a packaged combination of reagents with instructions) containing the molecules of the invention useful for blocking B7 interactions with its ligands and/or for treating a cardiovascular disease.

The kit can contain a pharmaceutical composition that includes one or more agents, for example, a soluble CTLA4 molecule alone, or with a second agent, and an acceptable carrier or adjuvant, e.g., pharmaceutically acceptable buffer, such as phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use. The agents may be provided as dry powders, usually lyophilized, including excipients that upon dissolving will provide a reagent solution having the appropriate concentration.

Second agents can include those described above as additional agents, such as anti-coagulant or coagulation inhibitory agents, anti-platelet or platelet inhibitory agents, thrombin inhibitors, thrombolytic or fibrinolytic agents, anti-arrythmic agents, anti-hypertensive agents, calcium channel blockers (L-type and T-type), cardiac glycosides, diruetics, mineralocorticoid receptor antagonists, phospodiesterase inhibitors, cholesterol/lipid lowering agents and lipid profile therapies, anti-diabetic agents, anti-depressants, anti-inflammatory agents (steroidal and non-steroidal), anti-osteoporosis agents, hormone replacement therapies, oral contraceptives, anti-obesity agents, anti-anxiety agents, anti-proliferative agents, anti-tumor agents, anti-ulcer and gastroesophageal reflux disease agents, growth hormone and/or growth hormone secretagogues, thyroid mimetics (including thyroid receptor antagonist), anti-infective agents, anti-viral agents, anti-bacterial agents, and anti-fungal agents.

The kit comprises a container with a label and/or instructions. Suitable containers include, for example, bottles, vials, and test tubes. The containers can be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container can have a sterile access port (for example the container can be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a needle such as a hypodermic injection needle). The container can hold a pharmaceutical composition such as a pharmaceutical composition having an agent that is effective for blocking B7 interactions with its ligand and/or treating an cardiovascular disease.

The kit can also comprise a second container comprising one or more second agents as described herein and/or a pharmaceutically acceptable buffer, such as phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use.

The kit may also suitably include a label and/or instructions on, or associated with the container. The label can provide directions for carrying out the preparation of the agents for example, dissolving of the dry powders, and/or treatment for a specific cardiovascular disease. The label and/or instructions may indicate that administration of the composition of the invention and a second agent may be at the same time or may be sequentially in any order at different points in time.

The label and/or the instructions can indicate directions for either in vivo or in vitro use of the pharmaceutical composition. The label and/or the instructions can indicate that the pharmaceutical composition is used alone, or in combination with a second agent.

The label can indicate appropriate dosages for the molecules of the invention. For example, the label can indicate that dosages for a molecule that is effective for blocking B7 interactions with its ligand and/or treating an cardiovascular disease is about 0.1 to 100 mg/kg weight of the subject, about 0.5 to 100 mg/kg weight of a subject, 0.5 to 5 mg/kg weight of a subject, about 5 to 10 mg/kg weight of a subject, about 10 to 15 mg/kg weight of a subject, about 15 to 20 mg/kg weight of a subject, about 20 to 25 mg/kg weight of a subject, about 25 to 30 mg/kg weight of a subject, about 30 to 35 mg/kg weight of a subject, about 35 to 40 mg/kg weight of a subject, about 40 to 45 mg/kg of a subject, about 45 to 50 mg/kg weight of a subject, about 50 to 55 mg/kg weight of a subject, about 55 to 60 mg/kg weight of a subject, about 60 to 65 mg/kg weight of a subject, about 65 to 70 mg/kg weight of a subject, about 70 to 75 mg/kg weight of a subject, about 75 to 80 mg/kg weight of a subject, about 80 to 85 mg/kg weight of a subject, about 85 to 90 mg/kg weight of a subject, about 90 to 95 mg/kg weight of a subject, about 95 to 100 mg/kg weight of a subject, about 2 to 10 mg/kg weight of a subject, about 0.1 to 4 mg/kg weight of a subject, about 0.1 to 0.5 mg/kg weight of a subject, about 0.5 to 1.0 mg/kg weight of a subject, about 1.0 to 1.5 mg/kg weight of a subject, about 1.5 to 2.0 mg/kg weight of a subject,

about 2.0 to 2.5 mg/kg weight of a subject, about 2.5 to 3.0 mg/kg weight of a subject, about 3.0 to 3.5 mg/kg weight of a subject, about 3.5 to 4.0 mg/kg weight of a subject, about 4.0 to 4.5 mg/kg weight of a subject, about 4.5 to 5.0 mg/kg weight of a subject, about 5.0 to 5.5 mg/kg weight of a subject, about 5.5 to 6.0 mg/kg weight of a subject, about 6.0 to 6.5 mg/kg weight of a subject, about 6.5 to 7.0 mg/kg weight of a subject, about 7.0 to 7.5 mg/kg weight of a subject, about 7.5 to 8.0 mg/kg weight of a subject, about 8.0 to 8.5 mg/kg weight of a subject, about 8.5 to 9.0 mg/kg weight of a subject, about 9.0 to 9.5 mg/kg weight of a subject, about 9.5 to 10.0 mg/kg weight of a subject, about 0.1 to 2 mg/kg weight of a subject, about 2 to 4 mg/kg weight of a subject, about 4 to 6 mg/kg weight of a subject, about 6 to 8 mg/kg weight of a subject, about 8 to 10 mg/kg weight of a subject, about 10 to 12 mg/kg weight of a subject, about 12 to 14 mg/kg weight of a subject, about 14 to 16 mg/kg weight of a subject, about 16 to 18 mg/kg weight of a subject, about 18 to 20 mg/kg weight of a subject, about 0.5 mg/kg weight of the subject, 2 mg/kg weight of the subject, 10 mg/kg weight of the subject, about 0.5 mg/kg to 100 weight of the subject, about 0.5 to 10 mg/kg weight of a subject, about 0.1 to 20 mg/kg weight of a subject, about 500 mg for a subject weighing less than 60 kg, 750 mg for a subject weighing between 60-100 kg or 1000 mg for a subject weighing more than 100 kg

The label and/or the instructions can also indicate that the pharmaceutical composition can be used alone, or in combination, with a second agent to treat a condition of choice, e.g., cardiovascular diseases, at the same time or sequentially in any order at different points in time.

In a specific embodiment of the invention, the kit comprises a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an effective amount of a first agent, wherein the first agent is a molecule that blocks B7 interaction with CTLA4 and/or CD28 such as soluble CTLA4 molecules, CD28 molecules, B7 (B7-1 or B7-2) molecules, anti-CTLA4 monoclonal antibodies, anti-CD28 monoclonal antibodies or anti-B7 (B7-1 or B7-2) monoclonal antibodies. In preferred embodiments, the soluble CTLA4 molecules have the amino acid sequence of the extracellular domain of CTLA4 as shown in either Figures 24 or 19 (CTLA4Ig or L104EA29Y, respectively).

Methods

The invention provides methods for regulating functional CTLA4- and CD28-positive cell interactions with B7-positive cells. The methods comprise contacting the B7-positive cells with a soluble CTLA4 molecule of the invention so as to regulate functional CTLA4- and CD28- positive cell interactions with B7-positive cells, e.g., by interfering with reaction of an endogenous CTLA4 and/or CD28 molecule with a B7 molecule. Suitable amounts of soluble CTLA4 for use in the methods of the invention are described supra.

The present invention further provides methods for treating cardiovascular diseases. The methods comprise administering a therapeutic composition of the invention, such as soluble CTLA4 molecules of the invention, to a subject in an amount effective to relieve at least one of the symptoms associated with cardiovascular diseases. Examples of soluble CTLA4 include CTLA4Ig and soluble CTLA4 mutant molecule e.g. L104EA29YIg. Symptoms of cardiovascular disease include, but are not limited to, dysrhythmias; ischemia; angina; reduced exercise tolerance; fatigue; dyspnea on exertion; and transient ischemic attacks. Additionally, the invention may provide long-term therapy for cardiovascular diseases by blocking the T-cell/B7-positive cell interactions, thereby blocking T-cell activation/stimulation by co-stimulatory signals such as B7 binding to CD28, leading to induction of T-cell anergy or tolerance.

Cardiovascular diseases include, but are not limited to, the following diseases or conditions: thromboembolic disorders, including arterial cardiovascular thromboembolic disorders, venous cardiovascular thromboembolic disorders, and thromboembolic disorders in the chambers of the heart; ahtherosclerosis; restensosis; peripheral arterial disease; coronary bypass grafting surgery; carotid artery disease; arteritis; myocarditis; cardiovascular inflammation; vascular inflammation; coronary heart disease (CHD); unstable angina (UA); unstable refractory angina; stable angina (SA); chronic stable angina; acute coronary syndrome (ACS); first or recurrent myocardial infarction; acute myocardial infarction (AMI); myocardial infarction; non-Q wave myocardial infarction; non-STE myocardial infarction; coronary artery disease; cardiac ischemia; ischemia; ischemic sudden death; transient ischemic attack; stroke; atherosclerosis; peripheral occlusive arterial disease; venous thrombosis; deep vein thrombosis; thrombophlebitis; arterial embolism; coronary arterial thrombosis; cerebral arterial thrombosis; cerebral embolism; kidney embolism; pulmonary

embolism; thrombosis resulting from (a) prosthetic valves or other implants, (b) indwelling catheters, (c) stents, (d) cardiopulmonary bypass, (e) hemodialysis, or (f) other procedures in which blood is exposed to an artificial surface that promotes thrombosis; thrombosis resulting from atherosclerosis, surgery or surgical complications, prolonged immobilization, arterial fibrillation, congenital thrombophilia, cancer, diabetes, effects of medications or hormones, and complications of pregnancy; cardiac arrhytmias including supraventricular arrhythmias, atrial arrhythmias, atrial flutter, atrial fibrillation; other diseases listed in Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 2 Volume Set, 6th Edition, 2001, Eugene Braunwald, Douglas P. Zipes, Peter Libby, Douglas D. Zipes.

Preferred cardiovascular diseases are: atherosclerosis; coronary heart disease (CHD); restensosis; peripheral arterial disease; coronary bypass grafting surgery; carotid artery disease; arteritis; myocarditis; cardiovascular inflammation; vascular inflammation; unstable angina (UA); unstable refractory angina; stable angina (SA); chronic stable angina; acute coronary syndrome (ACS); myocardial infarction; acute myocardial infarction (AMI), including first or recurrent myocardial infarction, non-Q wave myocardial infarction, non-ST-segment elevation myocardial infarction and ST-segment elevation myocardial infarction.

More preferred cardiovascular diseases are: atherosclerosis; coronary heart disease (CHD); unstable angina (UA); unstable refractory angina; stable angina (SA); chronic stable angina; acute coronary syndrome (ACS); myocardial infarction; acute myocardial infarction (AMI), including first or recurrent myocardial infarction, non-Q wave myocardial infarction, non-ST-segment elevation myocardial infarction and ST-segment elevation myocardial infarction.

Preferred cardiovascular diseases are carcardiovascular diseases mediated by T cell interactions with B7-positive cells.

Also preferred are cardiovascular diseases associated with at least one marker of inflammation. By associated with a marker of inflammation, is meant that the marker (presence, absence or specific concentrations) correlates statisitically with: the risk of the future development of disease, or the risk of disease recurrence, or the current level of disease activity. Markers of inflammation include, but are not limited to, CRP, hsCRP, IL-10, CD40L, sCD40L, IL-6, sICAM-1, TNF-α, white blood cell count, fibrinogen, and serum amyloid A. Preferred markers of inflammation are

CRP, hsCRP, IL-6, and TNF-α; most preferred is hsCRP. High CRP, high hsCRP, low IL-10, high sCD40L, high IL-6, high sICAM-1, highTNF-α, high white blood cell count, high fibrinogen, and high serum amyloid A are known to be indicators of inflammation.

The soluble CTLA4 molecules of the invention exhibit inhibitory properties *in vivo*. Under conditions where T-cell/B7-positive cell interactions, for example T cell/B cell interactions, are occurring as a result of contact between T cells and B7-positive cells, binding of introduced CTLA4 molecules to react to B7-positive cells, for example B cells, may interfere, i.e., inhibit, the T cell/ B7-positive cell interactions resulting in regulation of immune responses.

Preferred embodiments of the invention comprises use of CTLA4Ig or the soluble CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg to regulate functional CTLA4- and CD28- positive cell interactions with B7-positive cells, to treat or prevent cardiovascular diseases, including recurrent cardiovascular events (e.g., myocardial infarction), and/or to downregulate immune responses. The L104EA29YIg of the invention is a soluble CTLA4 mutant molecule comprising at least the two amino acid changes, the leucine (L) to glutamic acid (E) at position +104 and the alanine (A) to tyrosine (Y) change at position +29 (Figure 19). The L104EA29YIg molecule may encompass further mutations beyond the two specified herein.

Suitable amounts of the molecule used to block the B7 interaction with CTLA4 and/or CD28 are described supra. The molecule used to block the B7/CTLA4 interaction may be a soluble CTLA4 such as CTLA4Ig, CTLA4Ig/CD28Ig or L104EA29YIg, a soluble CD28 such as CD28Ig, a soluble B7 (B7-1 or B7-2) such as B7Ig, anti-CTLA4 monoclonal antibodies, anti-CD28 monoclonal antibodies or anti-B7 monoclonal antibodies.

The amount of symptom relief provided by the present invention can be measured using any of the accepted criteria established to measure and document symptom relief in a clinical setting. Acceptable criteria for measuring symptom relief may include: angina; recurrent angina; unstable angina; ischemic time; hospitalization for cardiovascular reasons; acute myocardial infarction; recurrent myocardial infarction; need for urgent revascularization; need for percutaneous coronary intervention; all cause mortality; cardiovascular mortality; transent ischemic attack; and stroke.

The subjects treated by the present invention include mammalian subjects, including, human, monkey, ape, dog, cat, cow, horse, goat, pig, rabbit, mouse and rat.

The present invention provides various methods, local or systemic, for administering the therapeutic compositions of the invention such as soluble CTLA4 molecule alone or in conjunction with an additional therapeutic agent. The methods include intravenous, intramuscular, intraperitoneal, oral, inhalation and subcutaneous methods, as well as implantable pump, continuous infusion, bolus infusion, gene therapy, liposomes, suppositories, topical contact, vesicles, capsules, biodegradable polymers, drug-eluting stents, hydrogels, controlled release patch. and injection methods. The therapeutic agent, compounded with a carrier, is commonly lyophilized for storage and is reconstituted with water or a buffered solution with a neutral pH (about pH 7-8, e.g., pH 7.5) prior to administration.

The therapeutic composition of the invention, such as soluble CTLA4 molecule, may be administered at the same time, or may be administered sequentially in any order at different points in time, as an additional therapeutic agent.

As is standard practice in the art, the compositions of the invention may be administered to the subject in any pharmaceutically acceptable form.

In accordance with the practice of the invention, the methods comprise administering to a subject the soluble CTLA4 molecules of the invention to regulate CD28- and/or CTLA4-positive cell interactions with B7-positive cells. The B7-positive cells are contacted with an effective amount of the soluble CTLA4 molecules of the invention, or fragments or derivatives thereof, so as to form soluble CTLA4/B7 complexes. Suitable amounts of soluble CTLA4 are described supra. The complexes interfere with interaction between endogenous CTLA4 and CD28 molecules with B7 family molecules.

The soluble CTLA4 molecules may be administered to a subject in an amount and for a time (e.g. length of time and/or multiple times) sufficient to block endogenous B7 molecules from binding their respective ligands, in the subject. Blockage of endogenous B7/ligand binding thereby inhibiting interactions between B7-positive cells with CD28- and/or CTLA4-positive cells. In an embodiment, soluble CTLA4 may be administered to a subject daily, weekly, monthly and/or yearly, in single or multiple times per day/week/month/year, depending on need. For

example, in one embodiment, the molecule may initially be administered once every two weeks for a month, and then once every month thereafter.

Dosage of a therapeutic agent is dependant upon many factors including, but not limited to, the type of tissue affected, the type of cardiovascular disease being treated, the severity of the disease, a subject's health and response to the treatment with the agents. Accordingly, dosages of the agents can vary depending on each subject and the mode of administration. The soluble CTLA4 molecules may be administered in an amount from about 0.1 to 100 mg/kg weight of the patient/day. Suitable amounts of soluble CTLA4 are described supra.

The invention also encompasses the use of the compositions of the invention together with other therapeutic agents or pharmaceutical agents to treat cardiovascular diseases. For example, cardiovascular diseases may be treated with molecules of the invention in conjunction with, but not limited to, the additional therapeutic agents listed above in the discussion of compositions of the invention.

Where the soluble CTLA4 mutant molecules of the invention are administered in conjunction with other agents, e.g. as hereinabove specified, dosages of the co-administered agent will of course vary depending on the type of co-drug employed, on the specific drug employed, on the condition being treated and so forth.

In accordance with the foregoing the present invention provides in a yet further aspect methods as defined above comprising co-administration, e.g. concomitantly or in sequence in any order (i.e. at the same time or sequentially in any order at different points in time), of a therapeutically effective amount of soluble CTLA4 molecules of the invention, e.g. CTLA4Ig and/or L104EA29YIg, in free form or in pharmaceutically acceptable salt form, and a second drug substance, said second drug substance being an immunosuppressant, immunomodulatory or anti-inflammatory drug, e.g. as indicated above.

Further provided are therapeutic combinations, e.g. a kit, comprising a soluble CTLA4 molecule, in free form or in pharmaceutically acceptable salt form, to be used concomitantly or in sequence in any order (i.e. at the same time or sequentially in any order at different points in time), with at least one pharmaceutical composition comprising another therapeutic agent. The kit may comprise instructions for its administration. The kits of the invention can be used in any method of the present invention.

The invention also provides methods for producing the soluble CTLA4 mutant molecules of the invention. Expression of soluble CTLA4 mutant molecules can be in prokaryotic cells or eukaryotic cells.

Prokaryotes most frequently are represented by various strains of bacteria. The bacteria may be a gram positive or a gram negative. Typically, gram-negative bacteria such as *E. coli* are preferred. Other microbial strains may also be used. Sequences encoding soluble CTLA4 mutant molecules can be inserted into a vector designed for expressing foreign sequences in prokaryotic cells such as *E. coli*. These vectors can include commonly used prokaryotic control sequences which are defined herein to include promoters for transcription initiation, optionally with an operator, along with ribosome binding site sequences, including such commonly used promoters as the beta-lactamase (penicillinase) and lactose (lac) promoter systems (Chang, et al., (1977) *Nature* 198:1056), the tryptophan (trp) promoter system (Goeddel, et al., (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057) and the lambda derived P_L promoter and N-gene ribosome binding site (Shimatake, et al., (1981) *Nature* 292:128).

Such expression vectors will also include origins of replication and selectable markers, such as a beta-lactamase or neomycin phosphotransferase gene conferring resistance to antibiotics, so that the vectors can replicate in bacteria and cells carrying the plasmids can be selected for when grown in the presence of antibiotics, such as ampicillin or kanamycin.

The expression plasmid can be introduced into prokaryotic cells via a variety of standard methods, including but not limited to $CaCl_2$-shock (Cohen, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110, and Sambrook et al. (eds.), "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989)) and electroporation.

In accordance with the practice of the invention, eukaryotic cells are also suitable host cells. Examples of eukaryotic cells include any animal cell, whether primary or immortalized, yeast (e.g., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and *Pichia pastoris*), and plant cells. Myeloma, COS and CHO cells are examples of animal cells that may be used as hosts. Particular CHO cells include, but are not limited to, DG44 (Chasin, et la., 1986 *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555-556; Kolkekar 1997 *Biochemistry* 36:10901-10909), CHO-K1

(ATCC No. CCL-61), CHO-K1 Tet-On cell line (Clontech), CHO designated ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO clone 13 (GEIMG, Genova, IT), CHO clone B (GEIMG, Genova, IT), CHO-K1/SF designated ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), and RR-CHOK1 designated ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK). Exemplary plant cells include tobacco (whole plants, cell culture, or callus), corn, soybean, and rice cells. Corn, soybean, and rice seeds are also acceptable.

Nucleic acid sequences encoding the CTLA4 mutant molecules can also be inserted into a vector designed for expressing foreign sequences in an eukaryotic host. The regulatory elements of the vector can vary according to the particular eukaryotic host.

Commonly used eukaryotic control sequences for use in expression vectors include promoters and control sequences compatible with mammalian cells such as, for example, CMV promoter (CDM8 vector) and avian sarcoma virus (ASV) (πLN vector). Other commonly used promoters include the early and late promoters from Simian Virus 40 (SV40) (Fiers, et al., (1973) *Nature* 273:113), or other viral promoters such as those derived from polyoma, Adenovirus 2, and bovine papilloma virus. An inducible promoter, such as hMTII (Karin, et al., (1982) *Nature* 299:797-802) may also be used.

Vectors for expressing CTLA4 mutant molecules in eukaryotes may also carry sequences called enhancer regions. These are important in optimizing gene expression and are found either upstream or downstream of the promoter region.

Examples of expression vectors for eukaryotic host cells include, but are not limited to, vectors for mammalian host cells (e.g., BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPakc Vectors, pCMV vectors, pSG5 vectors (Stratagene)), retroviral vectors (e.g., pFB vectors (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) or modified forms thereof, adenoviral vectors; Adeno-associated virus vectors, baculovirus vectors, yeast vectors (e.g., pESC vectors (Stratagene)).

Nucleic acid sequences encoding CTLA4 mutant molecules can integrate into the genome of the eukaryotic host cell and replicate as the host genome replicates. Alternatively, the vector carrying CTLA4 mutant molecules can contain origins of replication allowing for extrachromosomal replication.

For expressing the nucleic acid sequences in *Saccharomyces cerevisiae*, the origin of replication from the endogenous yeast plasmid, the 2μ circle can be used. (Broach, (1983) *Meth. Enz.* 101:307). Alternatively, sequences from the yeast genome capable of promoting autonomous replication can be used (see, for example, Stinchcomb et al., (1979) *Nature* 282:39); Tschemper et al., (1980) *Gene* 10:157; and Clarke et al., (1983) *Meth. Enz.* 101:300).

Transcriptional control sequences for yeast vectors include promoters for the synthesis of glycolytic enzymes (Hess et al., (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149; Holland et al., (1978) *Biochemistry* 17:4900). Additional promoters known in the art include the CMV promoter provided in the CDM8 vector (Toyama and Okayama, (1990) *FEBS* 268:217-221); the promoter for 3-phosphoglycerate kinase (Hitzeman et al., (1980) *J. Biol. Chem.* 255:2073), and those for other glycolytic enzymes.

Other promoters are inducible because they can be regulated by environmental stimuli or by the growth medium of the cells. These inducible promoters include those from the genes for heat shock proteins, alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, enzymes associated with nitrogen catabolism, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization.

Regulatory sequences may also be placed at the 3' end of the coding sequences. These sequences may act to stabilize messenger RNA. Such terminators are found in the 3' untranslated region following the coding sequences in several yeast-derived and mammalian genes.

Exemplary vectors for plants and plant cells include, but are not limited to, Agrobacterium T_i plasmids, cauliflower mosaic virus (CaMV), and tomato golden mosaic virus (TGMV).

General aspects of mammalian cell host system transformations have been described by Axel (U.S. Patent No. 4,399,216 issued Aug. 16, 1983). Mammalian cells can be transformed by methods including but not limited to, transfection in the presence of calcium phosphate, microinjection, electroporation, or via transduction with viral vectors.

Methods for introducing foreign DNA sequences into eukaryote genomes, including plant and yeast genomes include; (1) mechanical methods, such as microinjection of DNA into single cells or protoplasts, vortexing cells with glass beads in the presence of DNA, or shooting DNA-coated tungsten or gold spheres into

cells or protoplasts; (2) introducing DNA by making cell membranes permeable to macromolecules through polyethylene glycol treatment or subjection to high voltage electrical pulses (electroporation); or (3) the use of liposomes (containing cDNA) which fuse to cell membranes.

Once the CTLA4 mutant molecules of the inventions are expressed, they can be harvested by methods well known in the art such as cell lysis (e.g. sonication, lysozyme and/or detergents) and protein recovery performed using standard protein purification means, e.g., affinity chromatography or ion-exchange chromatography, to yield substantially pure product (R. Scopes in: "*Protein Purification, Principles and Practice*", Third Edition, Springer-Verlag (1994); Sambrook et al. (eds.), "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989)). Expression of CTLA4 mutant molecules can be detected by methods known in the art. For example, the mutant molecules can be detected by Coomassie staining SDS-PAGE gels and immunoblotting using antibodies that bind CTLA4.

EXAMPLES

The following Examples are presented to illustrate the present invention and to assist one of ordinary skill in making and using the same. The examples are not intended in any way to otherwise limit the scope of the invention.

EXAMPLE 1

The following provides a description of the methods used to generate the nucleotide sequences encoding the CTLA4 molecules of the invention.

A CTLA4Ig encoding plasmid was first constructed, and shown to express CTLA4Ig molecules as described in U.S. Patent Nos. 5,434,131, 5,885,579 and 5,851,795. Then single-site mutant molecules (e.g., L104EIg) were generated from the CTLA4Ig encoding sequence, expressed and tested for binding kinetics for various B7 molecules. The L104EIg nucleotide sequence (as included in the sequence shown in Figure 18) was used as a template to generate the double-site CTLA4 mutant sequences (as included in the sequences shown in Figures 19-22) which were expressed as proteins and tested for binding kinetics. The double-site CTLA4 mutant sequences include: L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg, and L104EA29WIg. Triple-site mutants were also generated.

CTLA4Ig Construction

A genetic construct encoding CTLA4Ig comprising the extracellular domain of CTLA4 and an IgCgamma1 domain was constructed as described in U.S. Patents 5,434,131, 5,844,095 and 5,851,795, the contents of which are incorporated by reference herein. The extracellular domain of the CTLA4 gene was cloned by PCR using synthetic oligonucleotides corresponding to the published sequence (Dariavach et al., *Eur. Journ. Immunol.* 18:1901-1905 (1988)).

Because a signal peptide for CTLA4 was not identified in the CTLA4 gene, the N-terminus of the predicted sequence of CTLA4 was fused to the signal peptide of oncostatin M (Malik et al., *Mol. and Cell. Biol.* 9:2847 (1989)) in two steps using overlapping oligonucleotides. For the first step, the oligonucleotide, CTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCAATG CACGTGGCCCAGCC (SEQ ID NO:1) (which encoded the C terminal 15 amino acids from the oncostatin M signal peptide fused to the N terminal 7 amino acids of

CTLA4) was used as forward primer, and TTTGGGCTCCTGATCAGAATCTGGG CACGGTTG (SEQ ID NO: 2) (encoding amino acid residues 119-125 of the amino acid sequence encoding CTLA4 receptor and containing a Bcl I restriction enzyme site) as reverse primer. The template for this step was cDNA synthesized from 1 micro g of total RNA from H38 cells (an HTLV II infected T-cell leukemic cell line provided by Drs. Salahudin and Gallo, NCI, Bethesda, MD). A portion of the PCR product from the first step was reamplified, using an overlapping forward primer, encoding the N terminal portion of the oncostatin M signal peptide and containing a Hind III restriction endonuclease site, CTAGCCACTGAAGCTTCACCAATGGGTG TACTGCTCACACA-GAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTC (SEQ ID NO: 3) and the same reverse primer. The product of the PCR reaction was digested with Hind III and Bcl I and ligated together with a Bcl 1/Xba I cleaved cDNA fragment encoding the amino acid sequences corresponding to the hinge, CH2 and CH3 regions of IgC(gamma)1 into the Hind III/Xba I cleaved expression vector, CDM8 or Hind III/Xba I cleaved expression vector piLN (also known as πLN).

DNA encoding the amino acid sequence corresponding to CTLA4Ig has been deposited with the ATCC under the Budapest Treaty on May 31, 1991, and has been accorded ATCC accession number 68629.

CTLA4Ig Codon Based Mutagenesis

A mutagenesis and screening strategy was developed to identify mutant CTLA4Ig molecules that had slower rates of dissociation ("off" rates) from CD80 and/or CD86 molecules i.e. improved binding ability. In this embodiment, mutations were carried out in and/or about the residues in the CDR-1, CDR-2 (also known as the C' strand) and/or CDR-3 regions of the extracellular domain of CTLA4 (as described in U.S. Patents U.S. Patents 6,090,914, 5,773,253 and 5,844,095; in copending U.S. Patent Application Serial Number 60/214,065; and by Peach, R.J., et al *J Exp Med* 1994 180:2049-2058. A CDR-like region encompasses the each CDR region and extends, by several amino acids, upstream and/or downstream of the CDR motif). These sites were chosen based on studies of chimeric CD28/CTLA4 fusion proteins (Peach et al., *J. Exp. Med.*, 1994, 180:2049-2058), and on a model predicting which amino acid residue side chains would be solvent exposed, and a lack of amino acid

residue identity or homology at certain positions between CD28 and CTLA4. Also, any residue which is spatially in close proximity (5 to 20 Angstrom Units) to the identified residues is considered part of the present invention.

To synthesize and screen soluble CTLA4 mutant molecules with altered affinities for a B7 molecule (e.g. CD80, CD86), a two-step strategy was adopted. The experiments entailed first generating a library of mutations at a specific codon of an extracellular portion of CTLA4 and then screening these by BIAcore analysis to identify mutants with altered reactivity to B7. The Biacore assay system (Pharmacia, Piscataway, N.J.) uses a surface plasmon resonance detector system that essentially involves covalent binding of either CD80Ig or CD86Ig to a dextran-coated sensor chip which is located in a detector. The test molecule can then be injected into the chamber containing the sensor chip and the amount of complementary protein that binds can be assessed based on the change in molecular mass which is physically associated with the dextran-coated side of the sensor chip; the change in molecular mass can be measured by the detector system.

Specifically, single-site mutant nucleotide sequences were generated using non-mutated (e.g., wild-type) DNA encoding CTLA4Ig (U.S. Patent Nos: 5,434,131, 5,844,095; 5,851,795; and 5,885,796; ATCC Accession No. 68629) as a template. Mutagenic oligonucleotide PCR primers were designed for random mutagenesis of a specific codon by allowing any base at positions 1 and 2 of the codon, but only guanine or thymine at position 3 (XXG/T or also noted as NNG/T). In this manner, a specific codon encoding an amino acid could be randomly mutated to code for each of the 20 amino acids. In that regard, XXG/T mutagenesis yields 32 potential codons encoding each of the 20 amino acids. PCR products encoding mutations in close proximity to the CDR3-like loop of CTLA4Ig (MYPPPY), were digested with SacI/XbaI and subcloned into similarly cut CTLA4Ig (as included in Figure 24) πLN expression vector. This method was used to generate the single-site CTLA4 mutant molecule L104EIg (as included in Figure 18).

For mutagenesis in proximity to the CDR-1-like loop of CTLA4Ig, a silent NheI restriction site was first introduced 5' to this loop, by PCR primer-directed mutagenesis. PCR products were digested with NheI/XbaI and subcloned into similarly cut CTLA4Ig or L104EIg expression vectors. This method was used to generate the double-site CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg (as included in

Figure 19). In particular, the nucleic acid molecule encoding the single-site CTLA4 mutant molecule, L104EIg, was used as a template to generate the double-site CTLA4 mutant molecule, L104EA29YIg.

The double-site mutant nucleotide sequences encoding CTLA4 mutant molecules, such as L104EA29YIg (deposited on June 19, 2000 with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 and accorded ATCC accession number PTA-2104), were generated by repeating the mutagenesis procedure described above using L104EIg as a template. This method was used to generate numerous double-site mutants nucleotide sequences such as those encoding CTLA4 molecules L104EA29YIg (as included in the sequence shown in Figure 19), L104EA29LIg (as included in the sequence shown in Figure 20), L104EA29TIg (as included in the sequence shown in Figure 21), and L104EA29WIg (as included in the sequence shown in Figure 22). Triple-site mutants, such as those encoding L104EA29YS25KIg, L104EA29YS25NIg and L104EA29YS25RIg, were also generated

The soluble CTLA4 molecules were expressed from the nucleotide sequences and used in the phase II clinical studies described in Example 3, *infra*.

As those skilled-in-the-art will appreciate, replication of nucleic acid sequences, especially by PCR amplification, easily introduces base changes into DNA strands. However, nucleotide changes do not necessarily translate into amino acid changes as some codons redundantly encode the same amino acid. Any changes of nucleotide from the original or wildtype sequence, silent (i.e. causing no change in the translated amino acid) or otherwise, while not explicitly described herein, are encompassed within the scope of the invention.

EXAMPLE 2

The following Example provides a description of the screening methods used to identify the single- and double-site mutant CTLA polypeptides, expressed from the constructs described in Example 1, that exhibited a higher binding avidity for B7 molecules, compared to non-mutated CTLA4Ig molecules.

Current *in vitro* and *in vivo* studies indicate that CTLA4Ig by itself is unable to completely block the priming of antigen specific activated T cells. *In vitro* studies

with CTLA4Ig and either monoclonal antibody specific for CD80 or CD86 measuring inhibition of T cell proliferation indicate that anti-CD80 monoclonal antibody did not augment CTLA4Ig inhibition. However, anti-CD86 monoclonal antibody did augment the inhibition, indicating that CTLA4Ig was not as effective at blocking CD86 interactions. These data support earlier findings by Linsley et al. (*Immunity*, (1994), 1:793-801) showing inhibition of CD80-mediated cellular responses required approximately 100 fold lower CTLA4Ig concentrations than for CD86-mediated responses. Based on these findings, it was surmised that soluble CTLA4 mutant molecules having a higher avidity for CD86 than wild type CTLA4 should be better able to block the priming of antigen specific activated cells than CTLA4Ig.

To this end, the soluble CTLA4 mutant molecules described in Example 1 above were screened using a novel screening procedure to identify several mutations in the extracellular domain of CTLA4 that improve binding avidity for CD80 and CD86. This screening strategy provided an effective method to directly identify mutants with apparently slower "off" rates without the need for protein purification or quantitation since "off" rate determination is concentration independent (O'Shannessy et al., (1993) *Anal. Biochem.*, 212:457-468).

COS cells were transfected with individual miniprep purified plasmid DNA and propagated for several days. Three day conditioned culture media was applied to BIAcore biosensor chips (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) coated with soluble CD80Ig or CD86Ig. The specific binding and dissociation of mutant proteins was measured by surface plasmon resonance (O'Shannessy, D. J., et al., 1997 *Anal. Biochem.* 212:457-468). All experiments were run on BIAcore™ or BIAcore™ 2000 biosensors at 25°C. Ligands were immobilized on research grade NCM5 sensor chips (Pharmacia) using standard N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimidN-hydroxysuccinimide coupling (Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277; Khilko, S.N., et al.(1993) *J. Biol. Chem* 268:5425-15434).

Screening Method

COS cells grown in 24 well tissue culture plates were transiently transfected with mutant CTLA4Ig. Culture media containing secreted soluble mutant CTLA4Ig was collected 3 days later.

Conditioned COS cell culture media was allowed to flow over BIAcore biosensor chips derivitized with CD86Ig or CD80Ig (as described in Greene et al., 1996 *J. Biol. Chem.* 271:26762-26771), and mutant molecules were identified with off-rates slower than that observed for wild type CTLA4Ig. The DNAs corresponding to selected media samples were sequenced and more DNA prepared to perform larger scale COS cell transient transfection, from which CTLA4Ig mutant protein was prepared following protein A purification of culture media.

BIAcore analysis conditions and equilibrium binding data analysis were performed as described in J. Greene et al. 1996 *J. Biol. Chem.* 271:26762-26771 and in U.S. Patent Application Serial Nos. 09/579,927, and 60/214,065 which are herein incorporated by reference.

BIAcore Data Analysis

Senosorgram baselines were normalized to zero response units (RU) prior to analysis. Samples were run over mock-derivatized flow cells to determine background RU values due to bulk refractive index differences between solutions. Equilibrium dissociation constants (K_d) were calculated from plots of R_{eq} versus C, where R_{eq} is the steady-state response minus the response on a mock-derivatized chip, and C is the molar concentration of analyte. Binding curves were analyzed using commercial nonlinear curve-fitting software (Prism, GraphPAD Software).

Experimental data were first fit to a model for a single ligand binding to a single receptor (1-site model, i.e., a simple langmuir system, A+B↔AB), and equilibrium association constants (K_d=[A]•[B]\[AB]) were calculated from the equation $R=R_{max}•C/(K_d+C)$. Subsequently, data were fit to the simplest two-site model of ligand binding (i.e., to a receptor having two non-interacting independent binding sites as described by the equation $R=R_{max1}•C\(K_{d1}+C)+R_{max2}•C\(K_{d2}+C)$.

The goodness-of-fits of these two models were analyzed visually by comparison with experimental data and statistically by an F test of the sums-of-squares. The simpler one-site model was chosen as the best fit, unless the two-site model fit significantly better ($p<0.1$).

Association and disassociation analyses were performed using BIA evaluation 2.1 Software (Pharmacia). Association rate constants k_{on} were calculated in two

ways, assuming both homogenous single-site interactions and parallel two-site interactions. For single-site interactions, k_{on} values were calculated according to the equation $R_t=R_{eq}(1-\exp^{-ks(t-t_0)})$, where R_t is a response at a given time, t; R_{eq} is the steady-state response; t_0 is the time at the start of the injection; and $k_s=dR/dt=k_{on}*Ck_{off}$, where C is a concentration of analyte, calculated in terms of monomeric binding sites. For two-site interactions k_{on} values were calculated according to the equation $R_t=R_{eq1}(1-\exp^{-ks1(t-t_0)})+R_{eq2}(1-\exp^{ks2(t-t_0)})$. For each model, the values of k_{on} were determined from the calculated slope (to about 70% maximal association) of plots of k_s versus C.

Dissociation data were analyzed according to one site (AB=A+B) or two site (AiBj=Ai+Bj) models, and rate constants (k_{off}) were calculated from best fit curves. The binding site model was used except when the residuals were greater than machine background (2-10RU, according to machine), in which case the two-binding site model was employed. Half-times of receptor occupancy were calculated using the relationship $t_{1/2}=0.693/k_{off}$.

Flow Cytometry

Murine mAb L307.4 (anti-CD80) was purchased from Becton Dickinson (San Jose, California) and IT2.2 (anti-B7-0 [also known as CD86]), from Pharmingen (San Diego, California). For immunostaining, CD80-positive and/or CD86-positive CHO cells were removed from their culture vessels by incubation in phosphate-buffered saline (PBS) containing 10mM EDTA. CHO cells (1-10 x 10^5) were first incubated with mAbs or immunoglobulin fusion proteins in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS), then washed and incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse or anti-human immunoglobulin second step reagents (Tago, Burlingame, California). Cells were given a final wash and analyzed on a FACScan (Becton Dickinson).

SDS-PAGE and Size Exclusion Chromatography

SDS-PAGE was performed on Tris/glycine 4-20% acrylamide gels (Novex, San Diego, CA). Analytical gels were stained with Coomassie Blue, and images of

wet gels were obtained by digital scanning. CTLA4Ig (25 μg) and L104EA29YIg (25 μg) were analyzed by size exclusion chromatography using a TSK-GEL G300 SW_{XL} column (7.8 x 300mm, Tosohaas, Montgomeryville, PA) equilibrated in phosphate buffered saline containing 0.02% NAN_3 at a flow rate of 1.0 ml/min.

CTLA4X_{C120S} and L104EA29YX_{C120S}

Single chain CTLA4X_{C120S} was prepared as previously described (Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270:15417-15424). Briefly, an oncostatin M CTLA4 (OMCTLA4) expression plasmid was used as a template, the forward primer, GAGGTGATAAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACAG (SEQ ID NO: 4) was chosen to match sequences in the vector; and the reverse primer, GTGGTGTATTGGTCTAGATCAATCAGAATCTGGGCACGGTTC (SEQ ID NO: 5) corresponded to the last seven amino acids (i.e. amino acids 118-124) in the extracellular domain of CTLA4, and contained a restriction enzyme site, and a stop codon (TGA). The reverse primer specified a C120S (cysteine to serine at position 120) mutation. In particular, the nucleotide sequence GCA (nucleotides 34-36) of the reverse primer shown above is replaced with one of the following nucleotide sequences: AGA, GGA, TGA, CGA, ACT, or GCT. As persons skilled in the art will understand, the nucleotide sequence GCA is a reversed complementary sequence of the codon TGC for cysteine. Similarly, the nucleotide sequences AGA, GGA, TGA, CGA, ACT, or GCT are the reversed complementary sequences of the codons for serine. Polymerase chain reaction products were digested with *Hind*III/*Xba*I and directionally subcloned into the expression vector πLN (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ). L104EA29YX_{C120S} was prepared in an identical manner. Each construct was verified by DNA sequencing.

Identification and Biochemical Characterization of High Avidity Mutants

Twenty four amino acids were chosen for mutagenesis and the resulting ~2300 mutant proteins assayed for CD86Ig binding by surface plasmon resonance (SPR; as described, supra). The predominant effects of mutagenesis at each site are summarized in Table II, *infra*. Random mutagenesis of some amino acids in the

CDR-1 region (S25-R33) apparently did not alter ligand binding. Mutagenesis of E31 and R33 and residues M97-Y102 apparently resulted in reduced ligand binding. Mutagenesis of residues, S25, A29, and T30, K93, L96, Y103, L104, and G105, resulted in proteins with slow "on" and/or slow "off" rates. These results confirm previous findings that residues in the CDR-1 (S25-R33) region, and residues in or near M97-Y102 influence ligand binding (Peach et al., (1994) J. Exp. Med., 180:2049-2058).

Mutagenesis of sites S25, T30, K93, L96, Y103, and G105 resulted in the identification of some mutant proteins that had slower "off" rates from CD86Ig. However, in these instances, the slow "off" rate was compromised by a slow "on" rate that resulted in mutant proteins with an overall avidity for CD86Ig that was apparently similar to that seen with wild type CTLA4Ig. In addition, mutagenesis of K93 resulted in significant aggregation that may have been responsible for the kinetic changes observed.

Random mutagenesis of L104 followed by COS cell transfection and screening by SPR of culture media samples over immobilized CD86Ig yielded six media samples containing mutant proteins with approximately 2-fold slower "off" rates than wild type CTLA4Ig. When the corresponding cDNA of these mutants were sequenced, each was found to encode a leucine to glutamic acid mutation (L104E). Apparently, substitution of leucine 104 to aspartic acid (L104D) did not affect CD86Ig binding.

Mutagenesis was then repeated at each site listed in Table II, this time using L104E as the PCR template instead of wild type CTLA4Ig, as described above. SPR analysis, again using immobilized CD86Ig, identified six culture media samples from mutagenesis of alanine 29 with proteins having approximately 4-fold slower "off" rates than wild type CTLA4Ig. The two slowest were tyrosine substitutions (L104EA29Y), two were leucine (L104EA29L), one was tryptophan (L104EA29W), and one was threonine (L104EA29T). Apparently, no slow "off" rate mutants were identified when alanine 29 was randomly mutated, alone, in wild type CTLA4Ig.

The relative molecular mass and state of aggregation of purified L104E and L104EA29YIg was assessed by SDS-PAGE and size exclusion chromatography. L104EA29YIg (~1 μg; lane 3) and L104EIg (~1 μg; lane 2) apparently had the same electrophoretic mobility as CTLA4Ig (~1 μg; lane 1) under reducing (~50kDa;

+ßME; plus 2-mercaptoethanol) and non-reducing (~100kDa; -ßME) conditions (FIG. 25A). Size exclusion chromatography demonstrated that L104EA29YIg (FIG. 25C) apparently had the same mobility as dimeric CTLA4Ig (FIG. 25B). The major peaks represent protein dimer while the faster eluting minor peak in FIG. 25B represents higher molecular weight aggregates. Approximately 5.0% of CTLA4Ig was present as higher molecular weight aggregates but there was no evidence of aggregation of L104EA29YIg or L104EIg. Therefore, the stronger binding to CD86Ig seen with L104EIg and L104EA29YIg could not be attributed to aggregation induced by mutagenesis.

Equilibrium and Kinetic Binding Analysis

Equilibrium and kinetic binding analysis was performed on protein A purified CTLA4Ig, L104EIg, and L104EA29YIg using surface plasmon resonance (SPR). The results are shown in Table I, *infra*. Observed equilibrium dissociation constants (K_d; Table I) were calculated from binding curves generated over a range of concentrations (5.0-200 nM). L104EA29YIg binds more strongly to CD86Ig than does L104EIg or CTLA4Ig. The lower K_d of L104EA29YIg (3.21 nM) than L104EIg (6.06 nM) or CTLA4Ig (13.9 nM) indicates higher binding avidity of L104EA29YIg to CD86Ig. The lower K_d of L104EA29YIg (3.66 nM) than L104EIg (4.47 nM) or CTLA4Ig (6.51 nM) indicates higher binding avidity of L104EA29YIg to CD80Ig.

Kinetic binding analysis revealed that the comparative "on" rates for CTLA4Ig, L104EIg, and L104EA29YIg binding to CD80 were similar, as were the "on" rates for CD86Ig (Table I). However, "off" rates for these molecules were not equivalent (Table I). Compared to CTLA4Ig, L104EA29YIg had approximately 2-fold slower "off" rate from CD80Ig, and approximately 4-fold slower "off" rate from CD86Ig. L104E had "off" rates intermediate between L104EA29YIg and CTLA4Ig. Since the introduction of these mutations did not significantly affect "on" rates, the increase in avidity for CD80Ig and CD86Ig observed with L104EA29YIg was likely primarily due to a decrease in "off" rates.

To determine whether the increase in avidity of L104EA29YIg for CD86Ig and CD80Ig was due to the mutations affecting the way each monomer associated as a dimer, or whether there were avidity enhancing structural changes introduced into

each monomer, single chain constructs of CTLA4 and L104EA29Y extracellular domains were prepared following mutagenesis of cysteine 120 to serine as described supra, and by Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270:15417-15424 (84). The purified proteins CTLA4X$_{C120S}$ and L104EA29YX$_{C120S}$ were shown to be monomeric by gel permeation chromatography (Linsley et al., (1995), supra), before their ligand binding properties were analyzed by SPR. Results showed that binding affinity of both monomeric proteins for CD86Ig was approximately 35-80-fold less than that seen for their respective dimers (Table I). This supports previously published data establishing that dimerization of CTLA4 was required for high avidity ligand binding (Greene et al., (1996) J. Biol. Chem., 271:26762-26771).

L104EA29YX$_{C120S}$ bound with approximately 2-fold higher affinity than CTLA4X$_{C120S}$ to both CD80Ig and CD86Ig. The increased affinity was due to approximately 3-fold slower rate of dissociation from both ligands. Therefore, stronger ligand binding by L104EA29Y was most likely due to avidity enhancing structural changes that had been introduced into each monomeric chain rather than alterations in which the molecule dimerized.

Location and Structural Analysis of Avidity Enhancing Mutations

The solution structure of the extracellular IgV-like domain of CTLA4 has recently been determined by NMR spectroscopy (Metzler et al., (1997) Nature Struct. Biol., 4:527-531). This allowed accurate location of leucine 104 and alanine 29 in the three dimensional fold (FIG. 26 left and right depictions). Leucine 104 is situated near the highly conserved MYPPPY amino acid sequence. Alanine 29 is situated near the C-terminal end of the CDR-1 (S25-R33) region, which is spatially adjacent to the MYPPPY region. While there is significant interaction between residues at the base of these two regions, there is apparently no direct interaction between L104 and A29 although they both comprise part of a contiguous hydrophobic core in the protein. The structural consequences of the two avidity enhancing mutants were assessed by modeling. The A29Y mutation can be easily accommodated in the cleft between the CDR-1 (S25-R33) region and the MYPPPY region, and may serve to stabilize the conformation of the MYPPPY region. In wild type CTLA4, L104 forms extensive hydrophobic interactions with L96 and V94 near the MYPPPY region. It is

highly unlikely that the glutamic acid mutation adopts a conformation similar to that of L104 for two reasons. First, there is insufficient space to accommodate the longer glutamic acid side chain in the structure without significant perturbation to the CDR-1 (S25-R33 region). Second, the energetic costs of burying the negative charge of the glutamic acid side chain in the hydrophobic region would be large. Instead, modeling studies predict that the glutamic acid side chain flips out on to the surface where its charge can be stabilized by solvation. Such a conformational change can easily be accommodated by G105, with minimal distortion to other residues in the regions.

Binding of High Avidity Mutants to CHO Cells Expressing CD80 or CD86

FACS analysis (Fig. 27) of CTLA4Ig and mutant molecules binding to stably transfected CD80+ and CD86+CHO cells was performed as described herein. CD80-positive and CD86-positive CHO cells were incubated with increasing concentrations of CTLA4Ig, L104EA29YIg, or L104EIg, and then washed. Bound immunoglobulin fusion protein was detected using fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-human immunoglobulin.

As shown in Figure 27, CD80-positive or CD86-positive CHO cells ($1.5x10^5$) were incubated with the indicated concentrations of CTLA4Ig (closed squares), L104EA29YIg (circles), or L104EIg (triangles) for 2 hr. at 23°C, washed, and incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-human immunoglobulin antibody. Binding on a total of 5,000 viable cells was analyzed (single determination) on a FACScan, and mean fluorescence intensity (MFI) was determined from data histograms using PC-LYSYS. Data were corrected for background fluorescence measured on cells incubated with second step reagent only (MFI = 7). Control L6 mAb (80 μg/ml) gave MFI < 30. These results are representative of four independent experiments.

Binding of L104EA29YIg, L104EIg, and CTLA4Ig to human CD80-transfected CHO cells is approximately equivalent (FIG. 27A). L104EA29YIg and L104EIg bind more strongly to CHO cells stably transfected with human CD86 than does CTLA4Ig (FIG. 27B).

Functional Assays

at 91

Human CD4-positive T cells were isolated by immunomagnetic negative selection (Linsley et al., (1992) J. Exp. Med. 176:1595-1604). Isolated CD4-positive T cells were stimulated with phorbal myristate acetate (PMA) plus CD80-positive or CD86-positive CHO cells in the presence of titrating concentrations of inhibitor. CD4-positive T cells (8-10 x 10^4/well) were cultured in the presence of 1 nM PMA with or without irradiated CHO cell stimulators. Proliferative responses were measured by the addition of 1 μCi/well of [3H]thymidine during the final 7 hours of a 72 hour culture. Inhibition of PMA plus CD80-positive CHO, or CD86-positive CHO, stimulated T cells by L104EA29YIg and CTLA4Ig was performed. The results are shown in FIG. 28. L104EA29YIg inhibits proliferation of CD80-positive PMA treated CHO cells more than CTLA4Ig (FIG. 28A). L104EA29YIg is also more effective than CTLA4Ig at inhibiting proliferation of CD86-positive PMA treated CHO cells (FIG. 28B). Therefore, L104EA29YIg is a more potent inhibitor of both CD80- and CD86-mediated costimulation of T cells.

Figure 29 shows inhibition by L104EA29YIg and CTLA4Ig of allostimulated human T cells prepared above, and further allostimulated with a human B lymphoblastoid cell line (LCL) called PM that expressed CD80 and CD86 (T cells at 3.0x10^4/well and PM at 8.0x10^3/well). Primary allostimulation occurred for 6 days, then the cells were pulsed with ^{3}H-thymidine for 7 hours, before incorporation of radiolabel was determined.

Secondary allostimulation was performed as follows. Seven day primary allostimulated T cells were harvested over lymphocyte separation medium (LSM) (ICN, Aurora, OH) and rested for 24 hours. T cells were then restimulated (secondary), in the presence of titrating amounts of CTLA4Ig or L104EA29YIg, by adding PM in the same ratio as above. Stimulation occurred for 3 days, then the cells were pulsed with radiolabel and harvested as above. The effect of L104EA29YIg on primary allostimulated T cells is shown in FIG. 29A. The effect of L104EA29YIg on secondary allostimulated T cells is shown in FIG. 29B. L104EA29YIg inhibits both primary and secondary T cell proliferative responses better than CTLA4Ig.

To measure cytokine production (Figure 30), duplicate secondary allostimulation plates were set up. After 3 days, culture media was assayed using ELISA kits (Biosource, Camarillo, CA) using conditions recommended by the manufacturer. L104EA29YIg was found to be more potent than CTLA4Ig at

blocking T cell IL-2, IL-4, and γ-IFN (gamma-IFN) cytokine production following a secondary allogeneic stimulus (FIGS. 30A-C).

The effects of L104EA29YIg and CTLA4Ig on monkey mixed lymphocyte response (MLR) are shown in Figure 31. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC'S; $3.5x10^4$ cells/well from each monkey) from 2 monkeys were purified over lymphocyte separation medium (LSM) and mixed with 2μg/ml phytohemaglutinin (PHA). The cells were stimulated 3 days then pulsed with radiolabel 16 hours before harvesting. L104EA29YIg inhibited monkey T cell proliferation better than CTLA4Ig.

TABLE I

Equilibrium and apparent kinetic constants are given in the following table (values are means ± standard deviation from three different experiments)

Immobilized Protein	Analyte	k_{on} (x 10^5) $M^{-1}S^{-1}$	k_{off} (x 10^{-3}) S^{-1}	K_d nM
CD80Ig	CTLA4Ig	3.44 ± 0.29	2.21 ± 0.18	6.51 ± 1.08
CD80Ig	L104EIg	3.02 ± 0.05	1.35 ± 0.08	4.47 ± 0.36
CD80Ig	L104EA29YIg	2.96 ± 0.20	1.08 ± 0.05	3.66 ± 0.41
CD80Ig	$CTLA4X_{C120S}$	12.0 ± 1.0	230 ±10	195 ± 25
CD80Ig	$L104EA29YX_{C120S}$	8.3 ± 0.26	71 ± 5	85.0 ± 2.5
CD86Ig	CTLA4Ig	5.95 ± 0.57	8.16 ± 0.52	13.9 ± 2.27
CD86Ig	L104EIg	7.03 ± 0.22	4.26 ± 0.11	6.06 ± 0.05
CD86Ig	L104EA29YIg	6.42 ± 0.40	2.06 ± 0.03	3.21 ± 0.23
CD86Ig	$CTLA4X_{C120S}$	16.5 ± 0.5	840 ± 55	511 ± 17
CD86Ig	$L104EA29YX_{C120S}$	11.4 ± 1.6	300 ± 10	267 ± 29

TABLE II

The effect on CD86Ig binding by mutagenesis of CTLA4Ig at the sites listed was determined by SPR, described supra. The predominant effect is indicated with a "+" sign.

Mutagenesis Site	Effects of Mutagenesis		
	No Apparent Effect	Slow "on" rate/ slow "off rate	Reduced ligand binding
S25		+	

Mutagenesis Site	Effects of Mutagenesis		
	No Apparent Effect	Slow "on" rate/ slow "off rate	Reduced ligand binding
P26	+		
G27	+		
K28	+		
A29		+	
T30		+	
E31			+
R33			+
K93		+	
L96		+	
M97			+
Y98			+
P99			+
P100			+
P101			+
Y102			+
Y103		+	
L104		+	
G105		+	
I106	+		
G107	+		
Q111	+		
Y113	+		
I115	+		

EXAMPLE 3

The following provides a description of phase II clinical studies of human patients administered soluble CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg (also known as L104EA29YIG or LEA) or CTLA4Ig, to relieve at least one symptom associated with rheumatoid arthritis, including reducing: joint swelling, joint tenderness, inflammation, morning stiffness, and pain. The CTLA4Ig molecule used herein begins with methionine at position +1 (or alternatively with alanine at position -1) and ends with lysine at position +357 as shown in Figure 24. DNA encoding an embodiment of the CTLA4Ig molecule has been deposited as ATCC 68629. The L104EA29YIg molecule used herein begins with methionine at position +1 (or alternatively with alanine at position -1) and ends with lysine at position +357 as shown in Figure 19. DNA encoding an embodiment of the L104EA29YIg molecule has been deposited as ATCC PTA 2104.

Additionally, the following provides a description of human patients administered L104EA29YIg or CTLA4Ig to relieve at least one biological surrogate marker associated with rheumatoid arthritis, including reducing erythrocyte sedimentation rates, and serum levels of C-reactive protein and/or IL2 receptor.

Patient Cohorts

A total of 214 patients, including 54 males and 160 females, participated in the study (Figures 1A, 1B). The patients at baseline had a mean disease duration of 3.4 (±2.0) years and had failed at least one Disease Modifying Antirheumatic Drug (DMARD). Stable Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDS) or steroids (≤ 10 mg/day) were permitted and concomitant DMARDS were prohibited. The patients were randomized into groups of 25 to 32 patients per treatment group. Thirty-two patients received a placebo, 92 received L104EA29YIg, and 90 received CTLA4Ig. The patients who followed protocol guidelines and did not discontinue before day 57 received a total of 4 intravenous infusions, one infusion each on days 1, 15, 29, and 57. All patients were evaluated on days 1, 15, 29, 43, 57, 71, and 85. The doses administered included 0.5, 2.0, or 10.0 mg/kg of L104EA29YIg (denoted as LEA.5, LEA2 and LEA10, respectively in Figures 1A-1E) or of CTLA4Ig (denoted as CTLA.5, CTLA2 and CTLA10, respectively in Figures 1A-1E).

All subjects were monitored for peri-infusional adverse events and global safety by answering a questionnaire listing potential adverse events. The patients were questioned about potential adverse events that may have occurred within twenty-four hours post-infusion. In addition, the patients were encouraged to spontaneously report any adverse events that they experienced. The physicians routinely monitored laboratory samples from the patients for abnormalities in blood chemistry and hematology e.g. assessed the levels of inflammatory response mediators such as cytokines (TNF, IL-6), tryptase and complement. The primary endpoint was the proportion of subjects meeting the ACR 20 criteria on day 85.

Storage of Test Material

The CTLA4Ig and L104EA29YIg were supplied in single-use glass vials containing 200 mg/vial of CTLA4Ig or 100 mg/vial of L104EA29YIg, respectively.

Prior to infusion, the CTLA4Ig and L104EA29YIg were diluted to a final concentration of 25 mg/ml with sterile water for injection (SWFI).

Administration Protocol

All infusions were administered intravenously over 1 hour (Figures 1 through 17). All subjects received at least one infusion of study medication.

Group 1: 32 patients, CTLA4Ig or L104EA29YIg matching placebo.
Group 2: 26 patients; dosage 0.5 mg/kg of CTLA4Ig.
Group 3: 32 patients; dosage 2.0 mg/kg of CTLA4Ig.
Group 4: 32 patients; dosage 10.0 mg/kg of CTLA4Ig.
Group 5: 32 patients; dosage 0.5 mg/kg of L104EA29YIg.
Group 6: 29 patients; dosage 2.0 mg/kg of L104EA29YIg.
Group 7: 31 patients; dosage 10.0 mg/kg of L104EA29YIg.

Clinical Monitoring

Patients were evaluated for baseline symptoms of disease activity prior to receiving any infusions. These baseline evaluations included: joint swelling, joint tenderness, inflammation, morning stiffness, disease activity evaluated by patient and physician as well as disability evaluated by Health Questionnaire Assessment (HAQ) (reported as a physical function score in Figure 1C), and pain (Figures 1A to 1D). Additionally, the baseline evaluations included erythrocyte sedimentation rates (ESR), and serum levels of C-reactive protein (CRP) and soluble IL-2 receptor (IL-2r) (Figures 1C and 1D).

The clinical response studies were based on the criteria established by the American College of Rheumatology (ACR). A subject satisfied the ACR20 criterion if there was a 20 percent improvement in tender and swollen joint counts and 20 percent improvement in three of the five remaining symptoms measured, such as patient and physician global disease changes, pain, disability, and an acute phase reactant (Felson, D. T., et al., 1993 *Arthritis and Rheumatism* 36:729-740; Felson, D. T., et al., 1995 *Arthritis and Rheumatism* 38:1-9). Similarly, a subject satisfied the ACR50 or ACR70 criterion if there was a 50 or 70 percent improvement, respectively, in tender and swollen joint counts and 50 or 70 percent improvement,

respectively, in three of the five remaining symptoms measured, such as patient and physician global disease changes, pain, physical disability, and an acute phase reactant such as CRP or ESR.

Biomarkers

Potential biomarkers of disease activity (rheumatoid factor, CRP, ESR, soluble IL-2R, soluble ICAM-1, soluble E-selectin, and MMP-3) were also assessed. Validated enzyme immunoassay (EIA) methods were used to determine the serum concentration of IL-2sRα, sICAM-1, sE-selectin and MMP-3. TNFα and IL-6 were assessed at infusion pre and 2 hours post, if necessary.

IL-2sRα, sICAM-1, and sE-selectin were measured using commercially available colorimetric EIA kits from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). The lower and upper limits of quantitation were 312-20,000 pg/mL, 40-907 ng/mL and 10-206 ng/mL, respectively. The inter-assay coefficient of variation ranged from 4.48-8.4%, 3.8-5.0% and 5.5-9.0% respectively. According to the kit manufacturer, normal serum values range from 676-2,132 pg/mL, respectively.

MMP-3 was measured using a commercially available colorimetric EIA kit from Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). The lower and upper limits of quantitation were 30-7,680 ng/mL. The inter-assay coefficient of variation ranged from 6.3-10.6%. According to the kit manufacturer, normal serum values range from 28-99 ng/mL.

IL-6 and TNFα were measured using commercially available chemiluminescent EIA kits from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). The lower and upper limits of quantitation were 0.3-3,000 pg/mL and 0.7-7,000 pg/mL, respectively. The inter-assay coefficient of variation ranged from 3.1-5.7% and 6.4-20.7%, respectively. According to the kit manufacturer, normal serum values range from <0.3-12 pg/mL and <0.7-7.5 pg/mL.

Antibody testing

Serum samples were obtained for assessment of drug-specific antibodies prior to dosing on day 1, and approximately on days 15, 29, 57, 85 and 169. Due to high, preexisting titers directed to the immunoglobulin (Ig) portion of the molecule,

specific antibody formation against CTLA4Ig and L104EA29YIG without Ig constant regions was also assessed.

Ninety-six well Immulon II ELISA plates (Dynex, Chantilly, Virginia) were coated with CTLA4Ig, CTLA4Ig without the Ig constant regions, L104EA29YIG, or L104EA29YIG without the Ig constant regions at 2, 4, 2, or 1 μg/ml in phosphate buffered saline (PBS), respectively, and incubated overnight at 2-8°C. The plates were washed with PBS containing 0.05% Tween 20 and blocked for 1 hour at 37°C with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA). The plates were then washed and serial dilutions of the test sera or quality control (QC) sera were added to the appropriate wells and incubated for 2 hours at 37°C. Sera was diluted threefold in PBS with 0.25% BSA and 0.05% Tween 20 starting at a 1:10 dilution. Plates were washed and an alkaline-phosphatase-conjugated goat anti-human kappa and lambda (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama) antibody cocktail was added. Following a 1-hour incubation at 37°C, the plates were washed and 1 mg/ml para-nitrophenyl phosphate in diethanolamine buffer was added to each well. After 30 minutes at 25°C, the reactions were stopped with 3N NaOH and the absorbance (dual wavelength: 405 nm and 550 nm) was recorded. Results were expressed as endpoint titer (EPT), defined as the reciprocal of the highest dilution that resulted in an absorbance reading fivefold greater than or equal to the mean plate-background absorbance. Plate background was determined as the absorbance measurement recorded in the absence of serum. Values were considered positive for seroconversion if they were at least two serial dilutions (ninefold) or greater relative to predose EPT values. Serum QC samples positive for either CTLA4Ig- or L104EA29YIG-specific antibodies were generated from immunized monkeys. An aliquot of the appropriate QC sample was assayed during each analytical run. Analytical runs were accepted only when the QC samples were within the assay acceptance criteria.

Results

CTLA4Ig and L104EA29YIg were generally well-tolerated at all dose-levels. Peri-infusional adverse events were similar across all dose groups, with the exception of headaches. Headache response of patients on day 85 increased dose-dependently 23%, 44%, and 53% in CTLA4Ig-treated patients, and 34%, 45%, and 61% in

L104EA29YIg-treated patients, at 0.5, 2.0, and 10.0 mg/kg respectively. In contrast, 31% of the patients administered placebos experienced headaches.

· The percent of patients that discontinued from the clinical study due to arthritis flares and other adverse events is summarized in Figure 2. A much higher percentage of patients on placebo discontinued treatment due to arthritis flare. The CTLA4Ig treated patients discontinued treatment less with increasing doses. Very few patients treated with L104EA29YIg discontinued treatment. These results indicate a good inverse dose-dependent response for CTLA4Ig, and a stronger therapeutic response with L104EA29YIg therapy.

The ACR-20, -50, and -70 responses of patients treated with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo at day 85 are summarized in Figure 3A. Similarly, Figures 3B and C describe the ACR-20 responses with 95% confidence limits. The responses appear to be dose-dependent with a clear significant response at 10 mg/kg per body weight of the patient.

The percent of patients having reduced swollen and tender joint counts compared to the patients having no response to treatment with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo, is shown in Figures 4A and B. The therapeutic responses appear to be dose-dependent. A larger percentage of patients show improvement of 20, 50, 70, and even 100% in the 2 and 10 mg/kg groups for both products.

The percent of patients having reduced pain, disease activity evaluated by patient and physician mean score units with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo, is shown in Figures 5A, B, C, and D. The therapeutic responses, as monitored by the Likert scale, appear to be dose-dependent in favor of the active treatment groups as compared to placebo on day 85. The Likert scale is a validated verbal rating scale using adjectives to rank the symptoms (The American College of Rheumatology Preliminary Core Set of Disease Activity Measures for Rheumatoid Arthritis Clinical Trials: Arthritis and Rheumatism, June 1993, 36(6):729-740).

The patient and physician assessments of disease activity change from the baseline by at least 2 units, resulting from treatment with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo, are shown in Figures 6A and B. The responses appear to be dose-dependent with more marked improvement for the higher doses of active drugs.

The percent reduction in C-reactive protein (CRP) levels in patients treated with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo, is shown in Figures 7A and B. The

responses appear to be dose-dependent with a clear decrease for the 2 and 10 mg/kg active treatment groups. In addition, Figure 7B showed that the difference is quite significant compared to placebo with 95% confidence intervals. Figure 7C shows the changes in serum level changes from baseline at day 85.

The amount of serum soluble IL-2 receptor in patients treated with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo, is shown in Figure 8. The reduction in soluble IL-2 receptor levels appears to be dose-dependent.

The amount of serum soluble ICAM-1 and soluble E-selectin in patients treated with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo, is shown in Figure 33. The reduction in soluble ICAM-1 and soluble E-selectin levels appears to be dose-dependent.

The median and mean tender joint counts in patients treated with CTLA4Ig or placebo over time are shown in Figures 9A and B. The change from baseline (e.g., reduction in tender joints) appears to be more important in the 2 and 10 mg/kg treated groups, than in the placebo or 0.5 mg/kg groups.

The median and mean swollen joint counts in patients treated with CTLA4Ig or placebo over time are shown in Figures 10A and B. The change from baseline (e.g., reduction in swollen joints) appears to be more important in the 2 and 10 mg/kg treated groups than placebo or 0.5 mg/kg groups.

The mean pain assessment scores over time in patients treated with CTLA4Ig or placebo are shown in Figure 11. The change from baseline (e.g., reduction in pain) appears to be more important in the 2 and 10 mg/kg treated groups than placebo or 0.5 mg/kg groups.

The mean disease activity assessment scores assessed by patient or physician in patients treated with CTLA4Ig or placebo over time are shown in Figures 12A and B. The change from baseline (e.g., reduction in disease activity) appears to be more important in the 2 and 10 mg/kg treated groups than placebo or 0.5 mg/kg groups.

The median and mean tender joint counts in patients treated with L104EA29YIg (denoted as LEA in the figures) or placebo over time are shown in Figures 13A and B. The change from baseline (e.g., reduction in tender joints) appears to be dose-dependent.

The median and mean swollen joint counts in patients treated with L104EA29YIg (denoted as LEA in the figures) or placebo over time are shown in

Figures 14A and B. The change from baseline (e.g., reduction in swollen joints) appears to be more important in the 2 and 10 mg/kg treated groups than placebo or 0.5 mg/kg groups.

The mean pain assessment scores in patients treated with L104EA29YIg (denoted as LEA in the figures) or placebo over time are shown in Figure 15. The change from baseline (e.g., reduction in pain) appears to be dose-dependent.

The mean disease activity assessment scores evaluated by patient or physician in patients treated with L104EA29YIg (denoted as LEA in the figures) or placebo over time are shown in Figures 16A and B. The change from baseline (e.g., reduction in disease activity) appears to be dose-dependent.

The percent improvement of physical disability assessed by HAQ at day 85 for patients treated with CTLA4Ig, L104EA29YIg, or placebo are shown in Figure 17 (Health Assessment Questionnaire (HAQ); Fries, J. F., et al., 1982 *J. of Rheumatology* 9:789-793). There is a clear dose dependent improvement with this parameter.

The changes from baseline for soluble IL-2r and C-reactive protein levels were dose-dependent in both treatment groups. After treatment, soluble IL-2r levels were -2%, -10%, and -22% for CTLA4Ig and -4%, -18%, and -32% for L104EA29YIg at 0.5, 2.0, and 10.0 mg/kg respectively, compared to +3% for the placebo. C-reactive protein levels were +12%, -15%, and -32% for CTLA4Ig and +47%, -33%, and -47% for L104EA29YIg at 0.5, 2.0, and 10.0 mg/kg respectively, compared to +20% for the placebo (Figure 7A).

No clinically remarkable findings with respect to routine hematology testing, chemistry laboratory testing with the exception of slight suppressions in IgA and IgG levels at the higher doses of both drugs, physical findings, or vital signs assessments were observed. Notably, neither medication induced drug-specific antibodies.

EXAMPLE 4

The following Examples describe phase II clinical studies of human patients that will be administered L104EA29YIg, to reduce or prevent structural damage, including bone or joint erosion using validated radiographic scales. This

improvement in reducing or preventing structural damage is parallel to the clinical improvement measured by the clinical parameters.

The status of the bone structure is monitored in some of the human patients prior to treatment with CTLA4Ig or L104EA29YIg. These patients are administered from 0.5 to 20 mg/kg of CTLA4Ig or L104EA29YIg chronically every two to twelve weeks (alone or in combination with other agents) to maintain their therapeutic improvement over time. Radiographs of patients' hands and feet are taken at predefined intervals: 6 months, and then yearly, as recommended by the FDA guidelines. These patients are monitored in long-term extension after 6 and 12 months to determine if treatment with CTLA4Ig or L104EA29YIg reduces the progression of bone deterioration, and then yearly. The patients are monitored by radiographic methods, including X-ray and/or magnetic resonance imaging (MRI), according to standard practice in the art (Larsen, A. K. and M. Eek 1977 *Acta. Radiol. Diag.* 18:481-491; Sharp, J. T., et al., 1985 *Arthritis and Rheumatism* 28:1326-1335). The results of the radiographic data are evaluated for prevention of structural damage, including slowing the progression of bone erosion and cartilage damage, with joint space narrowing and/or prevention of new erosions.

EXAMPLE 5

A Study to Evaluate the Safety and Clinical Efficacy of Two Different Doses of CTLA4Ig Administered Intravenously to Subjects with Active Rheumatoid Arthritis While Receiving Methotrexate

Rheumatoid Arthritis (RA) treatment is rapidly changing with an increased willingness to use more aggressive therapies to achieve larger increases in efficacy and higher success rates. The ultimate goal is to improve the subject condition in a more intensive way, by raising the rate of major and complete clinical response, to treatment and maintaining this benefit with acceptable safety.

Methotrexate remains the cornerstone of the RA treatment. It was the first agent that demonstrated early onset of action, superior efficacy and tolerability compared to the classical DMARDs (e.g. gold, hydroxychloroquine, sulfasalazine) used to treat RA. Clinical benefit may be seen as early as 3 weeks after initiating

treatment, and the maximal improvement is generally achieved by 6 months. However, methotrexate has a number of limitations. For example, despite its increased tolerability, the window between efficacy and liver toxicity is quite narrow. Subjects treated with methotrexate require careful monitoring and unacceptable toxicity is often the reason for discontinuation of treatment.

Methotrexate also does not appear to efficiently control disease progression or joint deterioration. For some subjects, practitioners feel compelled to add a second DMARD with the hope of increasing efficacy despite the risk of increased toxicity. Alternatively, co-treatment with methotrexate and a costimulator blocker (e.g. CD80 and CD86 blockers such as CTLA4Ig) that target the auto-immune mechanism that lies upstream of the cytokine inflammatory cascade, may also increase efficacy.

As noted in Example 3, above, significant clinical responses and reductions in surrogate markers of disease activity were observed for CTLA4Ig at doses of 2 and 10 mg/kg with a good tolerability profile. It has also been confirmed that the composition CTLA4Ig, used in Example 3 above, did not induce any side effects. As a result, it was decided to continue the clinical development of CTLA4Ig for rheumatoid arthritis in Phase IIB.

The following provides a description of a Phase IIB clinical study of human patients administered soluble CTLA4 molecule with methotrexate, and the results of the study after six months.

This Example describes a twelve month study in which primary efficacy was assessed after all subjects completed six months of treatment or discontinue therapy. Efficacy, safety, and disease progression were also assessed throughout the duration of the study.

The study utilized a randomized, double blind, placebo controlled, parallel dosing design. The study was designed to evaluate the safety, clinical activity, immunogenicity and pharmacokinetics of two doses of CTLA4Ig: 2 or 10 mg/kg. A total of approximately 330 subjects with active RA and receiving methotrexate were randomized to 1 of 3 dosing arms: CTLA4Ig at 2 mg/kg (N = 110), 10 mg/kg (N = 110) and placebo control group (N = 110) given monthly infusions for 12 months. All groups continued on weekly methotrexate treatment (10-30 mg weekly) (Figures 57-62).

CTLA4Ig or a placebo were also administered on Day 15. Each dose of study medication was infused intravenously over approximately 30 minutes. The primary efficacy endpoint was the ACR 20 response rate after 6 months.

For the first 6 months, subjects were not allowed to alter their doses of corticosteroids, glucocorticoids or NSAIDs. Increases in methotrexate were also not permitted during the first six months. Decreases in methotrexate were permitted only if it was felt to be causing toxicity. Subjects were treated with methotrexate for at least 6 months, and at a stable dose for 28 days prior to first treatment of CTLA4Ig or placebo. DMARDs other than methotrexate were not permitted. Low-dose stable corticosteroids use (at 10 mg daily or less) and/or use of stable non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), including acetyl salicylic acid (ASA), was allowed. Analgesics that did not contain ASA or NSAIDs were permitted in subjects experiencing pain not adequately controlled by the baseline and study medications, except for 12 hours before a joint evaluation. Decreases in NSAIDs were permitted but only if due to adverse events such as gastrointestinal toxicity.

Test Product, Dose and Mode of Administration, Duration of Treatment

CTLA4Ig at 2 mg/kg or 10 mg/kg was infused every two weeks for the first month, and monthly thereafter for 12 months.

All subjects received weekly doses of methotrexate (10-30 mg) for at least six months prior to randomization and maintained at the entry dose for the first 6 months of the trial. Doses could only be decreased for toxicity during the first six months.

Criteria for Evaluation

The primary endpoint of the first stage of the study was the proportion of subjects meeting the American College of Rheumatology criteria for 20% improvement (ACR 20) on Day 180 (month six). The ACR 20 definition of improvement is a 20% improvement from baseline in the number of tender and swollen joint counts, and a 20% improvement from baseline in 3 of the following 5 core set measurements: subject global assessment of pain, subject global assessment of disease activity, physician global assessment of disease activity, subject assessment of physical function and acute phase reactant value (C-reactive protein (CRP)). The evaluation for 50% improvement (ACR 50) and 70% improvement

(ACR 70) follow similarly. Subjects who discontinued the study due to lack of efficacy (i.e. worsening RA) were considered as ACR non-responders from that time on. For all subjects who dropped out for other reasons, their ACR response at the time of discontinuation was carried forward.

Statistical Methods

Two doses of CTLA4Ig (2 mg/kg and 10 mg/kg) were compared with the placebo control group. All subjects were maintained at the same stable entry doses of methotrexate. The primary analysis was the comparison of CTLA4Ig 10 mg/kg with placebo. Sample sizes were based on a 5% level (2-tailed) of significance. Based on published studies, the placebo plus methotrexate control ACR 20 response rate at 6 months is about 25%. A sample of 107 subjects (adjusted for a possible 15% dropout) per treatment arm was determined to yield a 94% power to detect a difference of 25% at the 5% level (two-tailed). Similarly, the sample was determined to yield a power of 95% and 90% to detect differences of 20% and 14% in ACR 50 and ACR 70, respectively. If the comparison between CTLA4Ig 10 mg/kg and placebo was significant with regards to ACR 20, then the comparison between CTLA4Ig 2 mg/kg and placebo was carried out. This second testing should have a power of 88%. This sequentially rejective procedure based on Chi-square tests was also used to test for differences in ACR 50 and ACR 70 responses.

All efficacy analyses were based on a data set containing all available assessments from all subjects who received at least one dose of study medication.

Percent changes from baseline were also reported for the individual components of the ACR. For subjects who discontinued, their last observation was carried forward.

Results

Demography and Baseline Characteristics

TABLE III

Subject Disposition and Demographics

	Methotrexate + CTLA4Ig 10 mg/kg	Methotrexate + CTLA4Ig 2 mg/kg	Methotrexate + Placebo
Enrolled/Randomized	115	105	119
Completed	99 (86.1%)	82 (78.1%)	78 (65.5 %)
Discontinued	16 (13.9%)	23 (21.9%)	41 (34.5%)
- Adverse Events	2 (1.7%)	7 (6.7%)	7 (5.9%)
- Lack of Efficacy	12 (10.4%)	13 (12.4%)	29 (24.4%)
- Other	2 (1.7%)	3 (2.9%)	5 (4.2%)
Age (yrs) - Mean (Range)	55.8 (17 - 83)	54.4 (23 - 80)	54.7 (23 - 80)
Weight (kg) - Mean (Range)	77.8 (40.1 - 144)	78.7 (48.4 - 186.8)	79.9 (44 - 140)
Sex	75% females	63 % females	66% females
Race	87% white	87% white	87% white
Duration of Disease (yrs) Mean ± SD	9.7 ± 9.8	9.7 ± 8.1	8.9 ± 8.3

Demographic and baseline clinical characteristics were similar among the treatment groups. Sixty three to 75 percent of subjects were female, 87% were Caucasian. The mean duration of the disease at entry was 9.7 ± 9.8, 9.7 ± 8.1, and 8.9 ± 8.3 years respectively in the 10, 2 mg/kg and the control group. The mean weight in kg was very similar between 77.8 and 79.9 kg with a range of 40.1 to 186.8 kg (Table III).

After 6 months, more subjects had discontinued from the control group (35.5%) than from the active treatment groups; 13.9% and 21.9% for the 10 and 2 mg/kg treated groups, respectively. The main reason was lack of efficacy: with 24.3% discontinuing in the control group, as opposed to 12.4% and 10.4% discontinuing in the 2 and 10 mg/kg groups, respectively. The discontinuation rate due to adverse events was lower in the 10 mg/kg group with 1.7%, while it was 6.7% and 5.9% in the 2 mg/kg and the control groups, respectively.

During the first 3-4 months, the discontinuations appeared at a faster rate in the control group compared to the active-treatment groups. After Day 120, the discontinuations for all treatment groups stabilized for the duration of the primary treatment period (six months).

TABLE IV

Baseline Clinical Characteristics

106

	Methotrexate + CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	Methotrexate + CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	Methotrexate + Placebo (n = 119)
Tender Joints (mean ± SD)	30.8 ± 12.2	28.2 ± 12.0	29.2 ± 13.0
Swollen Joints (mean ± SD)	21.3 ± 8.4	20.2 ± 8.9	21.8 ± 8.8
Pain (VAS 100 mm) (mean ± SD)	62.1 ± 21.4	64.5 ± 22.3	65.2 ± 22.1
Physical Function (MHAQ score of 0 to 3) (mean ± SD)	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.6
Subject global assessment (VAS 100 mm) (mean ± SD)	60.1 ± 20.7	59.4 ± 23.7	62.8 ± 21.6
Physician global assessment (VAS 100 mm) (mean ± SD)	62.1 ± 14.8	61.0 ± 16.7	63.3 ± 15.5
CRP (mg/dL)	2.9 ± 2.8	3.2 ± 2.6	3.2 ± 3.2
Morning Stiffness (in min.)	97.9 ± 63.1	104.1 ± 63.9	106.0 ± 64.2

The mean number of tender and swollen joints at baseline was comparable among the three treatment groups. The mean number of tender joints and swollen joints in the 10 mg group was 30.8 ± 12.2 and 21.3 ± 8.4, respectively. The mean number of tender joints and swollen joints in the 2 mg group was 28.2 ± 12.0, and 20.2 ± 8.9, respectively. The mean number of tender joints and swollen joints in the control group was 29.2 ± 13.0, and 21.8 ± 8.8, respectively. These assessments and all other clinical assessments were similar among all treatment groups (Table IV).

ACR Responses and Core Components

TABLE V

ACR Response at 6 months

	Methotrexate + CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	Methotrexate + CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	Methotrexate + Placebo (n = 119)
ACR 20	60.0%	41.9%	35.3%
Difference from control group	24.7	6.6	-

107

	Methotrexate + CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	Methotrexate + CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	Methotrexate + Placebo (n = 119)
95% CI	11.9, 37.5	-6.2, 19.4	-
p-value	< 0.001	0.31	-
ACR 50	36.5%	22.9%	11.8%
Difference from control group	24.8	11.1	-
95% CI	13.8, 35.7	1.2, 20.9	-
p-value	< 0.001	0.027	-
ACR 70	16.5%	10.5%	1.7%
Difference from control group	14.8	8.8	-
95% CI	7.5, 22.2	2.7, 14.9	-
p-value	< 0.001	0.005	-

The improvements in ACR 20, 50, and 70 response rates in the 10 mg/kg treatment group, at six months relative to the methotrexate control group, were statistically significant (Figures 34-38, 40). The improvements in ACR 50, and ACR 70 for the 2 mg/kg group were also statistically significant. The difference in ACR 20 response between the 2 mg/kg group and the control group was 6.6%. This difference was not statistically significant, p = 0.31 (Table V, Figure 49).

Figures 34-37 presents the ACR response rates from Day 1 to Day 180. Figures 38 and 40 presents the ACR20, -50 and -70 response rates on day 180 for the various treatment groups. The ACR 50 and ACR 70 response rates suggest the possibility that maximal efficacy may not have been achieved at 10 mg/kg.

Figure 39 shows the proportion of new tender and swollen joints at day 180 of the study after therapy with methotrexate alone or in combination with CTLA4Ig (administered at 2 or 10 mg/kg body weight of subject).

Figure 46 shows the mean percent improvement in physical function from baseline as measured by HAQ.

TABLE VI

Individual ACR Components at Day 180

(Mean Percent Improvement)

Core Components	Methotrexate + CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	Methotrexate + CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	Methotrexate + Placebo (n = 119)

Core Components	Methotrexate + CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	Methotrexate + CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	Methotrexate + Placebo (n = 119)
Tender Joints	59.9%	43.3%	32.1%
Swollen Joints	54.9%	45.1%	33.4%
Pain	46.4%	22.7%	8.4%
Physical Function (mHAQ)	41.5%	17.3%	14.1%
Subject global assessment	40.8%	9.6%	17.6%
Physician global assessment	52.0%	38.6%	25.6%
CRP	31.5%	16.2%	-23.6%

The 2 and 10 mg/kg dose groups demonstrated some degree of efficacy among all clinical components of the ACR response criteria (Table VI; Figures 41-45, 47-48); the subject's global assessment in the 2 mg/kg dose group being the only exception. The reduction of tender and swollen joints appears dose-dependent. The number of tender joints was decreased by 59.9%, 43.3% and 32.1% in the 10 mg/kg, 2 mg/kg and control groups, respectively. A similar pattern was observed for the swollen joint counts with a decrease of 54.9%, 45.1% and 33.4% in the 10 mg/kg, 2 mg/kg and control groups, respectively. The greatest differences relative to the control group were observed with the pain assessment which decreased 46.4% and 22.7% relative to baseline for 10 mg and 2 mg/kg CTLA4Ig, respectively, compared to 8.4% in the control group. The mean CRP decreased 31.5% and 16.2% relative to baseline in the 10 and 2 mg/kg groups compared to an increase of 23.6% in the control group.

Health-Related Quality of Life

The impact of CTLA4Ig on health-related quality of life (HRQOL) was measured by the Medical Outcomes Study Short Form-36 (SF-36). The SF-36 was administered to all subjects at baseline, 90 and 180 days. The SF-36 consists of 36 items which covers eight domains (physical function, role-physical, bodily pain, general health, vitality, social function, role emotional, and mental health). These individual domains are used to derive the physical and mental component summary scores which range from 0 to 100, with higher scores indicating better quality of life. Absolute differences of 5 or more in the SF-36 scores were considered clinically meaningful.

Compared to subjects treated with placebo, subjects in the CTLA4Ig 10 mg/kg group also experienced statistically significantly greater improvement in all 8 domains of the SF-36 (Figure 50-51). For subjects treated with CTLA4Ig 2 mg/kg, the improvements were also greater than those treated with placebo, but the differences were not statistically significant (Figure 50-51).

Baseline SF-36 scores were comparable between the three treatment groups. Improvements in quality of life show a clear dose-response trend after 6 months of treatment. Subjects in the CTLA4Ig 10 mg/kg treatment group demonstrated clinically and statistically significant improvements from baseline in all 8 domains of the SF-36. The greatest effects were shown in the role-physical, bodily pain, and role-emotional domains. This positive finding was consistent with the efficacy results. For subjects treated with CTLA4Ig 2 mg/kg, improvements from baseline were also statistically significant for all domains except mental health.

Pharmacokinetics

Pharmacokinetic Parameter Values

	CMAX (μG/ML)	TMAX (H)	AUC(TAU) (μG.H/ML)	T-HALF (Days)	CLT (ML/H/KG)	VSS (L/KG)
2 mg/kg						
MEAN	57.96	0.50*	10176.14	13.50	0.23	0.07
SD	16.93	(0.00,4.00)	3069.84	5.91	0.13	0.04
N	15	15	15	15	15	15
10 mg/kg						
MEAN	292.09	0.50*	50102.56	13.11	0.22	0.07
SD	67.78	(0.00,4.00)	15345.95	5.32	0.09	0.03
N	14	14	14	14	14	14

* Median (minimum,maximum)

The pharmacokinetics of CTLA4Ig were derived from serum concentration versus time data between dosing days 60 and 90. Samples were collected prior to dosing on day 60, at 0.5, and 4 h after dosing, on days 67, 74, 81, and prior to dosing on Day 90. The preliminary data indicate that both Cmax and AUC values increase in a proportion comparable to the dose increment. For nominal doses increasing in a 1:5 proportion, both the Cmax and AUC values increased in the proportion of 1:5.04

and 1:4.92, respectively. T-HALF, CLT, and Vss values appeared to be comparable and dose independent.

Mean Vss values were 0.07 L/kg for both dose levels, which was approximately 1.6-fold the plasma volume.

Pharmacodynamics

TABLE VII

Mean Baseline Values for Pharmacodynamic Biomarkers

Biomarker	Methotrexate + CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	Methotrexate + CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	Methotrexate + Placebo (n = 119)
CRP (mg/dL)	2.9	3.2	3.2
RF (IU/L)	207	274	179
IL-2r (pg/ml)	1388	1407	1398
IL-6 (pg/ml)	26.7	31.7	21.4
TNFα (pg/ml)	11.8	6.0	11.9

Serum levels of pharmacodynamic biomarkers were analyzed at various times during the study. Baseline values are shown in Table VII. The values on Day 180 relative to baseline are shown in the Figures 52-56.

CRP levels decreased from baseline in both CTLA4Ig-treated groups more than in the control group, with greater reduction observed in the 10 mg/kg dosing group (see Figures 47, 48 and 52).

Rheumatoid factor levels decreased from baseline in both CTLA4Ig-treated groups more than in the control group, with greater reduction observed in the 10 mg/kg dosing group (see Figure 53).

Soluble IL-2r levels decreased from baseline in both CTLA4Ig-treated groups more than in the control group, with greater reduction observed in the 10 mg/kg dosing group (see Figure 54).

Serum IL-6 levels decreased from in both CTLA4Ig-treated groups more than in the control group (see Figure 55).

The effects of CTLA4Ig on serum TNFα levels were inconclusive. The 2 mg/kg group increased and the 10 mg/kg group decreased relative to the control group (see Figure 56).

Safety

CTLA4Ig was well tolerated at all doses. There were no deaths, malignancies or opportunistic infections in any subjects receiving CTLA4Ig. Serious adverse events (SAEs) and non-serious adverse events (NSAEs) were similar or less frequent in the active-treatment groups compared to the control group.

Fewer subjects in the 10 mg/kg group discontinued due to adverse events relative to the control group (1.7% vs 5.9%, respectively). The discontinuations due to adverse events in the 2 mg/kg were similar to the control group (6.7% vs 5.9%, respectively). The SAEs followed a pattern similar to the discontinuations due to adverse events.

No serious adverse events in the 10 mg/kg dose group were considered related to the study drug.

Immunogenicity

No anti-drug antibody responses were detected through Day 180 at both dose levels of CTLA4Ig.

CTLA4Ig significantly reduced the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in subjects receiving methotrexate as assessed by ACR response criteria. The effects of CTLA4Ig appear to increase in proportion to dose level. The improvement from baseline in all ACR core components is higher in the 10 mg/kg group than the 2 mg/kg group. CTLA4Ig at 10 mg/kg doses demonstrated clinically and statistically significant improvements in all 8 domains of the SF-36. All pharmacodynamic biomarkers assayed appeared to decrease in proportion to CTLA4Ig dose level except for TNFα. CTLA4Ig was safe and well tolerated in subjects with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. The adverse event profile for both CTLA4Ig doses was similar to the control group.

EXAMPLE 6

112

A Study of a co-stimulation blocker, CTLA4Ig, Given Monthly In Combination with Etanercept to Patients with Active Rheumatoid Arthritis

The following Example provides a description of the administration of CTLA4Ig, in combination with etanercept, to treat patients with active Rheumatoid Arthritis.

Etanercept, along with infliximab, comprises a new generation of Rheumatoid Arthritis drugs which targets Tumor Necrosis Factor (TNF. Etanercept is a dimeric fusion protein having an extracellular portion of the TNF receptor linked to the Fc portion of human immunoglobulin (IgG1). This fusion protein binds to TNF, blocks its interactions with cell surface TNF receptors and render TNF molecules biologically inactive.

This example describes a twelve month study in which efficacy was assessed after all subjects completed six months of treatment or discontinued therapy. Efficacy, safety and disease progression were also assessed throughout the duration of the study.

The study utilized a randomized, double-blind, placebo controlled, parallel dosing design. A total of approximately 141 subjects with active RA and receiving etanercept (25 mg twice weekly) were randomized to 1 of 2 dosing groups: 1) a group receiving CTLA4Ig at 2 mg/kg (n = 94) plus etanercept or 2) a placebo group receiving etanercept only (n = 47).

Test Product, Dose and Mode of Administration, Duration of Treatment

All subjects received etanercept (25 mg twice weekly) for at least 3 months prior to treatment.

Infusions of CTLA4Ig were given on Days 1, 15, 30, and monthly thereafter, for 6 months (primary treatment phase). Each dose of study medication was infused intravenously for approximately 30 minutes.

The primary treatment phase of the study took place during the first six months of treatment. During this period, subjects were required to remain on stable doses of etanercept (25 mg twice weekly). DMARDs other than etanercept were not permitted. Low-dose stable corticosteroid (at 10 mg daily or less) and/or stable non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), including acetyl salicylic acid (ASA), use was allowed. Analgesics (that do not contain ASA or NSAIDs) were permitted in

subjects experiencing pain that was not adequately controlled by the baseline and study medications, except for 12 hours before a joint evaluation.

Criteria for Evaluation

The primary endpoint of this study was to collect data regarding the proportion of subjects meeting modified American College of Rheumatology (ACR) criteria for 20% improvement (ACR 20) after six months. The modified ACR 20 criteria were used to accommodate the low CRP levels in this study's subject population. The modified ACR criteria were defined as 1) a greater than 20% improvement in tender and swollen joint count and 2) a greater than 20% improvement in 2 of the remaining 4 core data set measures (global pain, physician, subject, functional assessment). CRP, which is normally a part of the standard ACR core data sets, was not included in the modified ACR criteria due to the low levels of CRP in subjects using TNF blockers, such as etanercept. The standard ACR criteria, and two alternative criteria (SF-36 Physical Health and SF-36 Mental Health) were also evaluated as secondary endpoints.

Statistical Methods

Treatment of a group of patients with CTLA4Ig 2 mg/kg in combination with etanercept was compared with a control group treated with placebo plus etanercept. Based on previous studies with etanercept in similar patient populations, it was assumed that the modified ACR 20 response rate (modified criteria for evaluation) at 6 months would be 35% in the control group. This is the rate of response expected among subjects who did not respond adequately to etanercept therapy. Using a 2:1 randomization, a sample of 141 (adjusted for a possible 10% dropout) subjects (47 control/94 CTLA4Ig) yields a 90% power to detect a difference of 30% at the 5% level of significance (2-tailed, based on a chi-square test with no adjustment for continuity correction).

Similarly, the sample was determined to yield a power of 91% and 83% to detect differences of 30 and 25% in ACR 50 and 70, respectively. However, due to slow enrollment, only 122 subjects were randomized and 121 treated and analyzed (one subject was randomized but never received treatment).

Demography and Baseline Characteristics

TABLE 1

Subject Disposition at Day 180

	CTLA4Ig + etanercept	Placebo + etanercept	TOTAL
Randomized*	85	36	121
Completed	68 (80%)	22 (61%)	90 (74%)
Discontinued	17 (20%)	14 (39%)	31 (26%)
Adverse Events	6 (7.0%)	1 (2.7%)	7 (6%)
Lack of Efficacy	6 (7.0%)	12 (33%)	18 (15%)
Other	5 (5.8%)	1 (2.7%)	6 (5%)

*Excludes one subject that did not receive treatment

After six months, the proportion of total discontinuations were higher (39%) in the placebo plus etanercept treatment group compared to the CTLA4Ig plus etanercept group (20%). The difference was driven by a higher rate of discontinuation due to lack of efficacy in the placebo plus etanercept group (Table 1).

Demographic characteristics were similar between treatment groups. The majority of subjects were female and Caucasian. The mean duration of the disease was 13 years and the mean age was 52 years (Table 2).

TABLE 2

Mean Baseline Demographic and Clinical Characteristics

	CTLA4Ig + etanercept N = 85	Placebo + etanercept N = 36	TOTAL N = 121
Mean Age: yrs (Range)	50 (24 - 74)	55 (28 - 72)	52 (24 - 74)
Mean Weight: kg (Range)	81 (45 - 154)	79 (46 - 126)	81(45 - 154)
Gender: female: n (%)	66 (78%)	26 (72%)	92 (76%)
Race: Caucasian - n (%)	80 (94%)	36 (100%)	116 (96%)
Mean Duration of Disease: yrs ± sd	13.0 ± 10.1	12.8 ± 8.6	13.0 ± 9.7
Tender Joints (out of 68) - mean ± sd	28.7±14.0	29.5±13.7	28.9± 13.8

	CTLA4Ig + etanercept N = 85	Placebo + etanercept N = 36	TOTAL N = 121
Swollen Joints - (out of 66) - mean ± sd	19.6±9.4	20.3±11.0	19.8 ± 9.9

Baseline clinical characteristics were similar between treatment groups including a mean of 29 tender joints and 20 swollen joints. With the exception of CRP values, which were lower, the baseline characteristics were typical of subjects with active rheumatoid arthritis and enrolled in clinical studies (Table 2).

ACR Responses and Core Components

The improvements in the ACR 20 and ACR 70 responses in the CTLA4Ig + etanercept group were statistically significant compared to the CTLA4Ig + placebo group (Table 3 and Figure 63).

TABLE 3

Modified ACR Response at Day 180 - number of subjects (%)*

	ACR 20	ACR 50	ACR 70
CTLA4Ig + etanercept***	48.2%	25.9%	10.6%
Diff. from Placebo + etanercept	20.5%	6.4%	10.6%
95% CI	(1.2, 39.7)	(-10.2, 23.1)	(0.4, 20.8)
p-Value	0.037**	0.448	0.042**

* See Criteria for Evaluation

**p < 0.05 (probability for ACR response in CTLA4Ig + etanercept vs. placebo + etanercept)

*** N = 85 and N = 36 for CTLA4Ig + etanercept: and Placebo + etanercept, respectively

By two months of treatment, numerically higher responses on all components of the ACR criteria were observed for the CTLA4Ig plus etanercept group. Three of the seven ACR components are shown in Figure 64A-C.

The mean improvements in the individual components of the ACR criteria on Day 180 were consistently greater in the CTLA4Ig plus etanercept treatment group compared to the placebo plus etanercept group (Table 4).

TABLE 4

Mean Percent (SE) Improvement in Individual ACR Components at Day 180

ACR Component	CTLA4Ig + etanercept N=85	Placebo + etanercept N=36
Tender Joints	42% (5.5)	24% (8.3)
Swollen Joints	37% (5.0)	21% (8.1)
Pain	34% (4.3)	-1% (10.8)
Physical Function (MHAQ)	31% (5.2)	-5% (13.8)
Subject Global Assessment	27% (5.4)	3% (9.5)
Physician Global Assessment	43% (4.3)	27% (5.8)

Quality of Life

Compared to baseline, subjects in the CTLA4Ig plus etanercept group demonstrated statistically significant improvements at Day 180 in all 8 subscales of the SF-36 - compared to only one (physical function) in subjects in the placebo plus etanercept group. The absolute changes in HRQOL subscales were considered clinically meaningful.

Compared to the placebo plus etanercept group, subjects in the CTLA4Ig plus etanercept group experienced statistically significantly greater improvement in 4 subscales of the SF-36: role-physical, bodily pain, vitality, and social function (Figure 65). Improvements in the other 4 subscales were also greater than the placebo plus etanercept group, although they were not statistically significant.

Safety

No deaths or opportunistic infections occurred during the first six months of this study. Among the most frequently reported adverse events, headache, upper respiratory infection, musculo/skeletal pain, nausea/vomiting, hypertension, and diarrhea occurred at a higher rate in the CTLA4Ig plus etanercept group compared to the placebo plus etanercept group. Sinus abnormalities and rash were slightly higher in the CTLA4Ig plus etanercept group, as well.

More subjects in the CTLA4Ig plus etanercept group experienced serious adverse events (SAE) (7.1%) than the etanercept plus placebo group (2.8%). However, no SAEs were considered related to the study drug.

Two subjects receiving CTLA4Ig and etanercept had a dermatological malignancy. One subject had a basal cell carcinoma that was excised after the Day 150 visit. The other subject had a squamous cell carcinoma which was a pre-existing lesion that the subject decided to have removed after the Day 120 visit. Another subject experienced angioedema that was considered by the investigator to be a drug reaction to azithromycin.

All adverse events (AEs) leading to discontinuation were of either of mild or of moderate intensity. One discontinuation in the CTLA4Ig plus etanercept group, due to a tremor, was considered a serious adverse event.

Immunogenicity

No subjects receiving CTLA4Ig seroconverted for CTLA4Ig or CTLA4-T specific antibodies. No significant change in GMTs for CTLA4Ig or CTLA4-T specific antibodies was observed.

Comparison between CTLA4Ig/etanercept and CTLA4Ig/methotrexate ACR responses

TABLE 5

CTLA4Ig + etanercept vs. CTLA4Ig + methotrexate ACR responses (% improvement):

	CTLA4Ig + Etanercept[a] (IM101-101)		CTLA4Ig + Methotrexate[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] Modified ACR. See criteria for evaluation

[b] Standard ACR criteria

[c] Placebo + Background therapy (etanercept or methotrexate)

[d] $p<0.05$ for the difference in ACR response vs placebo + background therapy

The efficacy of CTLA4Ig plus etanercept at 2 mg/kg was similar to that observed in subjects receiving the same dose of CTLA4Ig plus methotrexate therapy (Example 5). However, the criteria for evaluation in the methotrexate (Example 5) trial was the standard ACR, that includes CRP among the core components, while in the etanercept trial (Example 6) the criteria for evaluation was the modified ACR, that excludes CRP.

Conclusion

Preliminary assessment of the study at six months found that CTLA4Ig (2 mg/kg) in combination with etanercept reduced the signs and symptoms of rheumatoid arthritis, as compared with etanercept alone. The increases in the modified ACR20 and ACR 70 assays were statistically significant. Efficacy of CTLA4Ig plus etanercept therapy was observed within one month of the start of treatment. CTLA4Ig was generally safe and well tolerated when administered in combination with etanercept with the safety profile similar to etanercept therapy alone. CTLA4Ig was not immunogenic during the six month trial period. Additionally, the efficacy of CTLA4Ig therapy in combination with etanercept (Example 6) was similar to the same dose of CTLA4Ig with methotrexate (Example 5).

EXAMPLE 7

One-Year Results of a Phase IIB, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Evaluate the Safety and Clinical Efficacy of Two Different Doses of BMS-188667 Administered Intravenously to Subjects with Active Rheumatoid Arthritis While Receiving Methotrexate

The following Example provides the one-year results from a Phase IIB, multi-center, randomized, double-blind, placebo controlled clinical study to evaluate the safety and clinical efficacy of administering two different doses of CTLA4Ig in combination with methotrexate to treat patients with active Rheumatoid Arthritis

(RA). The study presented in this example is a continuance of the six-month study presented in Example 5.

Based on preliminary efficacy results from Example 3, supra, and the standard practice of adding other therapies to MTX in the treatment of RA, this study was designed to test the hypothesis that CTLA4Ig (BMS-188667) combined with MTX may have greater clinical efficacy when compared with MTX plus placebo in RA subjects who still have active disease despite MTX treatment.

The results presented in this clinical study report are based on data from an analysis performed after all subjects completed 6 months of treatment and again after all subjects completed 12 months of treatment.

Throughout this Example, the 10 mg/kg CTLA4Ig plus MTX group may be referred to as the 10 mg/kg group, the 2 mg/kg plus MTX group is referred to as the 2 mg/kg group, and the CTLA4Ig (BMS-188667) placebo plus MTX group is referred to as the placebo group.

Study Methodology

This study compared the clinical efficacy of two different doses (10 and 2 mg/kg) of CTLA4Ig (BMS-188667) combined with methotrexate (MTX) or with MTX plus placebo in subjects with active RA as assessed by ACR at 6 month and 12 month intervals. This study enrolled adult subjects with active RA who had had an inadequate response to MTX.

Results after one-year of monitoring subjects with active rheumatoid arthritis who were intravenously administere: 1) CTLA4Ig at a dosage of 2 mg/kg body weight with methotrexate, 2) CTLA4Ig at a dosage of 10 mg/kg body weight with methotrexate, or 3) a placebo with methotrexate (hereinafter known as placebo), are presented herein.

Subjects with active RA, despite treatment with MTX and who met the inclusion/exclusion criteria for this study were randomized 1:1:1 to receive one of the following treatments on a background of MTX therapy: CTLA4Ig (BMS-188667) 10 mg/kg, CTLA4Ig (BMS-188667) 2 mg/kg, or placebo. Subjects must have been treated with MTX (10 mg to 30 mg weekly) for at least 6 months, at a stable dose for 28 days prior to Day 1.

120

Treatment Groups: Subjects were randomized 1:1:1 to one of three treatment groups:

1) Group 1: CTLA4Ig (BMS-188667) 10 mg/kg by intravenous infusion
2) Group 2: CTLA4Ig (BMS-188667) 2 mg/kg by intravenous infusion
3) Group 3: CTLA4Ig (BMS-188667) placebo by intravenous infusion

Infusion doses were based upon the subject's body weight from the pre-treatment visit immediately prior to the Day 1 visit (for a subject on MTX monotherapy, the weight was obtained at the screening visit; for a subject on MTX combination therapy [in combination with other DMARDs], the weight was obtained from the washout visit, Day -2). The infusion doses were not modified during Day 1 to Day 360.

Infusions were to occur at approximately the same time of day throughout the study. All doses of study medication were administered in a fixed volume of 75 mL at a constant rate over approximately 30 minutes. The intravenous bag and line were flushed with 25 mL of dextrose 5% in water (D5W) solution at the end of each infusion. All intravenous infusions were administered with the subject in the seated position. Subjects were observed for Adverse Events (Aes) and changes in vital signs (blood pressure, heart rate, body temperature) from the start of each infusion (pre-dose, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 minutes) and for a minimum of 2 hours after the start of the infusion. The observation period could be extended, if clinically indicated.

During the primary phase (Day 1 to Day 180) of the study, concomitant administration of selected medications was allowed. The permitted medications included:

- MTX: Continued use of current dose (no increases, and decreases only for toxicity)
- Systemic (non-topical) corticosteroids: Provided that the dose was stable and the total dose was less than or equal to the equivalent of prednisone 10 mg/day. Intra-articular injections were to be avoided; however, if necessary, up to two intra-articular injections were permitted. NOTE: A joint that received an intra-

articular injection was counted as "active" in ALL subsequent assessments/evaluations.

- NSAIDs, including ASA: Provided the dose was stable
- Acetaminophen, combination products including acetaminophen and narcotic analgesics (i.e., acetaminophen with codeine phosphate, acetaminophen with propoxyphene napsylate, acetaminophen with oxycodone hydrochloride, acetaminophen with oxycodone bitartrate, etc.), or tramadol: For subjects experiencing pain not adequately controlled by baseline or study medication (except for 12 hours before a joint evaluation)

Table 1 is a schedule of study procedures and evaluations.

TABLE 1

Schedule of Study Procedures and Evaluations

Treatment Period	Pretreatment (Day)		Treatment Day[a,f,h]												
Visit Day	Screen (-28 to -2)	(-2)	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Screening assessments																
Informed consent	X															
Complete History and Physical	X															X[l]
CXR	X[a]															
ECG	X[a]															X
Stabilize/Withdraw prohibited medications (if necessary)[b]	X															
Enroll Subject	X	X[m]														
Randomize Subject[k]			X													
Dosing[h]			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Interim Assessments[f]																
Duration of morning stiffness	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Interim History and Physical			X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		
Tender joint count	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Swollen joint count	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Subject's assessment of pain	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Subject's global assess of disease activity	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Physician's global assess of disease activity	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Subject's assess of physical function	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Short form-36 health questionnaire (SF-36)	X		X				X			X						X
Subjects response to therapy							X			X						X
Safety Assessments																
Adverse event monitoring			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X[o]
Weight[g]	X	X														X

122

Treatment Period	Pretreatment (Day)		Treatment Day[e,f,h]													
Visit Day	Screen (-28 to -2)	(-2)	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Mammogram (females only)[i]	X															X
Vital signs	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Labs																
CBC	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Chemistry panel	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Urinalysis	X															X
Urine/serum pregnancy test[d]	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Hepatitis B surface antigen	X															
Hepatitis C antibody	X															
Pharmacodynamics (PD)																
Rheumatoid factor	X		X							X						X
CRP	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
IL-2R			X		X	X	X	X	X	X		X		X		X
Exploratory cytokines (ICAM-1 e-Selectin, IL-6 and TNFα)			X				X			X						X
Pharmacokinetics			X			X	X			X						
Immunoglobulin determinations																
Quantitative immunoglobulins (IgG, IgA, IgM)			X							X						X
Immunogenicity																
Anti-BMS-188667Ab testing			X		X		X			X			X			X
Radiographic assessments[a]																
X-rays (hands/wrists and feet)			X							X						X

[a] Chest X-ray and ECG was performed if not performed within 6 months or not on file.

[b] If subject was being treated with DMARDs on top of methotrexate therapy and did not meet initial entry criteria, the DMARDs must have been washed out for at least 28 days prior to Day 1.

[c] This visit was required only if the subject was on MTX therapy.

[d] Urine or serum pregnancy test performed within 48 hours prior to dosing, for all women of child bearing potential. Serum pregnancy test was to be processed locally.

[e] Subjects who discontinued must have had an "early termination" visit. Assessments at this visit were identical to assessments performed on Day 360. The assessments for this visit replaced what might have been scheduled on the day of discontinuation. Changes in *current* DMARD, steroid, or NSAIDs therapy were **not** permitted until **after** these assessments were performed. Subjects were to be contacted 30 days after discontinuation to capture safety data (adverse events).

[f] Every effort must have been made to insure the same evaluator completed the assessment for each subject.

123

[g] Most recent weight should have been used to calculate study drug dosage. All doses administered during the study were be based on this weight.

[h] For Day 15, a +/- 3 day visit window was permitted. For subsequent visits, a +/- 7 day visit window was permitted.

[i] Complete physical examination only.

[j] All assessments should have been performed or administered prior to study drug administration unless otherwise indicated.

[k] The results of all assessments must have been reviewed for eligibility requirements before contacting the Central Randomization System for randomization.

[l] See Section 2.1.4.3 of the protocol for mammography rationale. If not performed within 6 months (documentation must be on file) prior to signing consent. Subjects who discontinued from the study after Day 1 required a follow-up mammogram on the one year anniversary of the mammogram that was performed during the screening period.

[m] Subject's body weight was provided to central randomization system.

[n] No radiographic assessments were required at the termination visit for subjects who discontinued within the first nine months of treatment.

[o] Subjects who were terminated early had adverse events and concomitant medications recorded 30 and 60 days after the last dose of study medication.

Efficacy Assessments

Clinical Measurements and Responses

Clinical response was assessed using the American College of Rheumatology (ACR) Core Data Set and Response Definitions. For this assessment, data were collected on seven components: 1) tender joint count (standardized 68 joint count); 2) swollen joint count (standardized 66 joint count); 3) subject global assessment of pain; 4) subject global assessment of disease activity; 5) physician global assessment of disease activity; 6) subject assessment of physical function (MHAQ); and 7) an acute phase reactant value CRP.

The ACR 20, ACR 50, and ACR 70 definition of response corresponds to a 20%, 50%, or 70% improvement, respectively, over baseline in tender and swollen joints (components 1 and 2) and a 20%, 50%, and 70% improvement, respectively, in three of the five remaining core data set measures (components 3 to 7). A Major Clinical Response is defined as maintenance of an ACR 70 response over a

continuous 6-month period. See Table 1 for the days that data for each component was collected.

The primary efficacy analysis tested for differences in ACR 20 response between the two CTLA4Ig (BMS-188667) treatment groups and the placebo group at 6 months (Day 180). A sequential testing procedure was employed. First, a Chi-square test was used to compare the data for the 10 mg/kg CTLA4Ig group with the data for the placebo group at the 0.05 level of significance. If this was significant, the data for the 2 mg/kg CTLA4Ig group was compared with the placebo group at the 0.05 level. This testing procedure preserved the overall alpha level at 5%. Similar analyses were carried out for the ACR 50 and ACR 70 responses at 6 months. Differences in ACR 20, ACR 50 and ACR 70 responses between each CTLA4Ig (BMS-188667) treatment group and the placebo group were summarized using point estimates and 95% confidence intervals. Subjects who discontinued the study due to lack of efficacy (i.e., worsening RA) were considered ACR non-responders at all subsequent time points. For all subjects who discontinued for other reasons, their last ACR response was carried forward.

ACR 20, ACR 50, and ACR 70 response rates on Day 360 were compared between each CTLA4Ig (BMS-188667) treatment group and placebo at the Dunnett-adjusted 0.027 (two-tailed) level of significance.

The proportion of responders achieving an ACR 20 response at each time point was also plotted over time, and the Cochran Mantel-Haenszel test (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) was used to compare the frequency of subjects achieving an ACR 20 response in each CTLA4Ig (BMS-188667) group versus the placebo group.

ACR 20, ACR 50, and ACR 70 responses on Days 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, and 360 were also presented for the two CTLA4Ig (BMS-188667) groups and the placebo group. The differences in ACR responses between the CTLA4Ig (BMS-188667) groups and placebo group were summarized using 95% confidence intervals. The ACR data plotted over time were used to assess onset-of-action and to determine time to maximal response.

A Major Clinical Response was defined as the maintenance of an ACR 70 response over a continuous 6-month period. At the 12-month analysis, the proportion of subjects who achieved a Major Clinical Response among the three groups was summarized.

In order to assess the integrity of the planned analyses, all subjects who received study medication and discontinued the study for any reason were considered ACR non-responders at all scheduled study visits subsequent to discontinuation.

The cumulative index, ACR-N, was evaluated at each follow-up assessment, and the AUC was assessed for up to 6 months and up to 12 months. The trapezoidal rule was used to compute the AUC. The ACR-N AUC was compared between the two CTLA4Ig (BMS-188667) treatment groups and the placebo group using an analysis of variance (ANOVA) for 6- and 12-month data. This allowed for the assessment of subject response throughout the study. These analyses were carried out on the LOCF data sets.

The distributional assumptions regarding the normality of the ACR-N AUC data were checked using the Shapiro-Wilks test on standardized residuals from the ANOVA model at the 10% level of significance.

Surrogate biomarkers were also used to assess the efficacy of the CTLA4Ig + MTX or placebo + MTX treatment regimens. Potential biomarkers for immunomodulation or inflammation in RA include CRP, soluble IL-2r, RF, soluble ICAM-1, E-selectin, serum IL-6, and TNFα. These parameters were summarized by treatment group, using frequencies and mean change from baseline to Day 180 and Day 360.

An Adverse Event (AE) was defined as any new or worsening illness, sign symptom or clinically significant laboratory test abnormality noted by the Investigator during the course of the study, regardless of causality. A serious adverse event (SAE) was defined as an AE that met any of the following criteria: was fatal; was life-threatening; resulted in or prolonged hospitalization; resulted in persistent or significant disability or incapacity, was cancer, was a congenital anomaly/birth defect, resulted in an overdose, resulted in the development of drug dependency or drug abuse, or was an important medical event.

Vital sign measurements were obtained at screening and at each study visit during and following study drug administration. Vital sign measurements (seated

blood pressure, heart rate, and body temperature) were summarized by treatment group using means.

The two CTLA4Ig (BMS-188667) treatment groups (10 and 2 mg/kg) were compared with the placebo group. The primary analysis was the comparison of 6-month ACR response rate for 10 mg/kg and placebo groups, to be followed by the comparison of 2 mg/kg with placebo only if the former was significant. Sample sizes were based on a 5% level (two-tailed) of significance. The ACR 20 response rate for a placebo group at 6 months was estimated to be about 25% (Weinblatt M, Kremer JM, Bankhurst AD *et. al.* A trial of etanercept, a recombinant TNF:Tc fusion protein in patients with RA receiving methotrexate. NEJM 1999; 340: 253-259). A sample of 107 subjects per treatment group (adjusted for a possible 15% discontinuation rate) was determined to yield a 94% power to detect a difference of 25% at the 5% level (two-tailed). Table 2 summarizes the power needed to detect the specified treatment differences in ACR 20, ACR 50, and ACR 70 responses at 6 months.

TABLE 2

Response Rates and Power with 107[a] Subjects per Group

Response	Control Rate (%)	Treatment Difference	Power (%)
ACR 20	25	25	94
ACR 50	5	20	95
ACR 70	1	14	90

[a] Sample size was adjusted for a possible 15% discontinuation rate; actual sample size was 91.

If the primary comparisons of the 10 mg/kg CTLA4Ig with placebo were significant, then for the comparison of the 2 mg/kg CTLA4Ig with placebo groups, the power of the test would be at least 0.88, 0.90, and 0.81 for the comparison involving ACR 20, ACR 50, and ACR 70 responses at 6 months, respectively (Koch DD, Gansky SA. Statistical considerations for multiplicity in confirmatory protocols. Drug Info Journal 1996; 30: 523-534).

Statistical Analyses

Study Population

Disposition of Subjects

Of 524 subjects who were enrolled in this study, 339 subjects were randomized: 115 to the 10 mg/kg group; 105 to the 2 mg/kg group; and 119 to the placebo group (Figure 68). The most frequent reason for not being randomized was failure to meet inclusion and/or exclusion criteria.

Primary Phase (Days 1-180)

A total of 256 subjects (75.5% of those randomized) completed the primary phase of the study; 83 subjects discontinued during this period (Table 3). Overall, discontinuation was more than 2-fold higher with placebo compared with 10 mg/kg CTLA4Ig group. Discontinuation due to lack of efficacy and discontinuation due to an AE were also more than 2-fold higher with placebo than with 10 mg/kg CTLA4Ig group.

TABLE 3

Reasons for Discontinuation: Primary Phase (Days 1-180)

	CTLA4Ig (BMS 188667)			
	10 mg/kg	2 mg/kg	Placebo	Total
No. Treated, n	115	105	119	339
No. Discontinued, n (%)	17 (14.8)	25 (23.8)	41 (34.5)	83 (24.5)
Adverse Event	3 (2.6)	7 (6.7)	9 (7.6)	19 (5.6)
Lack of Efficacy	12 (10.4)	16 (15.2)	28 (23.5)	56 (16.5)
Withdrawal of Consent	2 (1.7)	2 (1.9)	4 (3.4)	8 (2.4)
Completed 180 Days of Therapy, n (%)	98 (85.2)	80 (76.2)	78 (65.5)	256 (75.5)

Cumulative Discontinuations (Days 1-360)

A total of 235 subjects (69.3% of those randomized) completed both phases of the study; 104 subjects discontinued by Day 360 (Table 4). The same general pattern in disontinuations noted in the primary phase (2-fold higher incidence with placebo compared with 10 mg/kg CTLA4Ig group) was also observed overall (Days 1-360). This included the overall discontinuation rate, discontinuations due to a lack of efficacy and discontinuations due to an AE.

TABLE 4

Reasons for Discontinuation: Both Phases (Days 1-360)

	CTLA4Ig (BMS-188667)			
	10 mg/kg	2 mg/kg	Placebo	Total
No. Treated, n	115	105	119	339
No. Discontinued, n (%)	25 (21.7)	31 (29.5)	48 (40.3)	104 (30.7)
Adverse Event	5 (4.3)[b]	9 (8.6)	11 (9.2)	25 (7.4)
Death	0	1 (1.0)	0	1 (0.3)
Lost to Follow-up	1 (0.9)	2 (1.9)	0	3 (0.9)
Other[a]	1 (0.9)	0	1 (0.8)	2 (0.6)
Lack of Efficacy	13 (11.3)	17 (16.2)	30 (25.2)	60 (17.7)
Withdrawal of Consent	5 (4.3)	2 (1.9)	6 (5.0)	13 (3.8)
Completed 360 Days of Therapy, n (%)	90 (78.3)	74 (70.5)	71 (59.7)	235 (69.3)

[a] Other reasons for discontinuation were related to compliance

[b] Subject IM101100-32-5 in the 10 mg/kg CTLA4Ig group reported an AE that was recorded as having resulted in discontinuation from the study; however, this subject was not included in this table.

A Kaplan-Meier plot of the cumulative proportion of subjects who discontinued for any reason during the first 12 months is presented in Figure 69; the cumulative proportion of subjects who discontinued due to lack of efficacy in presented in Figure 70. Note that in both graphs after approximately 30 days of therapy, discontinuation rates with placebo were consistently higher compared with both CTLA4Ig (BMS-188667) groups. Additionally, after approximately 150 days of therapy, discontinuation rates for 2 mg/kg CTLA4Ig group were higher than those for 10 mg/kg.

Demography and Subject Characteristics

Overall, baseline demographic characteristics and baseline clinical RA characteristics were generally comparable across the three treatment groups and were typical of relatively advanced RA encountered in clinical practice (Table 5 and Table 6). The majority of subjects were white females approximately 55 years old with a mean duration of RA of approximately 9 to 10 years, a relatively large number of active joints (approximately 29 tender and 21 swollen joints) and visual analogue scores (VAS) approximately 59-65 mm (100 mm scale).

TABLE 5

Baseline Demographic Characteristics

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg	2 mg/kg	Placebo
No. Randomized	115	105	119
Age (yrs)			
Mean ± SD (Range)	55.8±12.5 (17, 83)	54.4±11.3 (23, 80)	54.7±12.0 (23, 80)
Weight (kg)			
Mean ± SD (Range)	77.8±18.6 (40.1, 144.0)	78.7±21.4 (48.4, 186.8)	79.9±17.6 (44.0, 140.0)
Gender			
Males, n (%)	29 (25)	39 (37)	40 (34)
Females, n (%)	86 (75)	66 (63)	79 (66)
Race			
White, n (%)	100 (87)	91 (87)	104 (87)
Black, n (%)	6 (5)	0	3 (3)
Other, n (%)	9 (8)	14 (13)	12 (10)
Duration of RA (yrs)			
Mean ± SD (Range)	n=114[a] 9.7±9.8 (0, 38)	n=105 9.7±8.1 (0, 36)	n=117[a] 8.9±8.3 (0, 41)

Duration of RA was not reported for 3 subjects.

Although not a component of the ACR criteria, duration of morning stiffness was also assessed and was nearly 2 hours in each of the three groups. Positive results for RF at baseline were also assessed, and the CTLA4Ig (BMS-188667) treatment groups had higher percentages of subjects who tested positive for RF (86% for both the 10 mg/kg and 2 mg/kg CTLA4Ig groups compared to 76% for the placebo group).

TABLE 6

Baseline Clinical Rheumatoid Arthritis Characteristics

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Characteristic	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Tender Joints, n	115	105	119
Mean ± SD	30.8 ± 12.2	28.2 ± 12.0	29.2 ± 13.0
Range	11.0, 66.0	3.0, 62.0	4.0, 68.0
Swollen Joints, n	115	105	119
Mean ± SD	21.3 ± 8.4	20.2 ± 8.9	21.8 ± 8.8
Range	9.0, 54.0	4.0, 48.0	8.0, 64.0

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Characteristic	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Pain (VAS 100 mm), n	113	104	119
Mean ± SD	62.1 ± 21.4	64.3 ± 22.3	65.2 ± 22.1
Range	0.0, 99.0	8.0, 100.0	3.0, 95.0
Physical Function (MHAQ 0-3), n	115	105	119
Mean ± SD	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.6
Range	0.0, 2.5	0.0, 2.5	0.0, 2.3
Subject Global Assess (VAS 100 mm), n	113	105	119
Mean ± SD	60.1 ± 20.7	59.4 ± 23.7	62.8 ± 21.6
Range	10.0, 100.0	8.0, 99.0	4.0, 94.0
MD Global Assess (VAS 100 mm), n	113	105	119
Mean ± SD	62.1 ± 14.8	61.0 ± 16.7	63.3 ± 15.5
Range	20.0, 98.0	8.0, 95.0	18.0, 93.0
CRP (mg/dL), n	112	99	115
Mean ± SD	2.9 ± 2.8	3.2 ± 2.5	3.2 ± 3.2
Range	0.2, 19.9	0.2, 10.8	0.2, 20.9
Morning Stiffness (in minutes), n	115	103	119
Mean ± SD	97.9 ± 63.1	104.1 ± 63.9	106.0 ± 64.2
Range	0.0, 180.0	0.0, 180.0	0.0, 180.0
Rheumatoid Factor (IU/mL), n	99	90	90
% Positive	86%	86%	76%

Baseline demographics and RA characteristics of the overall population of subjects who had at least one dose of study drug and discontinued due to lack of efficacy were generally comparable to the entire study population, however, a greater proportion of subjects in this subpopulation had been diagnosed with RA for >10 years (45%) compared to the overall study population (34%).

Medical History Findings and Prior Medications

Medical history findings for subjects in this study were consistent with relatively advanced RA and were generally similar among treatment groups. The most frequently occurring findings (in >40% of the subjects) were musculoskeletal findings (not including RA symptoms; 59.3%), gastrointestinal findings (45.1%), and genitourinary findings (42.2%). Other important medical history findings included cardiovascular disease in approximately 39% of subjects in all treatment groups and endocrine/metabolic findings in approximately 29% of all subjects.

Overall use of MTX, systemic (non-topical) corticosteroids, DMARDs and biologic RA medications prior to entering the study was generally comparable across the three treatment groups (Table 7). All subjects were to have received prior

treatment with rheumatic medications, including MTX, to be eligible for the study. Prior treatment with MTX was not recorded for 4 subjects. Systemic (non-topical) corticosteroid use prior to randomization was comparable among the three treatment groups, with slightly more subjects in the 2 mg/kg CTLA4Ig and placebo groups taking systemic (non-topical) corticosteroids (~67-68%) compared to subjects in the 10 mg/kg CTLA4Ig group (60.0%). Use of other DMARDs and biologic RA medications prior to entering the study varied from 0 to 12% across treatment groups with no overall predominance in any treatment group. Mean dosing of MTX and of systemic (non-topical) corticosteroids on Day 1 were comparable among all three treatment groups (~15-16 mg/wk, ~6-7 mgs/day, respectively.

TABLE 7

Summary of Rheumatic Medications Prior to Enrollment

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Prior Rheumatic Medication, n (%)[a]	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
No. Subjects on Prior Medications	114 (99.1)	103 (98.1)	118 (99.2)
Methotrexate[b]	114 (99.1)	103 (98.1)	118 (99.2)
Systemic (non-topical) corticosteroids	69 (60.0)	71 (67.6)	80 (67.2)
Other DMARDs	19 (16.5)	19 (18.1)	25 (21.0)
Sulfasalazine	9 (7.8)	2 (1.9)	10 (8.4)
Hydroxychloroquine	8 (7.0)	6 (5.7)	14 (11.8)
Cyclosporine	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)
Chloroquine	1 (0.9)	0	0
Leflunomide	0	2 (1.9)	2 (1.7)

[a] Categories of prior rheumatic medications were not mutually exclusive.

[b] Administration of MTX was not recorded for 4 subjects

Study Therapy

Of the three treatment groups, the 10 mg/kg CTLA4Ig group had the longest mean duration of exposure for both study phases and the placebo group had the shortest mean duration of exposure for both study phases (Day 180: 163 days, 156 days, 140 days; Day 360: 286 days, 268 days, and 234 days; 10 mg/kg, 2 mg/kg, and placebo, respectively).

At Day 180 (end of the primary phase), the proportion of subjects receiving infusions was higher in the 10 mg/kg CTLA4Ig group (85%) compared with the 2 mg/kg CTLA4Ig group (79%) and the placebo group (66%) (Table 8). At Day 330 (day of last scheduled infusion in the secondary phase), the proportion of subjects receiving infusions was also higher in the 10 mg/kg CTLA4Ig group (78%) compared with the 2 mg/kg CTLA4Ig group (70%) and the placebo group (59%).

TABLE 8

Subjects Who Received Infusions on Given Study Days

	Number (%) of Subjects		
	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Day	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)
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)**

Methotrexate

Subjects were to have been treated with a "stable" dose of MTX (10-30 mg weekly) for at least 6 months, for 28 days prior to Day 1. With the exception of 4 subjects , all subjects received between 10 and 30 mg of MTX weekly in addition to CTLA4Ig (BMS-188667) during the primary phase (Day 1-180). During the secondary phase (Day 181-360), the dose of MTX could have been adjusted provided it remained between 10 and 30 mg weekly.

Measurements of Treatment Compliance

During the primary phase, the number of missed infusions of study drug was ≤2 at any time point (Table 9). During the secondary phase, subjects in the placebo group appeared to have missed slightly fewer infusions than subjects in the CTLA4Ig (BMS-188667) groups. However, more placebo than CTLA4Ig (BMS-188667) subjects discontinued by these later time points (see supra).

TABLE 9

Number of Missed Infusions of Study Drug

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

Concomitant Therapy

Systemic (non-topical) corticosteroid use was generally comparable among the three groups during screening/enrollment (58-67%) and during the primary phase of the study (67-71%), Tables 10 and 11, respectively. While corticosteroid use decreased in all three treatment groups by Day 360, more subjects in the 10 mg/kg CTLA4Ig group took systemic (non-topical) corticosteroids (63.5%) compared to the other two treatment groups (53.3% and 45.4% for the 2 mg/kg CTLA4Ig and placebo groups, respectively). Several subjects (CTLA4Ig: 0-3%, placebo: 0-10%) received DMARDs other than MTX during screening/enrollment.

TABLE 10

Summary of Rheumatic Concomitant Medications During Screening/Enrollment

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Rheumatic Medication, n (%)[a]	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
No. Subjects on Prior Medications	114 (99.1)	103 (98.1)	118 (99.2)
Methotrexate	114 (99.1)	103 (98.1)	118 (99.2)
Systemic (non-topical) corticosteroids	67 (58.3)	70 (66.7)	75 (63.0)
Other DMARDs	5 (4.3)	6 (5.7)	14 (11.8)
Sulfasalazine	3 (2.6)	1 (1.0)	4 (3.4)
Hydroxychloroquine	2 (1.7)	3 (2.9)	12 (10.1)
Cyclosporine	1 (0.9)	1 (1.0)	2 (1.7)
Etanercept	0	1 (1.0)	0

[a] Drug categories were not mutually exclusive.

TABLE 11

Subjects Who Received Clinically Relevant Concomitant Medications During Both Study Phases

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Medication[a]	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Systemic (non-topical) corticosteroids (Primary Phase)	77 (67.0)	71 (67.6)	85 (71.4)
Systemic (non-topical) corticosteroids (Secondary Phase)	73 (63.5)	56 (53.3)	54 (45.4)

[a] Drug categories were not mutually exclusive.

Note: Subject IM101100-83-3 (10 mg/kg CTLA4Ig) took mefloquine and subject IM101100-28-7 (placebo) took quinine between Days 1 and 180; subject IM101100-18-11 (10 mg/kg CTLA4Ig) took quinine between Days 181 and 360 as an antimalarial, and was not considered a significant protocol violation.

Efficacy Results

The CTLA4Ig (BMS-188667) 10 mg/kg group had superior efficacy compared to the placebo group at Day 180 and Day 360. For the 2 mg/kg CTLA4Ig group, results for some efficacy parameters were significantly better compared to the placebo group, results for most other efficacy parameters were numerically higher compared to placebo.

ACR Responses at Day 180

Analysis of the primary efficacy variable for this study, ACR20 response rate at Day 180, showed that the 10 mg/kg CTLA4Ig group was significantly ($p<0.001$) more effective than placebo (Table 12, Figure 71A and Figure 71B).

The ACR50 and ACR70 responses at Day 180 for the 10 mg/kg CTLA4Ig group were also significantly higher compared to the placebo group (Table 12, Figure 71A and Figure 71B). The ACR50 and the ACR70 responses at Day 180 for the 2 mg/kg CTLA4Ig group were significantly higher compared to the placebo group. The ACR20 response at Day 180 for the 2 mg/kg CTLA4Ig group was slightly higher compared to the placebo group; however, no statistically significant differences were observed.

TABLE 12

ACR Responses at Day 180

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
ACR 20			
n (%)	70 (60.9)	44 (41.9)	42 (35.3)
CI	25.6 (12.8, 38.4)	6.6 (-6.2, 19.4)	N/A
p-value	<0.001[a]	0.31	N/A
ACR 50			
n (%)	42 (36.5)	24 (22.9)	14 (11.8)
CI	24.8 (13.8, 35.7)	11.1 (1.2, 20.9)	N/A
p-value	<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
p-value	<0.001[a]	0.005[a]	N/A

[a] Statistically significant difference for the comparison of BMS-188667 vs placebo.

ACR Responses at Day 360

At Day 360, ACR20, ACR50 and ACR70 responses for the 10 mg/kg CTLA4Ig group were significantly ($p<0.001$) higher compared to the placebo group (Table 13, Figure 72A and Figure 72B). Although the same response rates for the 2

mg/kg CTLA4Ig group were numerically higher compared to the placebo group, these differences were not statistically significant.

TABLE 13

ACR Responses at Day 360

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
ACR 20			
N (%)	72 (62.6)	43 (41.0)	43 (36.1)
CI	26.5 (13.7, 39.3)	4.8 (-7.9, 17.6)	N/A
P-value	<0.001[a]	0.459	N/A
ACR 50			
N (%)	48 (41.7)	23 (21.9)	24 (20.2)
CI	21.6 (9.7, 33.4)	1.7 (-8.9, 12.4)	N/A
P-value	<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
P-value	0.003[a]	0.227	N/A

[a] Statistically significant difference for the comparison of 10/mg/kg CTLA4Ig group vs placebo.

ACR Responses by Visit

For the comparison of the 10 mg/kg CTLA4Ig group to the placebo group, statistically significant improvements were observed for all three response rates (ACR 20, ACR 50, and ACR 70) by Day 90, and these values remained statistically significant at every time point up to and including Day 360 ($p \leq 0.008$ for all three ACR response rates) (Figure 73A, Figure 73B, and Figure 73C). In fact, statistically significant improvements in ACR 50 and ACR 70 response for the 10 mg/kg CTLA4Ig group occurred as early as Day 30 (p=0.039 and p=0.04, respectively).

For the 2 mg/kg CTLA4Ig group, statistically significant improvements compared to placebo were observed in ACR 50 and ACR 70 responses at Day 180 (p=0.027 and p=0.005, respectively). At Day 360, improvements in ACR response were slightly greater in the 2 mg/kg CTLA4Ig group compared to the placebo group; however, no statistically significant differences were observed.

After adjusting for visit using the Cochran-Mantel Haenszel test, a significant difference in ACR 20 response was observed for the 10 mg/kg CTLA4Ig group compared to the placebo group at both Day 180 and Day 360. No significant difference was observed between the 2 mg/kg CTLA4Ig and placebo groups at both timepoints. Similar results were obtained for ACR 50 response at both time points. For ACR 70 response at both time points, a significant difference was observed for both CTLA4Ig (BMS-188667) treatment groups compared to the placebo group.

Summary of Major Clinical Response

Major Clinical Response was defined as maintenance of an ACR 70 response over a continuous 6-month period. The percentages of subjects who achieved a Major Clinical Response at Day 360 were significantly higher in both the 10 mg/kg and 2 mg/kg CTLA4Ig groups (7.8% and 5.7%, respectively) when compared to the placebo group (0.8%; p=0.008 and 0.036, respectively) (Table 14).

TABLE 14

Summary of Major Clinical Response by Day 360

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
No. Subjects with a Major Response	9 (7.8)	6 (5.7)	1 (0.8)
Diff (CI)	7.0 (1.8, 12.2)	4.9 (0.3, 9.4)	N/A
p-value	0.008[a]	0.036[a]	N/A

[a] Indicates a statisticall significant difference for the comparison of BMS-188667 vs placebo.

Mean Numeric ACR (ACR-N) and ACR-N Area Under the Curve (ACR-N-AUC)

Overall, mean numeric ACR (ACR-N) for all treatment groups increased over time during the first 6 months of the study (Figure 74). During the second 6 months, mean ACR-N increased slightly with 10 mg/kg CTLA4Ig, but remained relatively unchanged with 2 mg/kg CTLA4Ig and placebo. At each study visit, the ACR-N was

consistently higher for the 10 mg/kg CTLA4Ig group compared to the 2 mg/kg CTLA4Ig and placebo groups.

Compared to the placebo group, the differences in values for ACR-N AUC (area under the curve) for the 10 mg/kg CTLA4Ig group was significantly ($p<0.001$) higher by Day 360.

Percentage Improvement from Baseline at Day 180

For the 10 mg/kg CTLA4Ig group, improvements in each individual ACR component (tender and swollen joint counts, CRP, pain, subject global assessment, physician global assessment, and physical function) at Day 180 were statistically significant relative to improvements for the placebo group (Table 15).

For the 2 mg/kg CTLA4Ig group, statistically significant improvements compared to the placebo group were observed in physician global assessment and CRP at Day 180. Furthermore, CRP levels in the placebo group actually worsened at Day 180. Change from baseline in mean duration of morning stiffness was comparable among the three treatment groups at Day 180.

TABLE 15

Mean Percentage Improvement from Baseline at Day 180 (Individual Components of ACR Criteria)

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Component	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Tender Joints	n=114	n=104	n=118
Mean % Change	59.78*	43.15	31.88
Swollen Joints	n=114	n=104	n=118
Mean % Change	55.28*	45.34*	33.49
CRP	n=108	n=98	n=114
Mean % Change	31.79*	16.41*	-23.43
Pain	n=109	n=102	n=118
Mean % Change	46.19*	22.09*	8.20
Subject Global Assessment	n=111	n=103	n=118
Mean % Change	40.76*	9.07	17.48
MD Global Assessment	n=111	n=103	n=116
Mean % Change	51.91*	38.71*	25.14
Physical Function	n=107	n=98	n=110

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Component	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Mean % Change	41.21*	21.63	13.71
Duration Morning Stiffness	n=98	n=82	n=80
Mean ± SD (minutes)	61.9 ± 55.4	60.8 ± 66.1	55.9 ± 66.2

* Indicates $p<0.05$ in comparison with placebo since 95% CIs did not include zero

Percentage Improvement from Baseline at Day 360

For the 10 mg/kg CTLA4Ig group, improvements in each individual ACR component (tender and swollen joint counts, CRP, pain, subject global assessment, physician global assessment, and physical function) at Day 360 were statistically significant relative to improvements for the placebo group. Mean percentage improvements from baseline to Day 360 are presented in Table 16 for all clinical parameters of the ACR criteria.

For the 2 mg/kg CTLA4Ig group, statistically significant improvements compared to the placebo group were observed in physician global assessment and CRP at Day 360. Furthermore, CRP levels in the placebo group actually worsened at Day 360. At Day 360, the CTLA4Ig (BMS-188667) treatment groups had greater changes from baseline in duration of morning stiffness compared to the placebo group.

TABLE 16

Mean Percentage Improvement from Baseline at Day 360 (Individual Components of ACR Criteria)

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Component	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Tender Joints	n=115	n=105	n=119
Mean % Change	66.39*	43.54*	29.97
Swollen Joints	n=115	n=105	n=119
Mean % Change	59.74*	46.40	36.17
CRP	n=112	n=98	n=115
Mean % Change	27.59*	10.31*	-31.26
Pain	n=112	n=104	n=119

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Component	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Mean % Change	44.93*	26.26	12.55
Subject Global Assessment	n=113	n=105	n=119
Mean % Change	41.01*	16.08	1.99
MD Global Assessment	n=113	n=105	n=119
Mean % Change	53.48*	37.87*	24.14
Physical Function	n=109	n=100	n=111
Mean % Change	42.32*	22.94	10.25
Duration Morning Stiffness	n=88	n=71	n=72
Mean ± SD	66.2 ± 59.5*	66.6 ± 72.2	49.7 ± 73.9

* Indicates $p<0.05$ in comparison with placebo since 95% CIs did not include zero

New Active Joints

The proportion of new active joints was determined using the validated 28-joint count (out of 68 total tender joints and out of 66 total swollen joints) proposed by 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). The proportion of new active joints (both tender and swollen) at Day 180 was lowest for subjects receiving 10 mg/kg CTLA4Ig (Figure 75).

At Day 180, the percentages of subjects reporting no new tender joints and no new swollen joints was highest in the 10 mg/kg CTLA4Ig group (Figure 76A, Figure 77A). The percentage of subjects who reported no new tender joints and no new swollen joints was approximately 59% and 52%, respectively, in the 10 mg/kg CTLA4Ig group; 38% and 44%, respectively, in the 2 mg/kg CTLA4Ig group; and 41% and 37%, respectively, in the placebo group.

The proportion of new active joints (both tender and swollen) at Day 360 was lowest for subjects receiving 10 mg/kg CTLA4Ig (Figure 78). This pattern for the proportion of new active joints mirrored the pattern seen at Day 180.

Similarly, at Day 360, the proportion of subjects reporting no new tender joints and no new swollen joints was highest in the 10 mg/kg CTLA4Ig group (Figure 76B, and Figure 77B). The percentage of subjects who reported no new tender and no new swollen joints was approximately 71% and 61%, respectively, in

141

the 10 mg/kg CTLA4Ig group; 41% and 44%, respectively, in the 2 mg/kg CTLA4Ig group; and 42% for both counts in the placebo group.

Improvement in Clinical Parameters Among Subjects with an ACR Response

Among ACR 20, ACR 50, and ACR 70 responders, improvement in the core components of the ACR criteria were slightly greater for the two CTLA4Ig (BMS-188667) treatment groups compared to placebo.

The onset of action for subjects who received the 10 mg/kg CTLA4Ig dose occurred after approximately 15 days, with significant increases in ACR 20 improvement occurring at ≥Day 60 for ACR50 at ≥Day 90 for ACR70 at ≥Day 30 and in each instance, continuing until Day 360 (see Figure 73A, Figure 73B and Figure 73C).

Changes from Baseline for the Health Outcomes Short Form Questionnaire (SF-36)

The impact of CTLA4Ig (BMS-188667) on health-related quality of life was assessed using the Health Outcomes Short Form Questionnaire SF-36 (summary scores range from 0 to 100 with higher scores indicating a better quality of life). Analyses were performed on the LOCF (last observation carried forward) data set as well as the as the observed data set.

For the 10 mg/kg CTLA4Ig group, statistically significant improvement from baseline compared to the placebo group was observed in all four mental health and all four physical health domains of the SF-36 at Day 180, using the LOCF analysis (i.e., 95% CIs did not include 0) (Figures 79A, 79B). For the 2 mg/kg CTLA4Ig group, there were numerical improvements in the mental health or physical health domains compared to placebo at Day 180, however, these improvements were not statistically significant.

Results of analyses performed on the as-observed data set were similar to those observed for the LOCF data set except that the "role emotional" domain at Day 180 was not significantly improved (but was numerically improved) for the comparison between the 10 mg/kg CTLA4Ig and placebo groups using the as-observed data set.

142

The physical component and the mental health component summary measures at Day 180 are shown in Table 17.

TABLE 17

Mean Change from Baseline to Day 180 for the SF-36 (Physical and Mental Health Components)

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Summary Score	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Mental Health Component	n=115	n=103	n=118
Baseline Mean	44.52	43.06	41.75
Postbaseline Mean	48.69	45.59	44.04
Mean Change from Baseline	4.17	2.53	2.30
95% CI	(2.46, 5.88)	(0.39, 4.67)	(0.42, 4.17)
Physical Component	n=115	n=103	n=118
Baseline Mean	31.13	30.80	32.33
Postbaseline Mean	39.30	35.47	35.21
Mean Change from Baseline	8.16	4.67	2.88
95% CI	(6.33, 9.99)	(3.25, 6.09)	(1.54, 4.22)

Results of the Health Outcomes at Day 360 were similar to those seen at Day 180. For the 10 mg/kg CTLA4Ig group, statistically significant improvements from baseline compared to the placebo group were observed in all four mental and all four physical domains of the SF-36 at Day 360, using the LOCF analysis (i.e., 95% CIs did not include 0) (Figures 80A, and 80B). For the 2 mg/kg CTLA4Ig group, a statistically significant difference in three of four physical domains at Day 360 and one of four mental domains at Day 360 compared to the placebo group was observed.

Results of analyses performed on the as-observed data set were similar to those observed for the LOCF data set.

The physical component and mental health component summary measures at Day 360 is shown in Table 18.

TABLE 18

Mean Change from Baseline to Day 360 for the SF-36 (Summaries of Physical Component and Mental Health Component)

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Summary Score	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Mental Health Component	n=115	n=103	n=118
Baseline Mean	44.52	43.06	44.75
Postbaseline Mean	48.83	45.65	43.22
Mean Change from Baseline	4.31	2.59	1.47
95% CI	(2.64, 5.98)	(0.64, 4.55)	(-0.14, 3.08)
Physical Component	n=115	n=103	n=118
Baseline Mean	31.13	30.80	32.33
Postbaseline Mean	38.93	36.49	34.93
Mean Change from Baseline	7.79	5.69	2.60
95% CI	(5.90, 9.68)	(4.10, 7.28)	(1.09, 4.11)

Biomarker and Pharmacodynamic Data

There were significant improvements (decreases) in 5 of the 6 biomarker/pharmacodynamic (PD) parameters with 10 mg/kg CTLA4Ig at Day 180 (soluble IL-2r, rheumatoid factor (RF), ICAM-1, E-selectin and IL-6) and a numerical decrease in TNF-α (Table 19). There were significant improvements (decreases) in 3 of the 6 biomarker/PD parameters with 2 mg/kg CTLA4Ig at Day 180 (soluble IL-2r, RF and IL-6) and a numerical improvement in ICAM-1. There were no significant changes in any of the biomarker/PD parameters with placebo at Day 180. There appears to be a dose response relationship with the improvements (decreases) in biomarker/PD parameters.

TABLE 19

Pharmacodynamic Measures at Day 180

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Parameter	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Soluble IL-2r (Normal range : 640-2543 pg/mL)	n=95	n=84	n=76
Baseline Mean (±SD)	1426.19 ± 751.76	1396.82 ± 610.21	1429.13 ± 667.84
Postbaseline Mean (±SD)	1112.62 ± 699.68	1261.31 ± 473.66	1470.03 ± 637.75
Mean Change	-316.23	-135.51	43.59
95% CI	(-417.73, -214.72)	(-241.48, -29.53)	(-71.24, 158.43)
Rheumatoid Factor (Normal Range: 0-20 IU/mL)	n=95	n=84	n=74
Baseline Mean (±SD)	289.71 ± 401.95	256.19 ± 307.92	196.11 ± 265.48
Postbaseline Mean (±SD)	185.43 ± 269.52	227.82 ± 276.27	204.36 ± 320.09
Mean Change	-104.27	-28.12	-0.62

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Parameter	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
95% CI	(-151.53, -57.01)	(-52.13, -4.11)	(-31.67, 30.43)
ICAM-1	n=95	n=82	n=75
Baseline Mean (±SD)	404.89 ± 137.72	393.47 ± 150.85	387.33 ± 230.93
Postbaseline Mean (±SD)	364.74 ± 109.47	387.25 ± 142.73	386.17 ± 163.82
Mean Change	-40.42	-6.22	1.09
95% CI	(-58.06, -22.78)	(-27.49, 15.05)	(-31.88, 34.05)
E-selectin	n=89	n=80	n=71
Baseline Mean (±SD)	68.07 ± 32.93	67.32 ± 37.13	68.23 ± 43.09
Postbaseline Mean (±SD)	61.01 ± 31.53	67.86± 40.20	67.37 ± 35.66
Mean Change	-8.41	0.54	-0.68
95% CI	(-13.24, -3.58)	(-5.95, 7.03)	(-6.87, 5.51)
Serum IL-6 (Normal Range: 0.3-14.8 pg/mL)	n=86	n=74	n=69
Baseline Mean (±SD)	28.47 ± 38.28	31.75 ± 42.29	21.20 ± 26.51
Postbaseline Mean (±SD)	9.25 ± 15.85	16.00 ± 22.13	23.98 ± 37.92
Mean Change	-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
Baseline Mean (±SD)	11.17 ± 23.72	7.51 ± 13.25	13.12 ± 23.20
Postbaseline Mean (±SD)	7.57 ± 7.90	6.20 ± 4.48	9.59 ± 11.21
Mean Change	-3.66	-1.21	-3.54
95% CI	(-8.62, 1.30)	(-4.32, 1.90)	(-7.82, 0.75)

Overall, the pattern in the changes in biomarker/PD data at Day 360 were similar to that seen at Day 180. There were significant improvements (decreases) in 5 of the 6 biomarker/PD parameters with 10 mg/kg CTLA4Ig at Day 360 (soluble IL-2r, RF, ICAM-1, E-selectin and IL-6) and a numerical, but not statistically significant improvement observed for TNF-α (Table 20). There was a significant improvement (decrease) in IL-6 only with 2 mg/kg CTLA4Ig at Day 360, however, numerical improvements were seen with RF and ICAM-1. There were no significant changes in any of the biomarker/PD parameters with placebo at Day 360. As seen with Day 180 data, it appeared that all of the improvements (decreases) in biomarker/PD parameters occurred in a dose response manner.

A comparison of the postbaseline means for the biomarker/PD parameters at Day 180 to those at Day 360 reveals important trends. For the 10 mg/kg CTLA4Ig group, all biomarkers/PD measures continued to decrease, with the exception of soluble IL-2r which increased slightly. For the 2 mg/kg CTLA4Ig group, mean values for 3 of the biomarkers/PD parameters either decreased slightly (ICAM-1, serum IL-6) or remained relatively constant (E-selectin) and mean values for the other 3 biomarkers/PD measures increased slightly (soluble IL-2r, RF, TNF α). For

the placebo group, mean values for all of the biomarkers/PD parameters increased slightly at Day 360, with the exception of TNF α which remained relatively unchanged.

TABLE 20

Pharmacodynamic Measures at Day 360

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Measure	**10 mg/kg (n=115)**	**2 mg/kg (n=105)**	**Placebo (n=119)**
Soluble IL-2r (Normal range: 640-2543 pg/mL)	n=68	n=56	n=55
Baseline Mean (±SD)	1372.10 ± 770.11	1373.86 ± 567.75	1459.93 ± 695.07
Postbaseline Mean (±SD)	1185.51 ± 638.95	1413.84 ± 452.50	1666.59 ± 611.97
Mean Change	-194.31	39.99	206.22
95% CI	(-305.67, -82.96)	(-69.87, 149.84)	(35.88, 376.56)
Rheumatoid Factor (Normal Range: 0-20 IU/mL)	n=69	n=55	n=58
Baseline Mean (±SD)	261.43 ± 333.58	258.42 ± 318.65	179.12 ± 207.72
Postbaseline Mean (±SD)	143.13 ± 180.80	236.61 ± 287.36	206.42 ± 256.27
Mean Change	-118.30	-25.64	20.90
95% CI	(-175.19, -61.42)	(-58.50, 7.23)	(-10.72, 52.51)
ICAM-1	n=77	n=68	n=64
Baseline Mean (±SD)	406.44 ± 145.22	393.41 ± 132.97	405.67 ± 245.16
Postbaseline Mean (±SD)	354.90 ± 111.40	380.42 ± 113.20	405.07 ± 194.15
Mean Change	-55.15	-12.98	1.47
95% CI	(-74.80, -35.49)	(-35.36, 9.39)	(-26.41, 29.35)
E-selectin	n=75	n=68	n=62
Baseline Mean (±SD)	68.84 ± 34.38	66.75 ± 37.10	69.72 ± 44.38
Postbaseline Mean (±SD)	58.77 ± 26.61	67.58± 31.50	71.90 ± 47.43
Mean Change	-10.89	0.83	2.34
95% CI	(-15.70, -6.08)	(-5.62, 7.28)	(-4.53, 9.20)
Serum IL-6 (Normal Range: 0.3-14.8 pg/mL)	n=56	n=47	n=48
Baseline Mean (±SD)	27.68 ± 38.56	27.19 ± 32.45	17.27 ± 22.47
Postbaseline Mean (±SD)	7.64 ± 14.21	13.93 ± 19.00	17.72 ± 29.76
Mean Change	-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
Baseline Mean (±SD)	9.71 ± 22.80	6.27 ± 3.62	10.81 ± 21.24
Postbaseline Mean (±SD)	6.67 ± 4.80	7.18 ± 8.14	9.36 ± 26.43
Mean Change	-3.02	1.08	-1.41
95% CI	(-8.70, 2.67)	(-1.26, 3.42)	(-5.14, 2.33)

The data are shown graphically for these biomarker/PD measures, as well as for changes in CRP levels, in Figures 81 through 87.

In order to assess the integrity of the planned analyses, all subjects who received study medication and discontinued the study for any reason were considered ACR non-responders at all scheduled study visits subsequent to discontinuation. Results of these analyses (Table 21) were consistent with the efficacy results already presented. The proportion of subjects who received 10 mg/kg CTLA4Ig and achieved an ACR 20, ACR 50, or ACR 70 response at Day 180 was significantly ($p<0.001$) higher compared to the proportion of subjects who received placebo. For the 2 mg/kg CTLA4Ig group, a significantly ($p\leq0.009$) higher proportion of subjects achieved either an ACR 50 or ACR 70 response.

TABLE 21

ACR Response at Day 180 (Non-Completer Equals Non-Responder)

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	Placebo (n=119)
ACR 20, n (%)	67 (58.3)	41 (39.0)	38 (31.9)
Diff (CI)	26.3 (13.6, 39.1)	7.1 (-5.4, 19.7)	N/A
p-value	<0.001[a]	0.266	N/A
ACR 50, n (%)	41 (35.7)	24 (22.9)	12 (10.1)
Diff (CI)	25.6 (14.8, 36.3)	12.8 (3.1, 22.4)	N/A
p-value	<0.001[a]	0.009[a]	N/A
ACR 70, n(%)	19 (16.5)	11 (10.5)	2 (1.7)
Diff (CI)	14.8 (7.5, 22.2)	8.8 (2.7, 14.9)	N/A
p-value	<0.001[a]	0.005[a]	N/A

[a] Indicates a statistically significant difference for the comparison of BMS-188667 vs placebo.

In addition, all primary efficacy analyses were performed on the WOCF (worst observation carried forward) data set . ACR responses based on the WOCF data set were slightly lower than those reported in Table 13 and were comparable to those presented in Table 21. These findings confirm the consistency of ACR response rates in the CTLA4Ig (BMS-188667) treatment groups.

The dosages of anti-rheumatic concomitant medications were to be collected to assess the need for these medications at 6 and 12 months; however, the available data were inadequate to perform these analyses. Only baseline values for mean dose of methotrexate and systemic (non-topical) corticosteroids are provided.

Efficacy Conclusions

CTLA4Ig (BMS-188667) administered at 10 mg/kg (+ MTX) had superior efficacy compared to placebo (+ MTX) at Day 180 and Day 360. For the following efficacy parameters, administration of 10 mg/kg CTLA4Ig was significantly better than placebo:

- Primary efficacy variable: ACR20 response at Day 180 ($p<0.001$)
- ACR50 and ACR70 responses at Day 180 ($p<0.001$)
- ACR20, ACR50 and ACR70 responses at Day 360 ($p\leq0.003$)
- Statistically significant differences in ACR50 and ACR70 responses observed by Day 30 ($p=0.039$ and $p=0.04$), statistically significant differences in all 3 response rates (ACR 20, ACR50 and ACR70) observed by Day 90; these values remained statistically significant at every timepoint up to and including Day 360 ($p\leq0.008$)
- Proportions of subjects who achieved a Major Clinical Response (maintenance of an ACR 70 response over a continuous 6-month period) at Day 360 ($p=0.008$)
- Mean numeric ACR-AUC by Day 360 ($p<0.001$)
- Mean percentage improvements in each individual ACR component at Day 180 and Day 360 ($p<0.05$, 95% CIs did not include 0)
- Improvements in all four mental and all four physical domains of the Health Outcomes evaluation (SF-36) at both Day 180 and Day 360 ($p<0.05$, 95% CIs did not include 0)

In addition to the above statistically significant differences, the 10 mg/kg CTLA4Ig group had a lower number of new active joints and a higher number of subjects reporting no new active tender and swollen joints compared with the placebo group at Day 180 and at Day 360.

Significant improvement with 10 mg/kg CTLA4Ig compared with placebo was seen in nearly all measured pharmacodynamic paramenters (soluble IL12r, RF, ICAM-1, E-selectin and IL-6) and numerical improvement in TNF-α up to 1 year.

For the 2 mg/kg CTLA4Ig group, some efficacy parameters were significantly better compared to the placebo group:

- ACR50 response at Day 180 (p=0.027)
- ACR70 response at Day 180 (p=0.005)
- Statistically significant differences in ACR70 observed by Day 60 (p=0.032) and statistically significant differences in ACR 50 and ACR 70 at Day 180 (p=0.027 and p=0.005)
- Proportions of subjects who achieved a Major Clinical Response (maintenance of an ACR 70 response over a continuous 6-month period) at Day 360 (p=0.036)
- Mean percentage improvements in some of the individual ACR component at Day 180 and Day 360 (p<0.05, 95% CIs did not include 0)

For many other efficacy parameters, 2 mg/kg CTLA4Ig was numerically better than placebo.

Safety Results

Overall, the safety profile of CTLA4Ig (BMS-188667) was similar to placebo. There were no major safety problems.

Clinical Laboratory Evaluation

Overall, no new safety issues emerged from the evaluation of mean changes in laboratory values. Mean values for hemoglobin, WBCs, neutrophils, platelets, ALT, AST, GGT and total protein were within the normal range at baseline and remained within the normal range during the study. In general, results of the laboratory tests did not reveal consistent out-of range values or abnormal trends that could be attributed to study medication.

Vital Signs, Physical Findings, and Observations Related to Safety

On each day of study drug administration, vital signs (body temperature, heart rate, and seated blood pressure) were monitored pre-dose and at 15, 30, 45, 60, 75, 90 and 120 minutes post-infusion. Overall, mean values for all vital sign parameters were within normal range and stable throughout the 360-day study period for all treatment groups.

EXAMPLE 8

While established animal models that mimic acute coronary syndrome in humans do not exist, the use of CTLA4Ig or L104EA29YIg to inhibit atherosclerosis in animal models may be possible. Using murine CTLA4Ig, the ability to suppress atherosclerosis in apolipoprotein E null (apoE -/-) mice maintained on a high fat diet and with and without a stimulus to promote inflammation (i.e., infectious agents, cytokine administration) is explored. It is anticipated that CTLA4Ig may afford reduction of atherosclerotic plaque formation in this animal model as compared with mice receiving placebo (sham) injections.

EXAMPLE 9

The potential use of CTLA4Ig or L104EA29YIg is further explored in several patient populations.

Patients presenting to the hospital with unstable angina or non-ST-segment elevation myocardial infarction (non-STEMI) and evidence of underlying inflammation (i.e., elevated hsCRP) are randomized to receive either placebo or CTLA4Ig/L104EA29YIg. Patients receive a background of standard medical or interventional therapies as ethically mandated and consistent with the most recent American Heart Association / American College of Cardiology Guidelines. The primary endpoint would be a clinical composite reflecting a reduction in subsequent patient morbidity and mortality and/or a redcution of subsequent risk reduction as measred by hsCRP (or other infalmmatory marker[s]).

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for treating a cardiovascular disease comprising administering to a subject an effective amount of a molecule that blocks B7 interactions with CTLA4 and/or CD28.

2. The method of Claim 1, wherein said molecule that blocks B7 interactions with CTLA4 and/or CD28 is a soluble CTLA4 molecule

3. The method of Claim 1, wherein said cardiovascular disease is selected from the group consisting of: atherosclerosis; coronary heart disease (CHD); restensosis; peripheral arterial disease; coronary bypass grafting surgery; carotid artery disease; arteritis; myocarditis; cardiovascular inflammation; vascular inflammation; unstable angina (UA); unstable refractory angina; stable angina (SA); chronic stable angina; acute coronary syndrome (ACS); myocardial infarction; acute myocardial infarction (AMI), including first or recurrent myocardial infarction, non-Q wave myocardial infarction, non-ST-segment elevation myocardial infarction and ST-segment elevation myocardial infarction.

4. The method of Claim 3, wherein said cardiovascular disease is selected from the group consisting of: atherosclerosis; coronary heart disease (CHD); unstable angina (UA); unstable refractory angina; stable angina (SA); chronic stable angina; acute coronary syndrome (ACS); myocardial infarction; acute myocardial infarction (AMI), including first or recurrent myocardial infarction, non-Q wave myocardial infarction, non-ST-segment elevation myocardial infarction and ST-segment elevation myocardial infarction.

5. The method of Claim 1, wherein said carcardiovascular disease is mediated by T cell interactions with B7-positive cells.

6. The method of Claim 1, wherein said cardiovascular disease is associated with at least one marker of inflammation.

151

7. The method of Claim 6, wherein said marker of inflammation is selected from the group consisting of CRP, hsCRP, IL-10, CD40L, sCD40L, IL-6, sICAM-1, TNF-α, white blood cell count, fibrinogen, and serum amyloid A.

8. The method of Claim 7, wherein said marker of inflammation is selected from the group consisting of CRP, hsCRP, IL-6, and TNF-α.

9. The method of Claim 2, wherein the effective amount the soluble CTLA4 molecule is about 0.1 to 100 mg/kg weight of the subject, about 0.5 to 100 mg/kg weight of a subject 0.5 to 5 mg/kg weight of a subject, about 5 to 10 mg/kg weight of a subject, about 10 to 15 mg/kg weight of a subject, about 15 to 20 mg/kg weight of a subject, about 20 to 25 mg/kg weight of a subject, about 25 to 30 mg/kg weight of a subject, about 30 to 35 mg/kg weight of a subject, about 35 to 40 mg/kg weight of a subject, about 40 to 45 mg/kg of a subject, about 45 to 50 mg/kg weight of a subject, about 50 to 55 mg/kg weight of a subject, about 55 to 60 mg/kg weight of a subject, about 60 to 65 mg/kg weight of a subject, about 65 to 70 mg/kg weight of a subject, about 70 to 75 mg/kg weight of a subject, about 75 to 80 mg/kg weight of a subject, about 80 to 85 mg/kg weight of a subject, about 85 to 90 mg/kg weight of a subject, about 90 to 95 mg/kg weight of a subject, about 95 to 100 mg/kg weight of a subject, about 2 to 10 mg/kg weight of a subject, about 0.1 to 4 mg/kg weight of a subject, about 0.1 to 0.5 mg/kg weight of a subject, about 0.5 to 1.0 mg/kg weight of a subject, about 1.0 to 1.5 mg/kg weight of a subject, about 1.5 to 2.0 mg/kg weight of a subject, about 2.0 to 2.5 mg/kg weight of a subject, about 2.5 to 3.0 mg/kg weight of a subject, about 3.0 to 3.5 mg/kg weight of a subject, about 3.5 to 4.0 mg/kg weight of a subject, about 4.0 to 4.5 mg/kg weight of a subject, about 4.5 to 5.0 mg/kg weight of a subject, about 5.0 to 5.5 mg/kg weight of a subject, about 5.5 to 6.0 mg/kg weight of a subject, about 6.0 to 6.5 mg/kg weight of a subject, about 6.5 to 7.0 mg/kg weight of a subject, about 7.0 to 7.5 mg/kg weight of a subject, about 7.5 to 8.0 mg/kg weight of a subject, about 8.0 to 8.5 mg/kg weight of a subject, about 8.5 to 9.0 mg/kg weight of a subject, about 9.0 to 9.5 mg/kg weight of a subject, about 9.5 to 10.0 mg/kg weight of a subject, about 0.1 to 2 mg/kg weight of a subject, about 2 to 4 mg/kg weight of a subject, about 4 to 6 mg/kg weight of a subject, about 6 to 8 mg/kg weight of a subject, about 8 to 10 mg/kg weight of a

subject, about 10 to 12 mg/kg weight of a subject, about 12 to 14 mg/kg weight of a subject, about 14 to 16 mg/kg weight of a subject, about 16 to 18 mg/kg weight of a subject, about 18 to 20 mg/kg weight of a subject, about 0.5 mg/kg weight of the subject, 2 mg/kg weight of the subject, 10 mg/kg weight of the subject, about 0.5 mg/kg to 100 weight of the subject, about 0.5 to 10 mg/kg weight of a subject, about 0.1 to 20 mg/kg weight of a subject , about 500 mg for a subject weighing less than 60 kg, 750 mg for a subject weighing between 60-100 kg or 1000 mg for a subject weighing more than 100 kg.

10. The method of Claim 2, wherein the soluble CTLA4 molecule comprises an extracellular domain of a CTLA4 molecule, or portion thereof, which binds a B7 antigen expressed on activated B cells.

11. The method of Claim 10, wherein the extracellular domain of the CTLA4 molecule comprises the amino acids shown in Figure 23 beginning with methionine at position +1 or with alanine at position -1 and ending with aspartic acid at position 124.

12. The method of Claim 2, wherein the soluble CTLA4 molecule is a CTLA4 fusion molecule.

13. The method of Claim 11, wherein the CTLA4 fusion molecule comprises an extracellular domain of a CTLA4 molecule which binds a B7 antigen expressed on activated B cells joined to a non-CTLA4 molecule.

14. The method of Claim 13, wherein the extracellular domain of the CTLA4 molecule comprises the amino acids shown in Figure 23 beginning with methionine at position +1 or with alanine at position -1 and ending with aspartic acid at position 124.

15. The method of Claim 13, wherein the non- CTLA4 molecule comprises an amino acid sequence which alters the solubility or affinity of the soluble CTLA4 molecule.

16. The method of Claim 15, wherein the amino acid sequence which alters the solubility or affinity comprises an immunoglobulin moiety.

17. The method of Claim 16, wherein the immunoglubulin moiety comprises one or more mutations to reduce effector function.

18. The method of Claim 16, wherein the immunoglobulin moiety comprises a hinge and any or all of the cysteine residues within the hinge are substituted with serine.

19. The method of Claim 16, wherein the immunoglubulin moiety is an immunoglubulin constant region or portion thereof.

20. The method of Claim 19, wherein the immunoglubulin constant region or portion thereof is mutated to reduce effector function.

21. The method of Claim 19, wherein the immunoglubulin constant region comprises a hinge, CH2 and CH3 regions of an immunoglobulin molecule.

22. The method of Claim 19, wherein the immunoglubulin constant region or portion thereof is a human or monkey immunoglobulin constant region or portion therof.

23. The method of Claim 12, wherein the CTLA4 fusion molecule is CTLA4Ig.

24. The method of Claim 23, wherein the CTLA4Ig is shown in Figure 24 beginning with methionine at position +1 or with alanine at position -1 and ending with lysine at position +357.

25. The method of Claim 2, wherein the soluble CTLA4 molecule is a soluble CTLA4 mutant molecule.

26. The method of Claim 25, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule binds a B7 antigen expressed on activated B cells and comprises a mutation in the extracellular domain of a CTLA4 molecule.

27. The method of Claim 25, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule comprises an extracellular domain of CTLA4,

a) wherein the extracellular domain of CTLA4 begins with methionine at position +1 or with alanine at position -1 and ends with aspartic acid at position +124 as shown in Figure 23, and

wherein at position +104 of the extracellular domain of CTLA4, leucine is substituted with any other amino acid.

28. The method of Claim 25, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule comprises an extracellular domain of CTLA4,

a) wherein the extracellular domain of CTLA4 begins with methionine at position +1 or with alanine at position -1 and ends with aspartic acid at position +124 as shown in Figure 23,

b) wherein at position +104 of the extracellular domain of CTLA4, leucine is substituted with glutamic acid, and

c) wherein at position +29 of the extracellular domain of CTLA4, alanine is substituted with tyrosine.

29. The method of Claim 25, wherein the soluble CTLA4 mutant molecule is L104EA29YIg as shown in Figure 19 beginning with methionine at position +1 or with alanine at position -1 and ending with lysine at position +357 as shown in Figure 19.

ABSTRACT OF THE INVENTION

The present invention relates to compositions and methods for treating cardiovascular system diseases by administering to a subject soluble CTLA4 molecules that block endogenous B7 molecules from binding their ligands.

SEQUENCE LISTING

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

<120> METHODS FOR TREATING CARDIOVASCULAR DISEASE USING A SOLUBLE CTLA4 MOLECULE

<130> D0340

<140> PCT/US04/24840
<141> 2004-08-03

<150> 60/492,430
<151> 2003-08-04

<<160> 22

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oncostatin M CTLA4 forward primer

<400> 1
ctcagtctgg tccttgcact cctgtttcca agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc 60

cagcc 65

<210> 2
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oncostatin M CTLA4 reverse primer

<400> 2
tttgggctcc tgatcagaat ctgggcacgg ttg 33

<210> 3
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oncostatin M CTLA4 forward primer

<400> 3
ctagccactg aagcttcacc aatgggtgta ctgctcacac agaggacgct gctcagtctg 60

gtccttgcac tc 72

<210> 4
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oncostatin M CTLA4 (OMCTLA4) forward primer

<400> 4
gaggtgataa agcttcacca atgggtgtac tgctcacaca g 41

<210> 5
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oncostatin M CTLA4 (OMCTLA4) reverse primer

<400> 5
gtggtgtatt ggtctagatc aatcagaatc tgggcacggt tc 42

<210> 6
<211> 1152
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L104EIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (79)..()

<400> 6

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca      48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct      96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag     144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg     192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg     240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc     288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac     336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac     384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa     432
Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac     480
```

```
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc      528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc      576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag      624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag      672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc      720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag      768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc      816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc      864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg      912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat      960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    280                 285                 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc     1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg     1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                315                 320                 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg     1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga     1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355
```

<210> 7
<211> 383
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L104EIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<400> 7

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245
```

```
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    280                 285                 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                315                 320                 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355
```

<210> 8
<211> 1152
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L104EA29YIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (79)..()

<400> 8

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca       48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct       96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag      144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa tat act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg      192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg      240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50
ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc      288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70
```

```
agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac      336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac      384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa      432
Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac      480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc      528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc      576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag      624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag      672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc      720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag      768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc      816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc      864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg      912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat      960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    280                 285                 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc     1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg     1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                315                 320                 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg     1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340
```

```
cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga     1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355


<210>  9
<211>  383
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence

<220>
<223>  L104EA29YIg, fusion protein containing mutated extracellular
        domain of human CTLA4

<400>  9

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25             -20                 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5              -1  1               5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
40                  45                  50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195
```

```
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    280                 285                 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                315                 320                 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355
```

<210> 10
<211> 1152
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L104EA29LIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (79)..()

<400> 10

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca       48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct       96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag      144
```

```
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
                10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa ttg act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg      192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Leu Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg      240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc      288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac      336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85
acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac      384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa      432
Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac      480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc      528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc      576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag      624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag      672

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc      720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag      768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc      816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc      864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg      912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat      960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
```

```
    280                 285                 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc     1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg     1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                315                 320                 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg     1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga     1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355


<210>  11
<211>  383
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence

<220>
<223>  L104EA29LIg, fusion protein containing mutated extracellular
       domain of human CTLA4

<400>  11

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15


Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5


Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20


Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Leu Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35


Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50


Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70


Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85


Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130


Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150
```

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
155 160 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
170 175 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
185 190 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
200 205 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215 220 225 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
235 240 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295 300 305 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
345 350 355

<210> 12
<211> 1152
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L104EA29TIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (79)..()

<400> 12

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca       48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct       96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag      144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa act act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg      192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Thr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg      240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc      288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac      336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac      384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa      432
Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac      480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc      528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc      576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag      624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag      672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc      720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag      768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230
```

```
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc      816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc      864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg      912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat      960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    280                 285                 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc     1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg     1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                315                 320                 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg     1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340
cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga     1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355
```

<210> 13
<211> 383
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L104EA29TIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<400> 13

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Thr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85
```

```
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                 100

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    280                 285                 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                315                 320                 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355
```

<210> 14
<211> 1152
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L104EA29WIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (79)..()

<400> 14

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca       48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct       96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag      144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa tgg act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg      192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Trp Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg      240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc      288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac      336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac      384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa      432
Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac      480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc      528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc      576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag      624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
```

```
            170                 175                 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag      672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc      720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag      768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc      816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc      864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg      912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat      960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    280                 285                 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc     1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg     1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                315                 320                 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg     1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga     1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355
```

<210> 15
<211> 383
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L104EA29WIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<400> 15

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20
```

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Trp Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
25 30 35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
40 45 50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55 60 65 70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
75 80 85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
90 95 100

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
105 110 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
120 125 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135 140 145 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
155 160 165
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
170 175 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
185 190 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
200 205 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215 220 225 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
235 240 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

295 300 305 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
345 350 355

<210> 16
<211> 636
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(636)
<220>
<221> mat_peptide
<222> (79)..()

<400> 16

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca       48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct       96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag      144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg      192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg      240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc      288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  .70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac      336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac      384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa      432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gac ttc ctc ctc tgg atc ctt gca gca gtt agt      480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
    120                 125                 130
```

```
tcg ggg ttg ttt ttt tat agc ttt ctc ctc aca gct gtt tct ttg agc      528
Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
135                 140                 145                 150

aaa atg cta aag aaa aga agc cct ctt aca aca ggg gtc tat gtg aaa      576
Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
                155                 160                 165

atg ccc cca aca gag cca gaa tgt gaa aag caa ttt cag cct tat ttt      624
Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
            170                 175                 180

att ccc atc aat                                                     636
Ile Pro Ile Asn
        185
```

<210> 17
<211> 212
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
    120                 125                 130

Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
135                 140                 145                 150
```

```
Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
                155                 160                 165

Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
            170                 175                 180

Ile Pro Ile Asn
        185


<210>  18
<211>  1152
<212>  DNA
<213>  Artificial Sequence

<220>
<223>  CTLA4Ig, fusion protein containing extracellular
       domain of human CTLA4


<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(1149)

<220>
<221>  mat_peptide
<222>  (79)..()

<400>  18
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca       48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct       96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag      144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg      192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg      240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc      288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac      336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85


acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac      384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa      432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac      480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130
```

```
aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggt gga tcg tca gtc      528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc      576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag      624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag      672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc      720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag      768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc      816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc      864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg      912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat      960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    280                 285                 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc     1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg     1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                315                 320                 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg     1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga     1152

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355
```

<210> 19
<211> 383
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CTLA4Ig, fusion protein containing extracellular domain of human CTLA4

<400> 19

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115



Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260
```

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295 300 305 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
345 350 355

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 20

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
1 5

<210> 21
<211> 1152
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CTLA4Ig, fusion protein containing extracellular domain of human CTLA4

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (79)..()

<400> 21
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca 48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
-25 -20 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct 96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10 -5 -1 1 5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag 144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
10 15 20

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg 192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg

```
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg      240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc      288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70
agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac      336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac      384

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa      432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac      480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc      528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc      576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag      624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag      672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc      720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag      768

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc      816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc      864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg      912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat      960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    280                 285                 290
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc     1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310
```

```
gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg     1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                315                 320                 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg     1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga     1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355
```

<210> 22
<211> 383
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CTLA4Ig, fusion protein containing extracellular domain of human CTLA4

<400> 22

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100



Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165
```

```
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
           170                 175                 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
       185                 190                 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
   200                 205                 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
               235                 240                 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
           250                 255                 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
       265                 270                 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
   280                 285                 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
               315                 320                 325



Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
           330                 335                 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
       345                 350                 355
```

Demographic -1-

		Placebo N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	Total N=214
Gender	Male	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
	Female	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	.160 (75%)
Race	White	30 (94%)	23 (88%)	30 (94%)	30 (94%)	29 (91%)	25 (86%)	27 (87%)	194 (91%)
	Black	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (3 %)	3 (10%)	2 (6%)	9 (4%)
	Other	0 (0%)	3 (12%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	11 (5%)
Disease Duration	< 2 years	12 (38%)	5 (19%)	8 (25%)	12 (38%)	10 (31%)	10 (34%)	11 (35%)	68 (32%)
	2-5 years	14 (44%)	11 (42%)	18 (56%)	13 (41%)	14 (44%)	14 (48%)	12 (39%)	96 (45%)
	5-7 years	6 (19%)	8 (31%)	6 (19%)	6 (19%)	6 (19%)	5 (17%)	7 (23%)	44 (21%)
	> 7years	0 (0%)	2 (8%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (6%)	0 (0%)	1 (3%)	6 (3%)
Duration Disease (years)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Mean	3.2	4.2	3.3	3.4	3.7	3.1	3	3.4
	Sd	2	2	1.7	2.1	2	1.8	2.2	2
	Min	0.3	0.2	0.4	0	0.7	0.4	0	0
	Max	7	7.5	6.8	7.3	7.6	7	7.1	7.6

FIG. 1A

Demographic -2-

		Placebo N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	Total N=214
Gender	Male	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
	Female	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
Age	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Mean	48.3	46.9	46.2	51.5	49.3	50.8	45.6	48.4
	Sd	11.7	12.2	13.4	11.5	8.8	10.7	10.1	11.3
	Min	22	25	21	24	27	24	28	21
	Max	66	64	64	66	66	65	64	66
Weight (kg)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Mean	72.9	70.6	72.7	70	69.8	68.9	71.7	71
	Sd	13.5	17.4	14.4	16.7	12.8	12.1	15.8	14.6
	Min	46.7	45	50	40.1	48	47	39.2	39.2
	Max	98.2	101.3	99	101.3	95	93.8	99	101.3
Disease activity (patient)	N	32	26	32	32	32	29	31	215
	Mean	3.6	3.6	3.7	3.6	3.5	3.6	3.5	3.6
	Sd	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.7	0.8
	Min	2	2	2	2	2	2	2	2
	Max	5	5	5	5	5	5	5	5

FIG. 1B

WO 2005/016366 PCT/US2004/024840 2/108

Demographic - Disease -

		Placebo N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	Total N=214
Disease activity (physician)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Mean	3.6	3.5	3.5	3.7	3.4	3.4	3.5	3.5
	Sd	0.7	0.6	0.8	1	0.6	0.8	0.6	0.7
	Min	2	3	2	2	2	2	3	2
	Max	5	5	5	5	5	5	5	5
ESR	N	32	26	32	32	32	29	30	213
	Mean	43.3	35.2	41.6	36.3	29.8	40.9	39.3	38.1
	Sd	29.4	22.5	27.4	27.9	24.2	30.2	24.6	26.8
	Min	2	4	4	3	0	6	2	0
	Max	116	90	94	98	91	110	102	116
Physical function (score)	N	32	26	31	32	32	29	31	213
	Mean	16.8	15.5	16.2	17.1	15.3	16.3	16.1	16.2
	Sd	5.4	4.2	5.5	5.7	3.7	4.8	3.8	4.8
	Min	8	8	8	8	8	8	9	8
	Max	32	23	26	28	24	26	26	32
CRP	N	30	23	31	31	31	28	31	205
	Mean	56.7	26.4	48	33.6	28.1	48.1	37.5	40.1
	Sd	62.7	30.3	47.3	46	39.1	64.5	35.2	48.6
	Min	2	5	3	3	3	3	3	2
	Max	248	115	198	182	200	333	135	333

FIG. 1C

Demographic - Disease -

		Placebo N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	Total N=214
Tender joints (score)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Mean	32.1	32.5	32.1	29.4	25.6	30.7	30.6	30.4
	Sd	14.8	14.8	15	14.6	12	13.3	12.9	13.9
	Min	12	14	11	12	12	12	12	11
	Max	63	64	68	68	61	63	59	68
Swollen joints (score)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Mean	23.9	18.6	26.9	22.7	18.3	22.6	19.9	21.9
	Sd	10	6.3	11.4	12.7	7.6	8.5	8.9	10
	Min	10	10	10	10	10	10	10	10
	Max	51	33	53	58	36	40	44	58
Pain (score)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Mean	3.5	3.4	3.5	3.5	3.5	3.3	3.5	3.5
	Sd	0.9	0.6	0.6	1	0.7	0.8	0.7	0.8
	Min	2	2	2	1	2	2	3	1
	Max	5	5	5	5	5	5	5	5
AM stiffness (min.)	N	31	26	32	31	32	29	30	211
	Mean	156.6	211.5	145.2	149.5	160.9	160.3	147.5	160.5
	Sd	121.5	370.6	102.1	148.7	151.1	152.3	258.3	198.1
	Min	30	0	5	35	30	0	15	0
	Max	600	1440	420	720	600	720	1440	1440

FIG. 1D

Demographic- Prior treatments -

		Placebo N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	Total N=214
Etanercept	Yes	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	No	32 (100%)	26 (100%)	32 (100%)	32 (100%)	32 (100%)	29 (100%)	31 (100%)	214 (100%)
Methotrexate	Yes	23 (72%)	22 (85%)	26 (81%)	24 (75%)	24 (75%)	21 (72%)	28 (90%)	168 (79%)
	No	9 (28%)	4 (15%)	6 (19%)	8 (25%)	8 (25%)	8 (28%)	3 (10%)	46 (21%)
Other DMARDs	Yes	28 (86%)	23 (88%)	25 (78%)	26 (81%)	28 (86%)	24 (83%)	25 (81%)	179 (84%)
	No	4 (13%)	3 (12%)	7 (22%)	6 (19%)	4 (13%)	5 (17%)	6 (19%)	35 (16%)
C-Steroids	Yes	31 (97%)	26 (100%)	29 (91%)	27 (84%)	27 (84%)	28 (97%)	24 (77%)	192 (90%)
	No	1 (3%)	0 (0%)	3 (9%)	5 (16%)	5 (16%)	1 (3%)	7 (23%)	22 (10%)
NSAIDs	Yes	27 (84%)	20 (77%)	30 (94%)	29 (91%)	26 (81%)	25 (86%)	25 (77%)	181 (85%)
	No	5 (16%)	6 (23%)	2 (6%)	3 (9%)	6 (19%)	4 (14%)	7 (23%)	33 (15%)
Other	Yes	30 (94%)	22 (85%)	29 (91%)	30 (94%)	31 (97%)	29 (100%)	29 (94%)	200 (93%)
	No	2 (6%)	4 (15%)	3 (9%)	2 (6%)	1 (3%)	0 (0%)	2 (6%)	14 (7%)

FIG. 1E

WO 2005/016266 PCT/US2004/024840 5/108

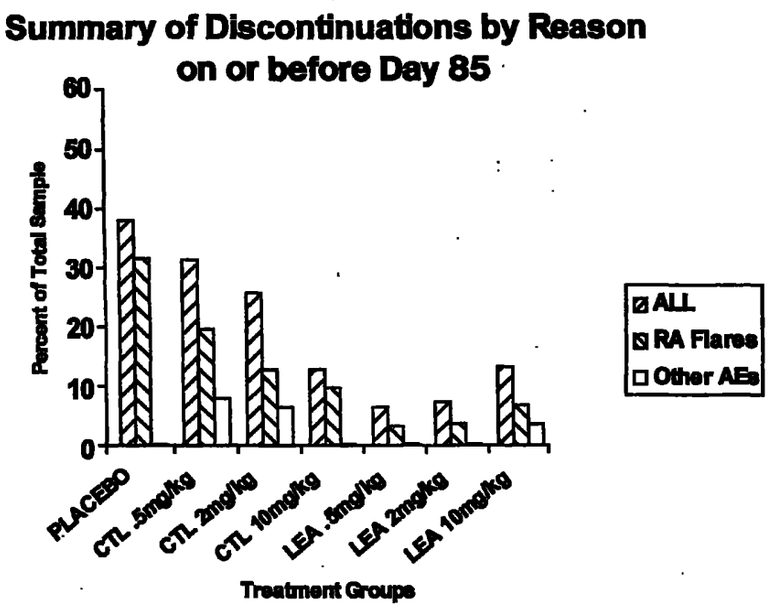


FIG. 2

WO 2005/016265 6/108 PCT/US2004/024849

ACR response at Day 85

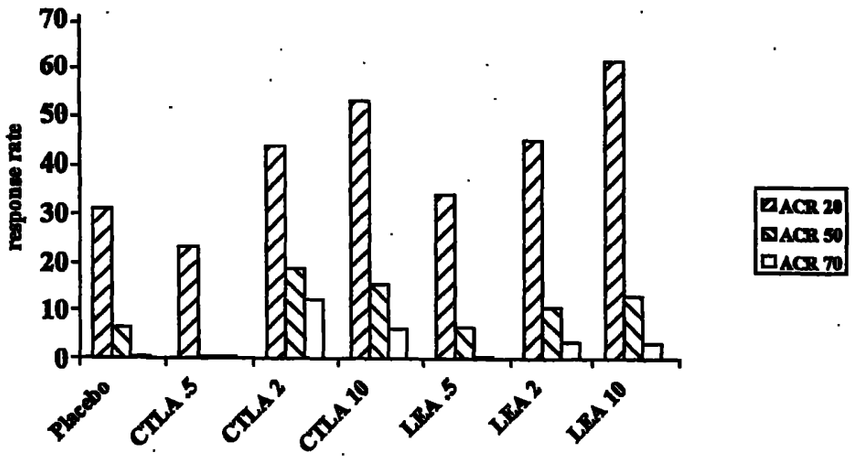


FIG. 3A

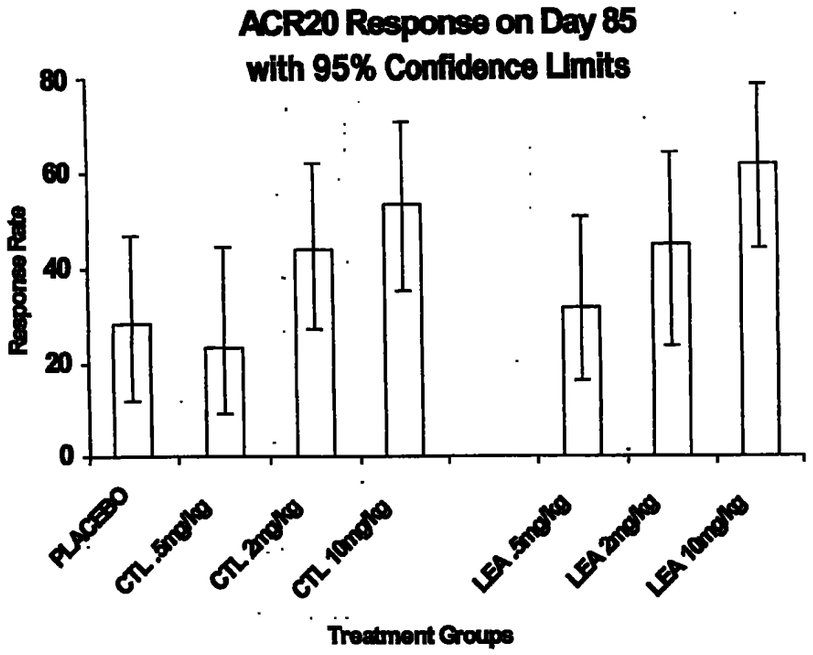

ACR20 Response on Day 85
with 95% Confidence Limits
Response Rate
80
60
40
20
0
PLACEBO
CTL .5mg/kg
CTL 2mg/kg
CTL 10mg/kg
LEA .5mg/kg
LEA 2mg/kg
LEA 10mg/kg
Treatment Groups

FIG. 3B

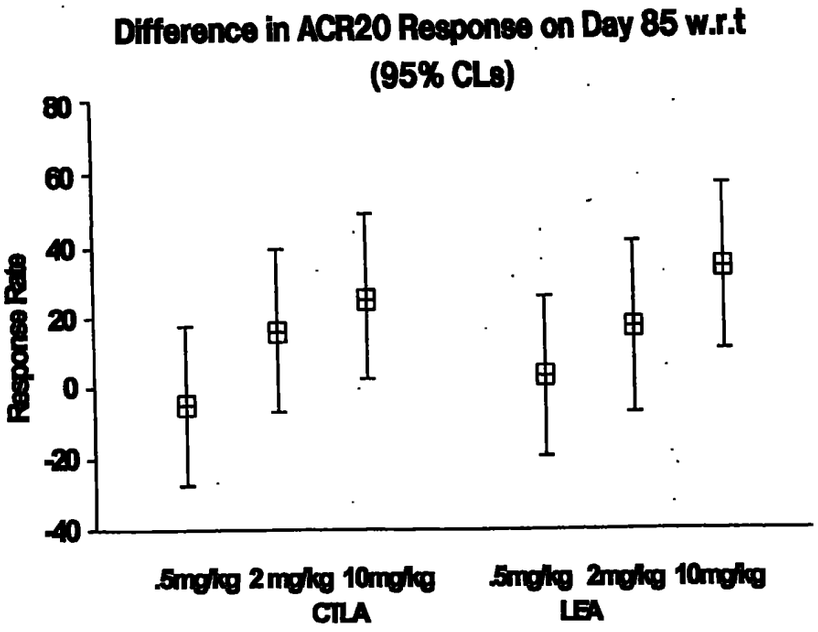

Difference in ACR20 Response on Day 85 w.r.t
(95% CLs)
Response Rate
80
60
40
20
0
-20
-40
.5mg/kg
2 mg/kg
10mg/kg
CTLA
.5mg/kg
2mg/kg
10mg/kg
LEA

FIG. 3C

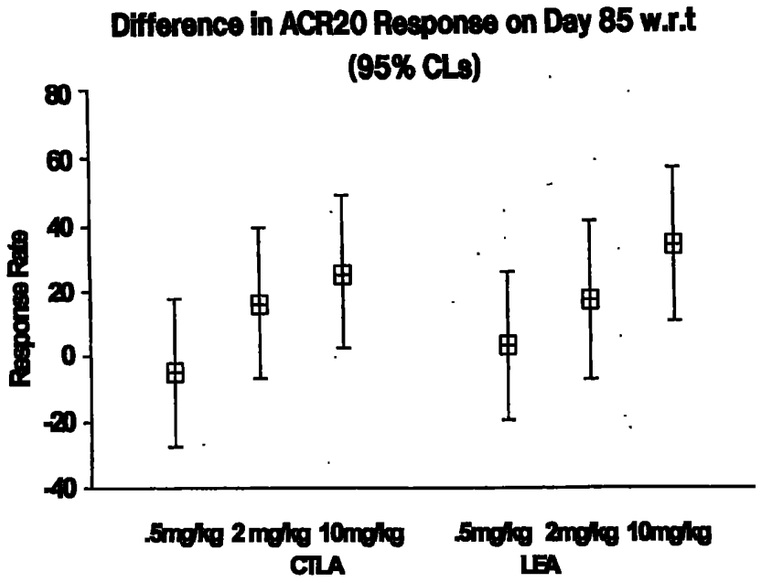


FIG. 3C

WO 2005/016366
9/108
PCT/US2004/024040

Basic (20%) Clinical Response in swollen & tender joint count

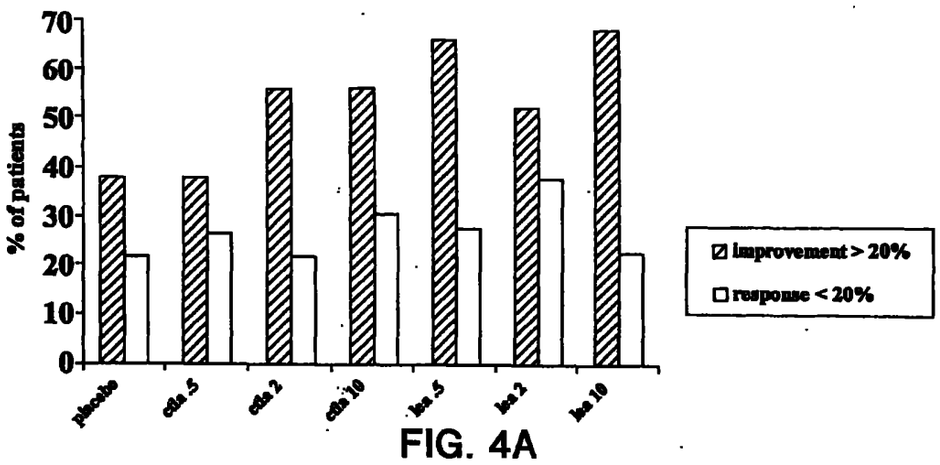


FIG. 4A

WO 2005/016366 PCT/US2004/024849 18/108

Clinical Response at Day 85

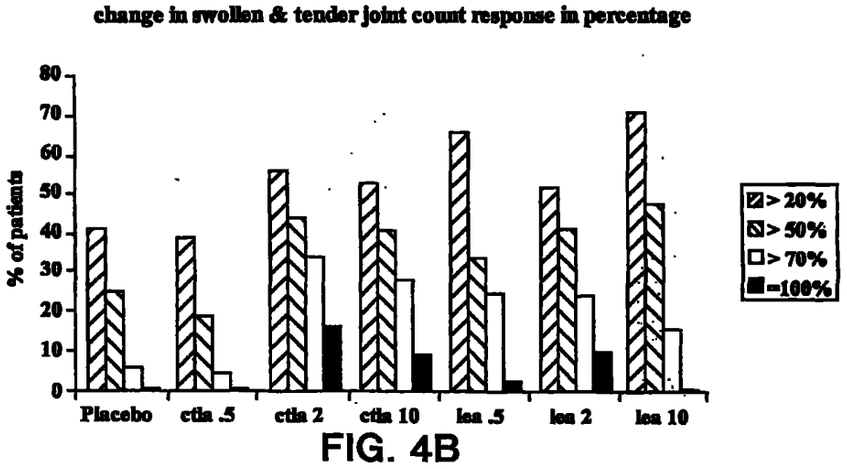


FIG. 4B

Pain
(Likert scale unit changes)

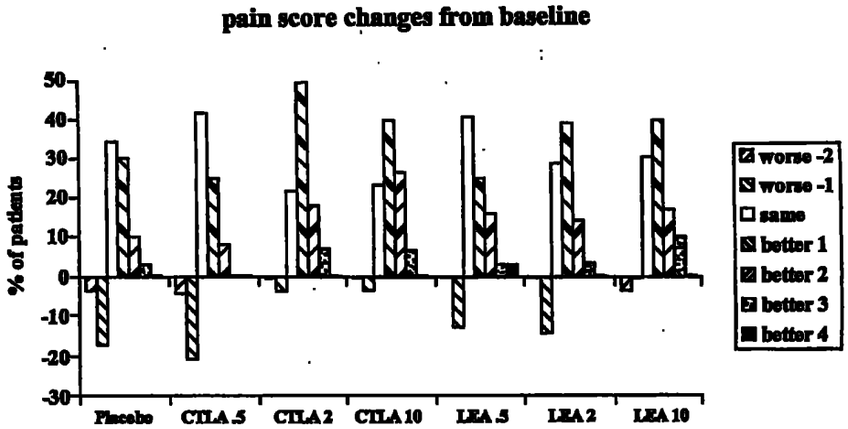


FIG. 5A

WO 2005/016266 12/108 PCT/US2004/024840

Patient Global Disease Changes

(Likert scale unit changes)

score changes from baseline

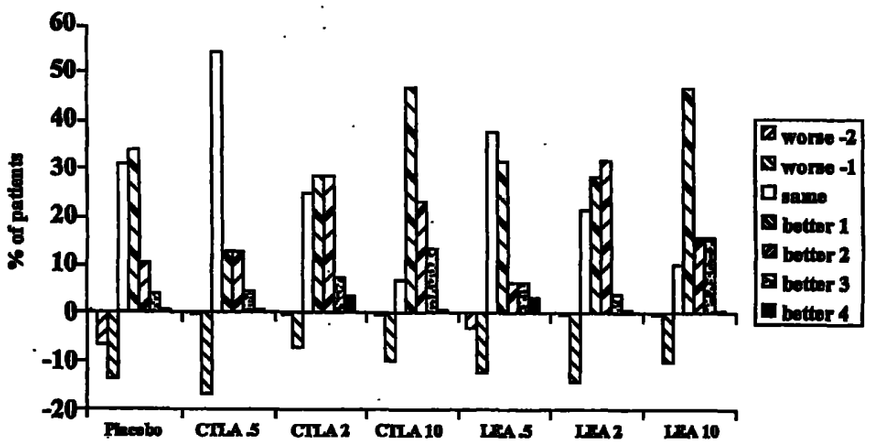


FIG. 5B

WO 2005/016266
13/108
PCT/US2004/024040

Physician Global Disease Changes

(Likert scale unit changes)

score changes from baseline

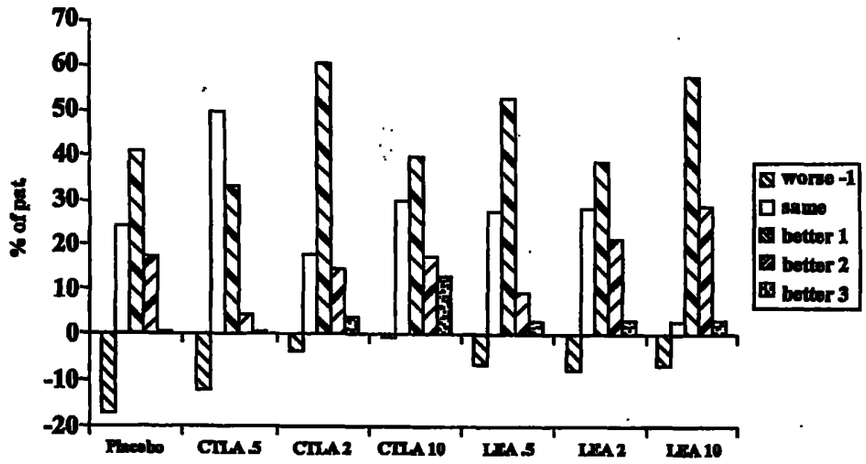


FIG. 5C

WO 2005/016265 PCT/US2004/024040 14/108

Pain

- Changes from Baseline -

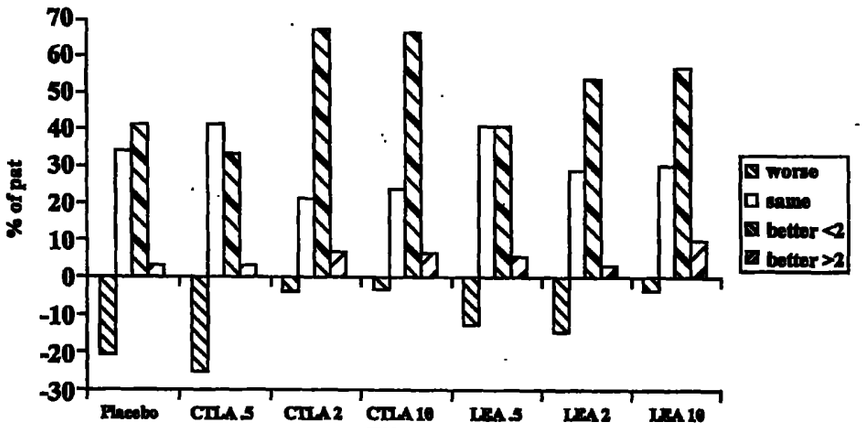


FIG. 5D

Patient Global Assessment

- Disease Activity Change from Baseline -

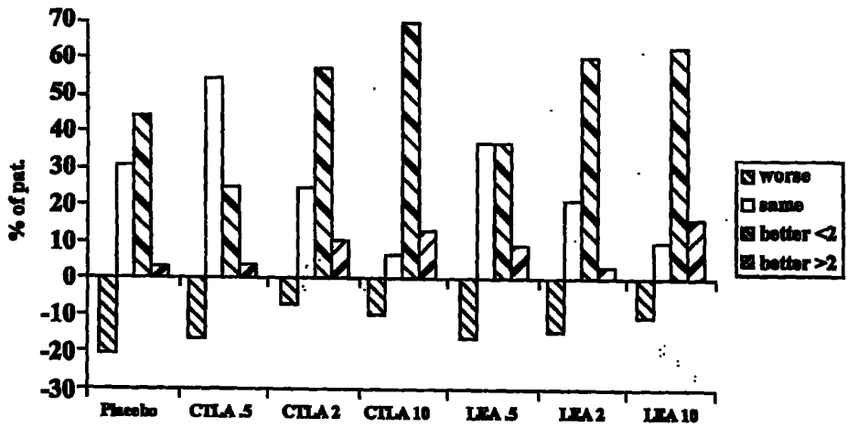


FIG 6A

WO 2005/016266
16/108
PCT/US2004/024040

Physician Global Assessment

-Disease Activity Changes from Baseline -

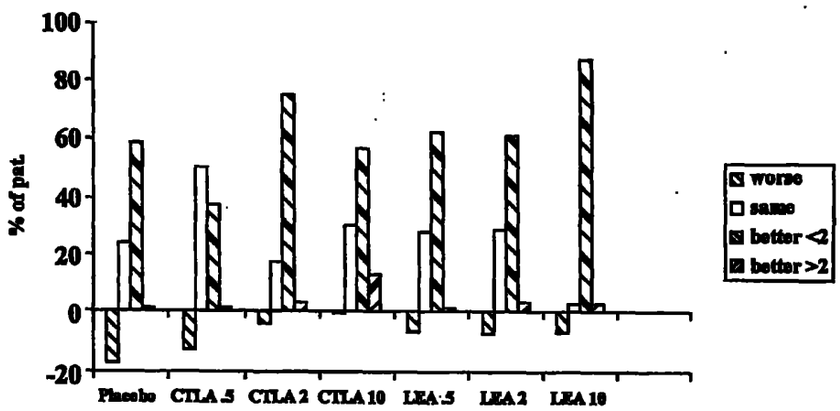


FIG. 6B

WO 2004/016256
17/108
PCT/US2004/024840

200

Percent Reduction in CRP Levels on Day 85 compared to Baseline

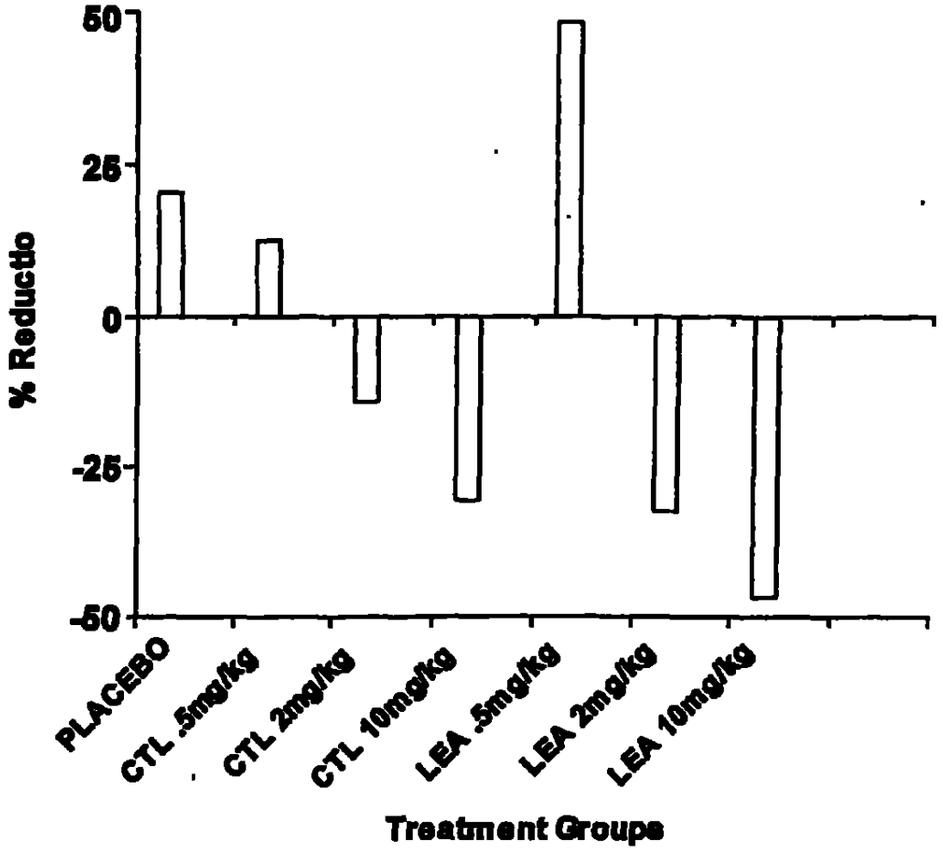


FIG. 7A

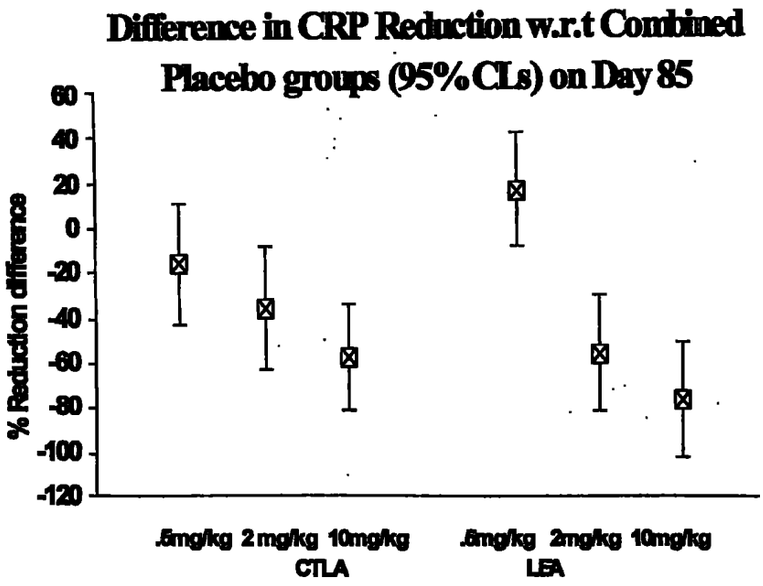


FIG. 7B

WO 2005/016256
19/100
PCT/US2004/024840

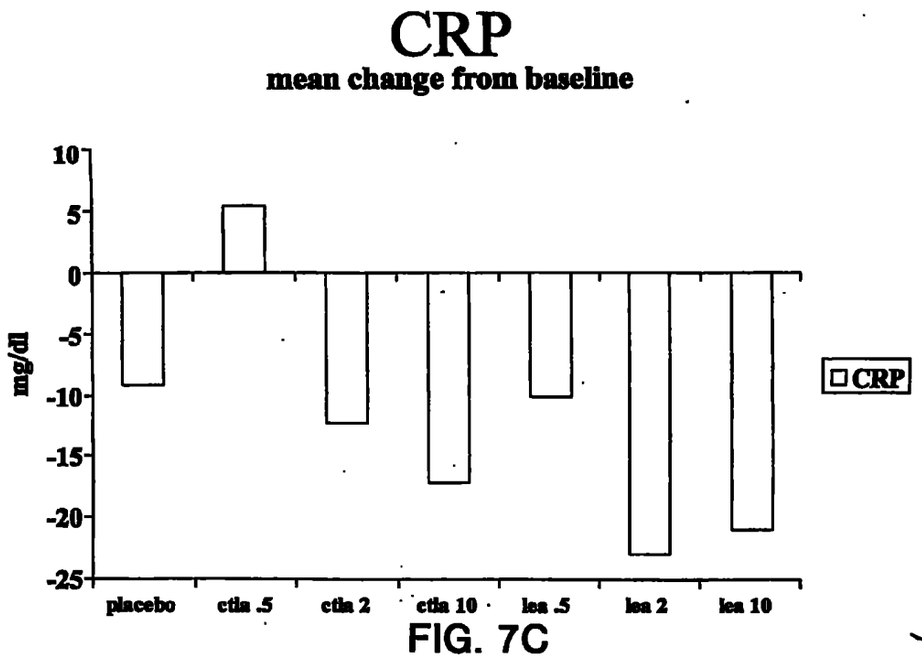

CRP
mean change from baseline
mg/dl
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
placebo
ctla .5
ctla 2
ctla 10
lea .5
lea 2
lea 10
CRP

FIG. 7C

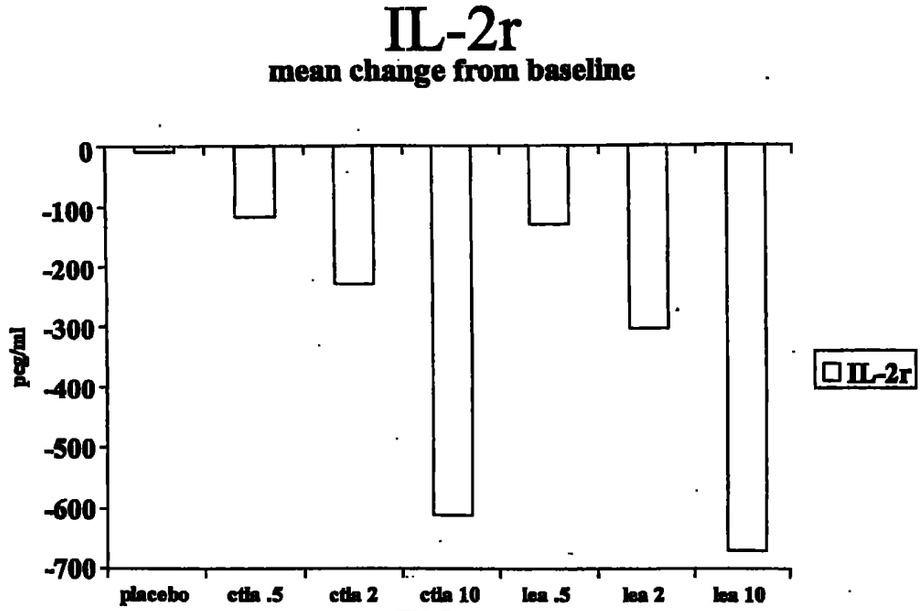

IL-2r
mean change from baseline
0
-100
-200
-300
-400
-500
-600
-700
pcg/ml
placebo
ctla .5
ctla 2
ctla 10
lea .5
lea 2
lea 10
IL-2r

FIG. 8

CTLA tender joints

- median difference from baseline -

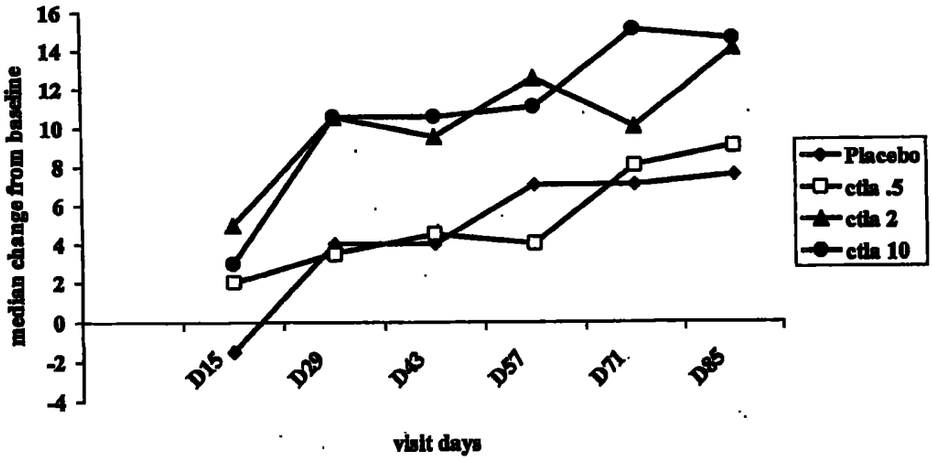


FIG. 9A

CTLA tender joints

- mean difference from baseline -

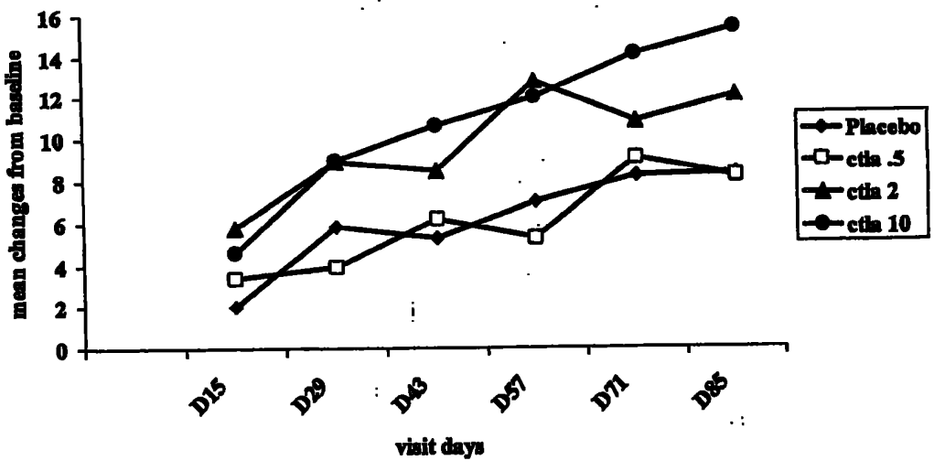


FIG. 9B

CTLA swollen joints

- median difference from baseline -

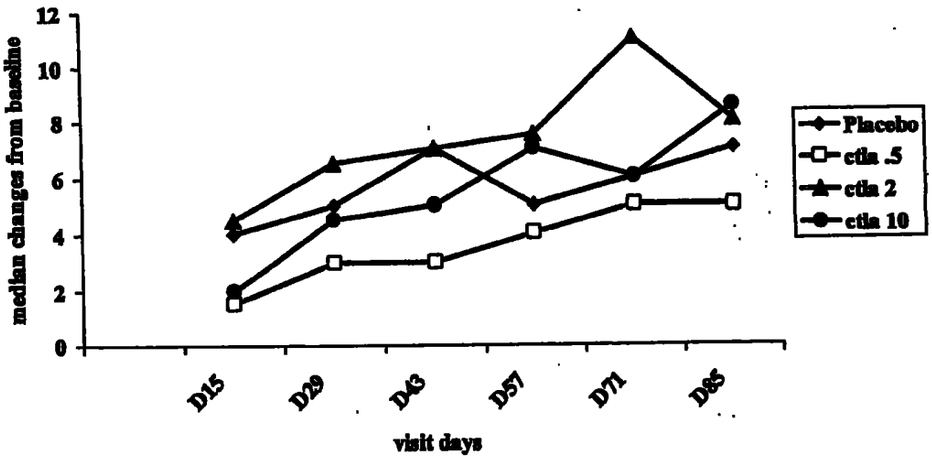


FIG. 10A

CTLA swollen joints

- mean difference from baseline -

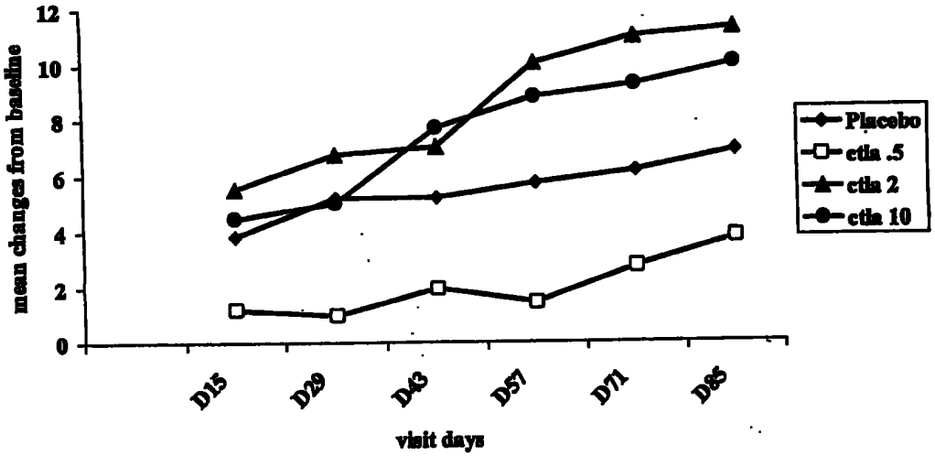


FIG. 10B

CTLA Pain Assessment

- mean difference from baseline -

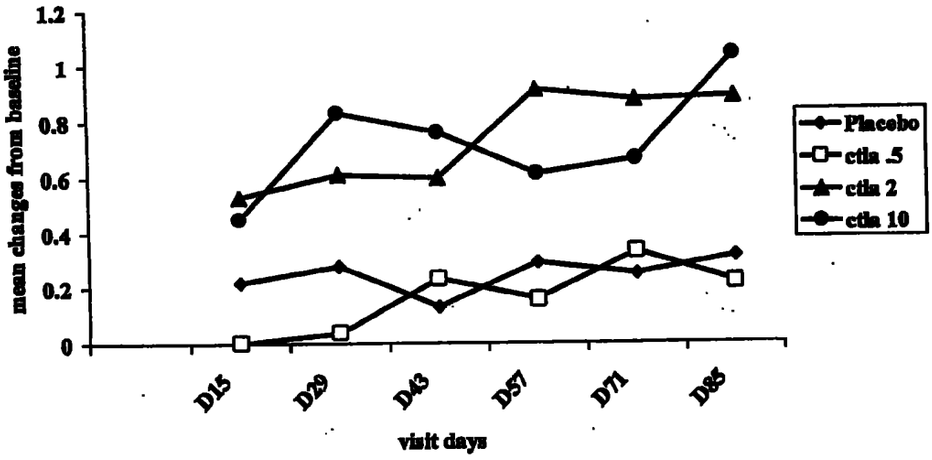


FIG. 11

CTLA
Patient Assessment Disease Activity
- mean difference from baseline -

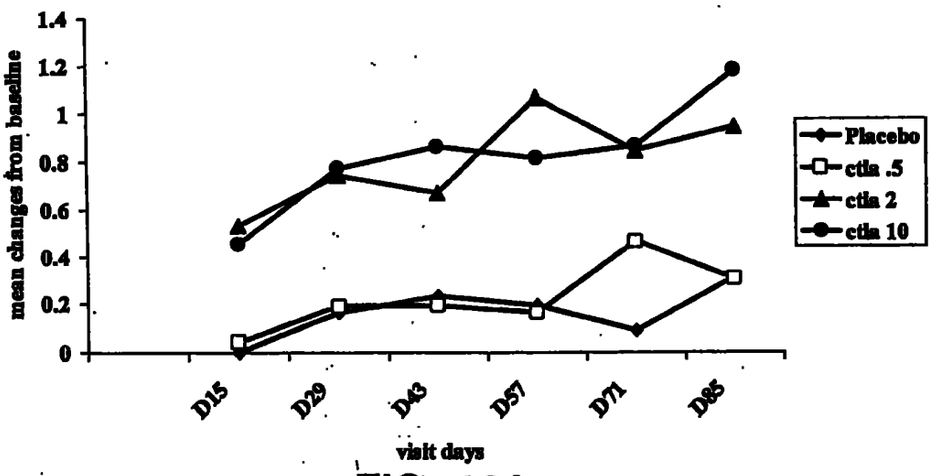


FIG. 12A

CTLA

Physician Assessment Disease Activity

- mean difference from baseline -

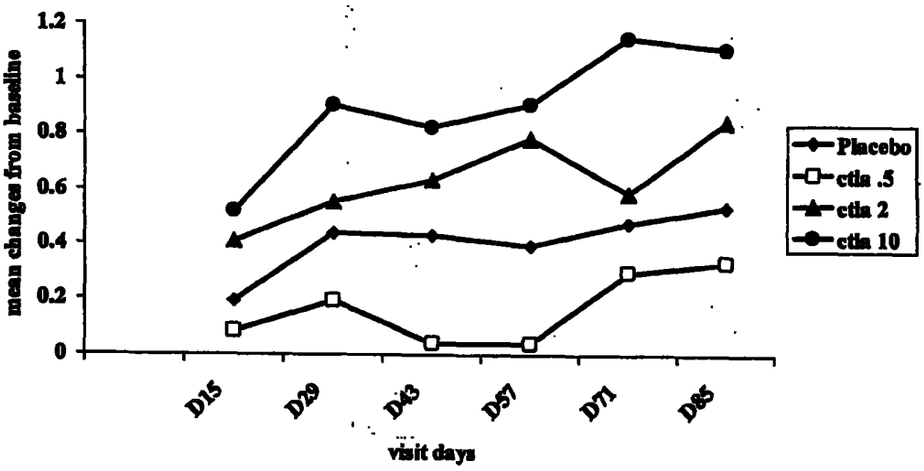


FIG. 12B

LEA tender joints

- median difference from baseline -

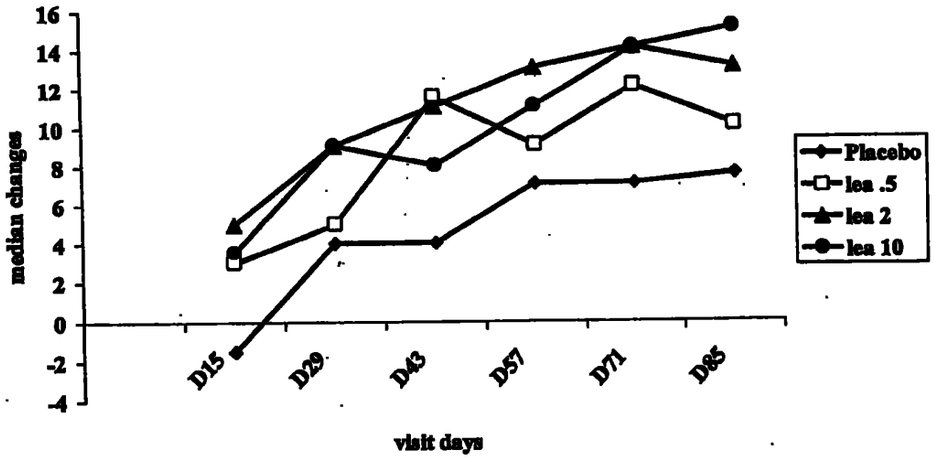


FIG. 13A

LEA tender joints

- mean change from baseline -

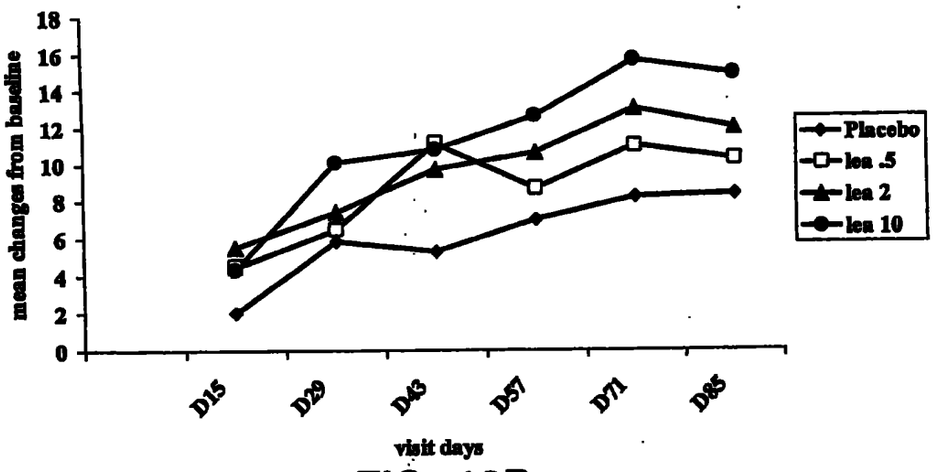


FIG. 13B

LEA swollen joints

- median difference from baseline -

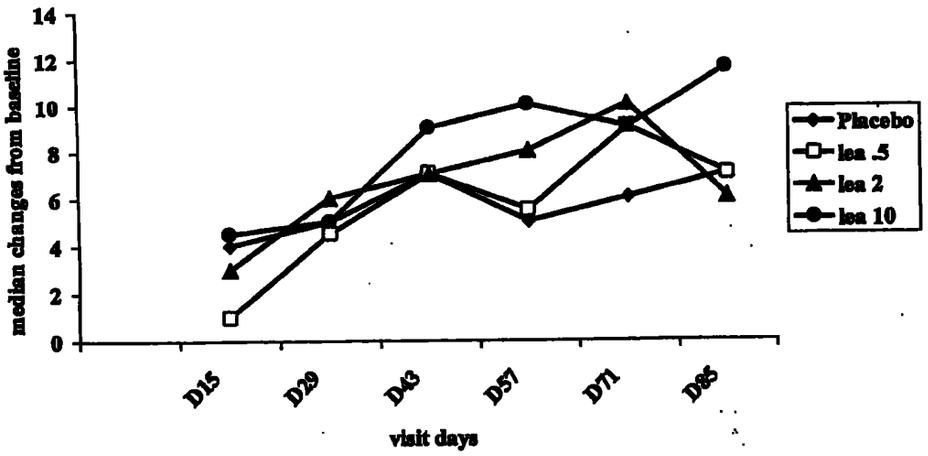


FIG. 14A

LEA swollen joints

- mean change from baseline -

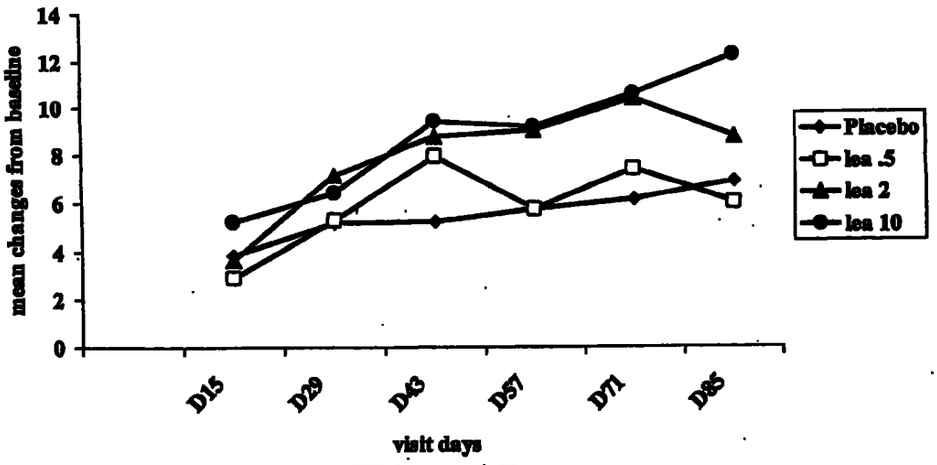


FIG. 14B

LEA Pain Assessment

- mean change from baseline -

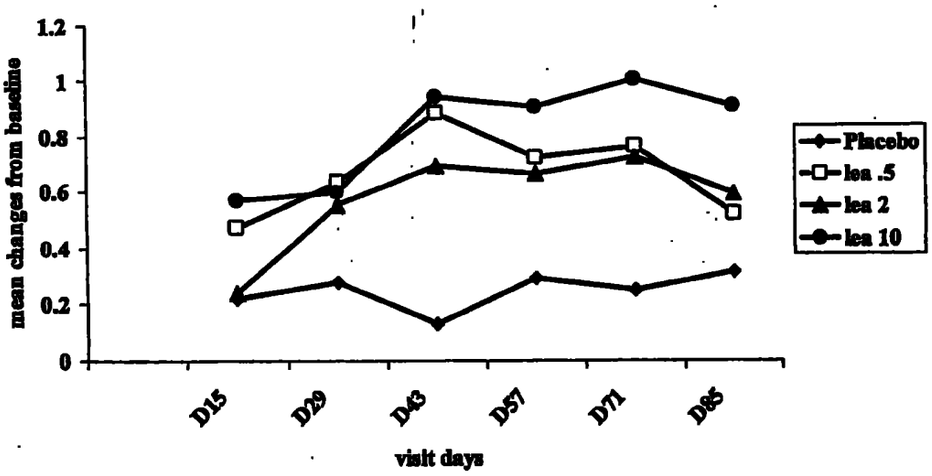


FIG. 15

LEA

Patient Assessment Disease Activity

- mean difference from baseline -

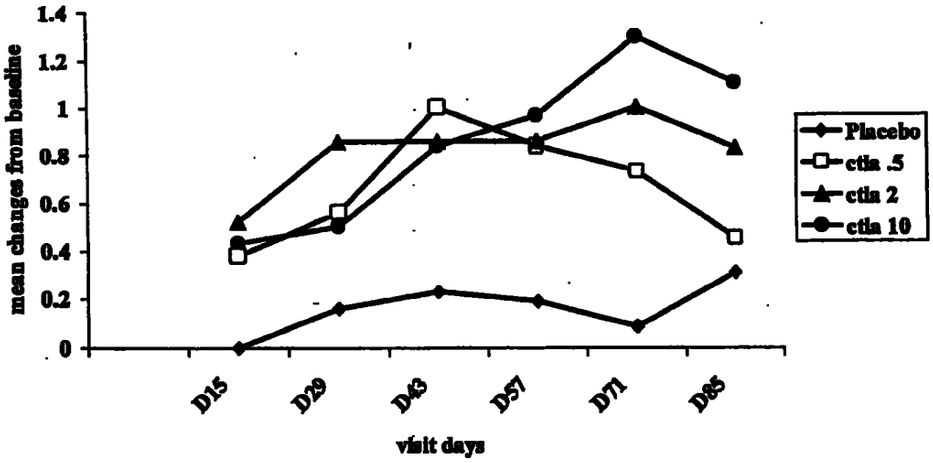


FIG. 16A

LEA

Physician Assessment Disease Activity

- mean difference from baseline -

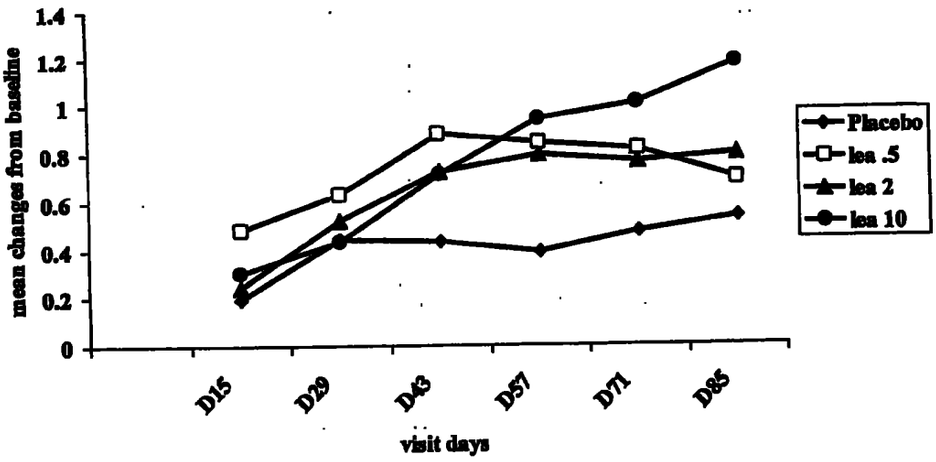


FIG. 16B

218

Percent Improvement in HAQ Levels on Day 85 compared to Baseline

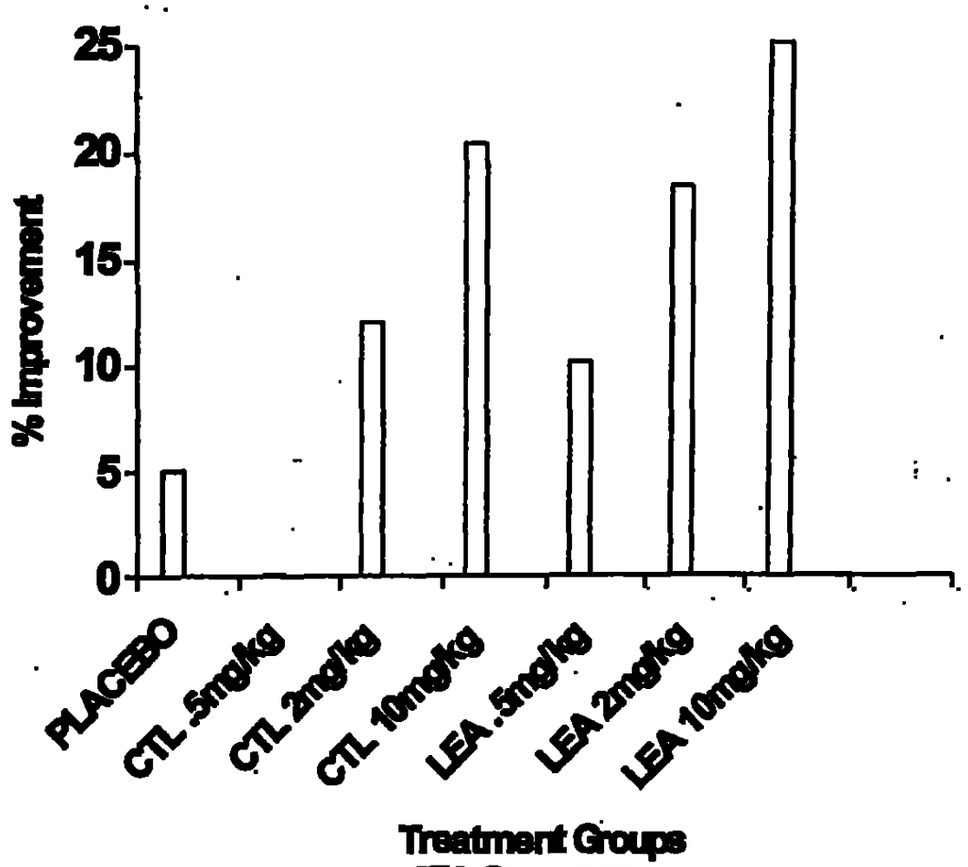


FIG. 17

219

```
ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA      -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--      -7

AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA      +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--      +14
                  +1

GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG      +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--      +34

ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG      +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--      +54

GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA      +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--      +74

GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG      +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--      +94

GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA      +342
E--L--M--Y--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--      +114

ATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC      +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--      +134

ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC      +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--      +154

CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG      +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--      +174

GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG      +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--      +194

CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC      +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--      +214

GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC      +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--      +234

AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA      +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--      +254

GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC      +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--      +274

CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT      +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--      +294

GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC      +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--      +314

TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA      +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--      +334

TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT      +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--      +354

CCGGGTAAATGA
P--G--K--*
```

FIG. 18

220

214

```
ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA      -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--      -7

AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA      +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--      +14
                +1

GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG      +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V--      +34

ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG      +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--      +54

GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA      +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--      +74

GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG      +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--      +94

GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA      +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--      +114

ATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC      +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--      +134

ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC      +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--      +154

CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG      +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--      +174

GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG      +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--      +194

CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC      +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--      +214

GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC      +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--      +234

AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA      +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--      +254

GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC      +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--      +274

CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT      +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--      +294

GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC      +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--      +314

TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA      +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--      +334

TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT      +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--      +354

CCGGGTAAATGA
P--G--K--*
```

FIG. 19

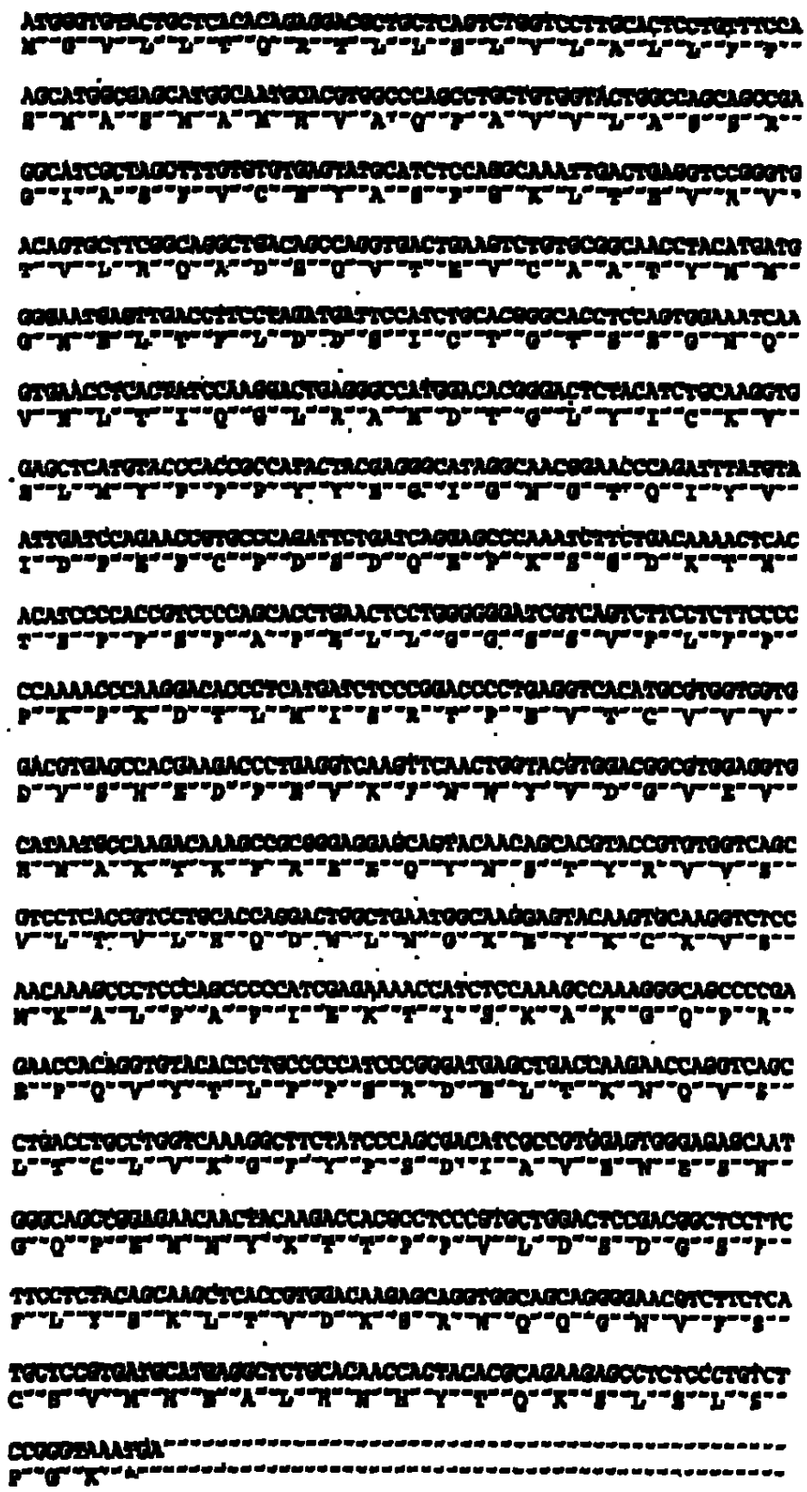


FIG. 20

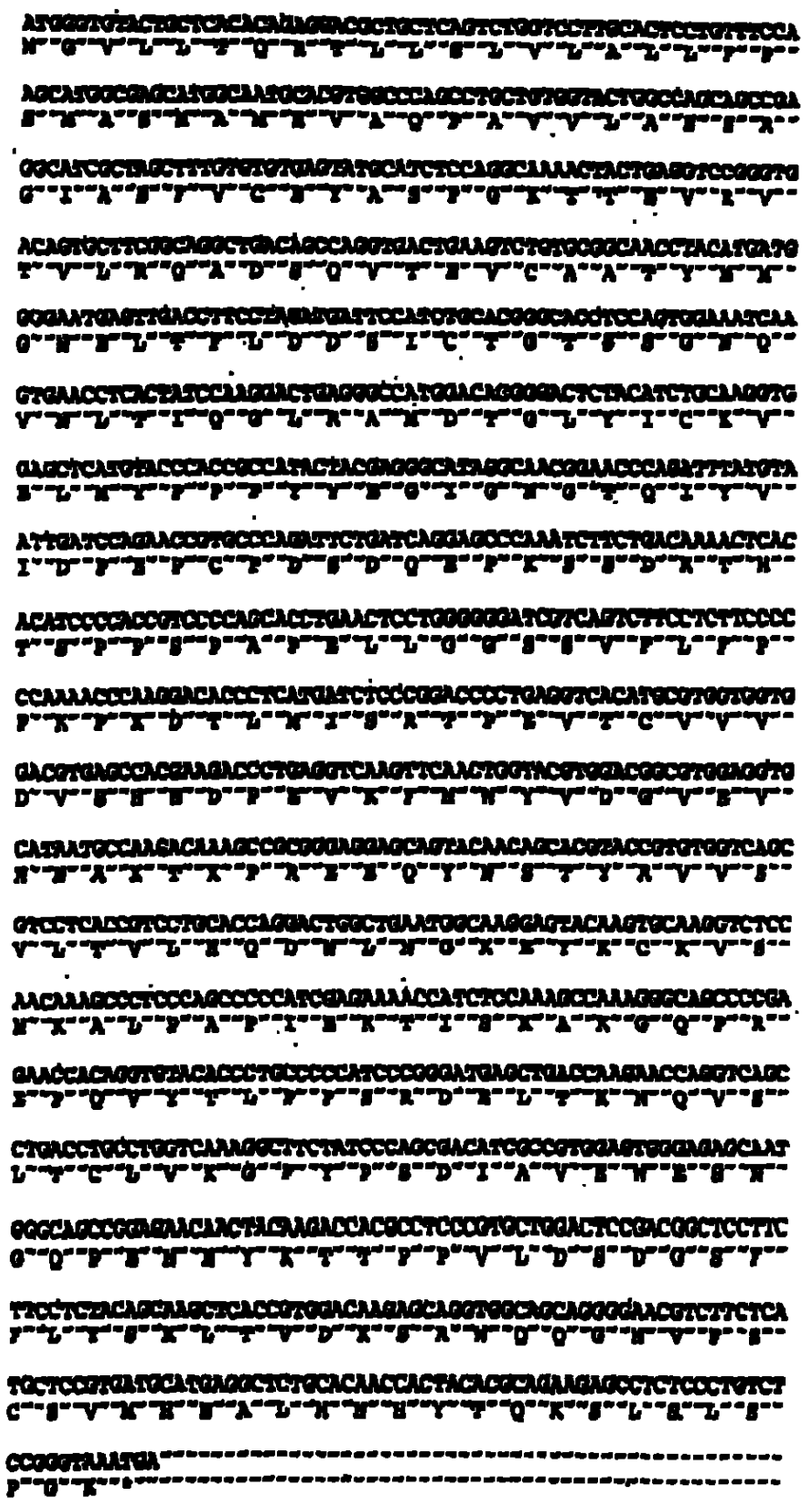


FIG. 21

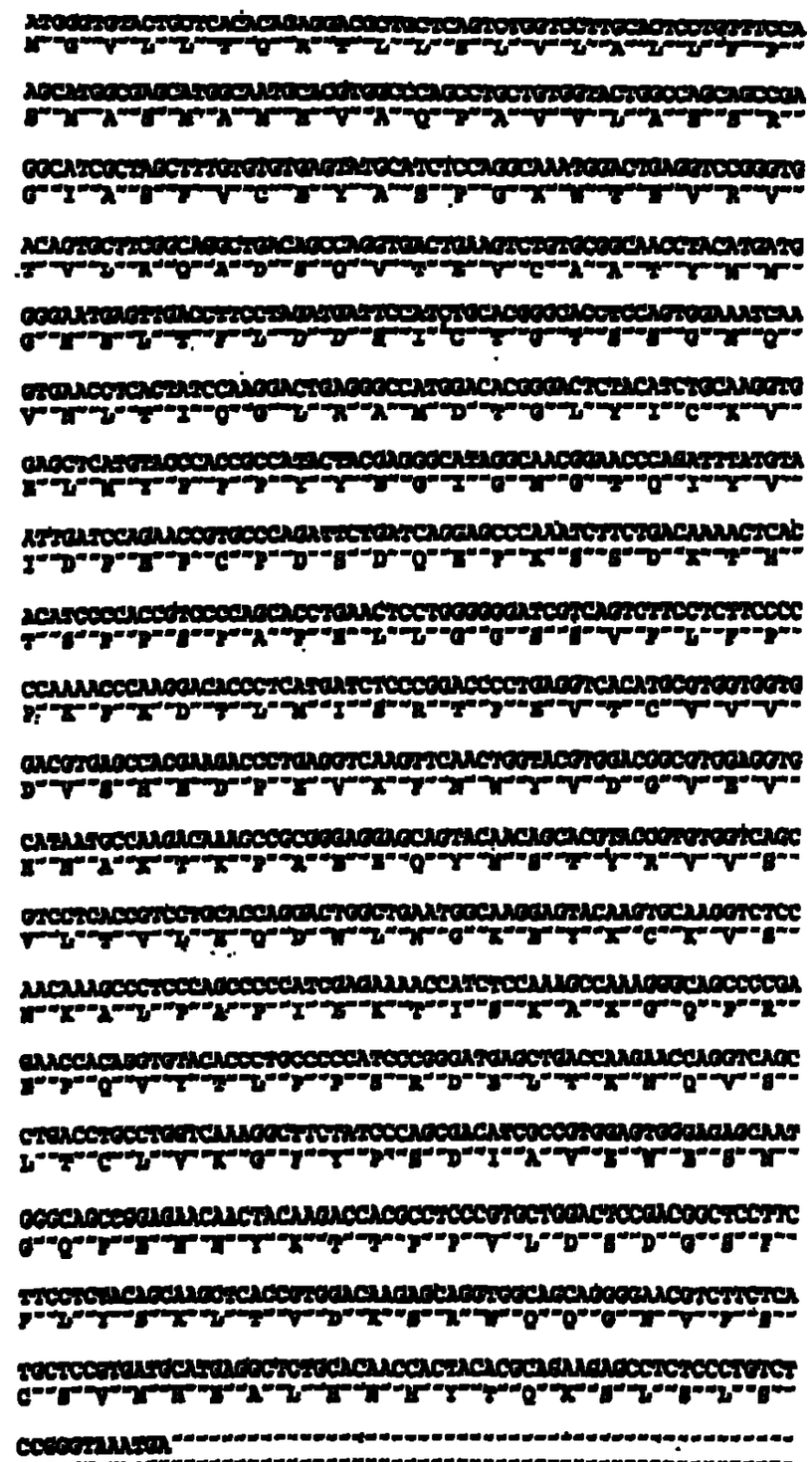


FIG. 22

224

ONCOSTATIN M SIGNAL PEPTIDE

```
M  G  V  L  L  T  Q  R  T  L  L  S  L  V  L
ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG CTC AGT CTG GTC CTT   45

                    -1 +1
A  L  L  F  P  S  M  A  S  M  A  M  R  V  A
GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG AGC ATG GCA ATG CGC GTG GCC   90

Q  P  A  V  V  L  A  S  S  R  G  I  A  S  F
CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCG AGC TTT  135

V  C  E  Y  A  S  P  G  K  A  T  E  V  R  V
GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG  180

T  V  L  R  Q  A  D  S  Q  V  T  E  V  C  A
ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG  225

A  T  Y  M  M  G  N  E  L  T  F  L  D  D  S
GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC  270

I  C  T  G  T  S  S  G  N  Q  V  N  L  T  I
ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG AAC CTC ACT ATC  315

Q  G  L  R  A  M  D  T  G  L  Y  I  C  K  V
CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTC TAC ATC TGC AAG GTG  360

                                    GLYCOSYLATION SITE
E  L  M  Y  P  P  P  Y  Y  L  G  I  G  N  G
GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA  405

T  Q  I  Y  V  I  D  P  E  P  C  P  D  S  D
ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC  450

F  L  L  W  I  L  A  A  V  S  S  G  L  F  F
TTC CTC CTG TGG ATC CTT GCA GCA GTT AGT TCG GGG TTG TTT TTT  495

Y  S  F  L  L  T  A  V  S  L  S  K  M  L  K
TAT AGC TTT CTC CTG ACA GCT GTT TCT TTG AGC AAA ATG CTA AAG  540

K  R  S  P  L  T  T  G  V  Y  V  K  M  P  P
AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT GTG AAA ATG CCC CCA  585

T  E  P  E  C  E  K  Q  F  Q  P  Y  F  I  P
ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCG  630

I  N
ATC AAT                                                     636
```

FIG. 23

225

```
ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA      -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--      -7

AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA      +42
S--M--A--S--M--A--M--E--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--      +14
                +1

GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG      +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--      +34

ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG      +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--      +54

GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA      +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--      +74

GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG      +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--      +94

GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA      +342
E--L--M--Y--P--P--Y--Y--L--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--      +114

ATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC      +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--      +134

ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGTGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC      +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--      +154

CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG      +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--      +174

GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG      +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--      +194

CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC      +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--      +214

GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC      +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--      +234

AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA      +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--      +254

GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC      +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--      +274

CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT      +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--      +294

GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC      +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--      +314

TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA      +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--      +334

TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT      +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--      +354

CCGGGTAAATGA
P--G--K--*
```

FIG. 24

227



FIG. 26

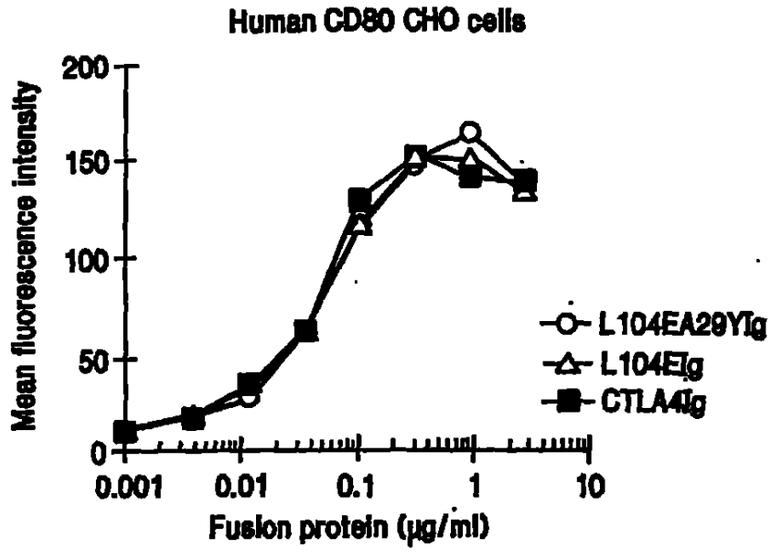


FIG. 27A

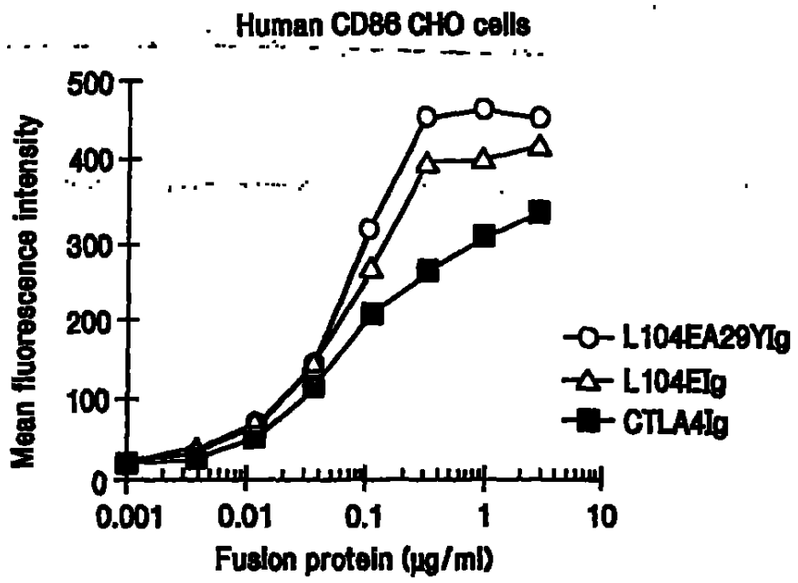


FIG. 27B

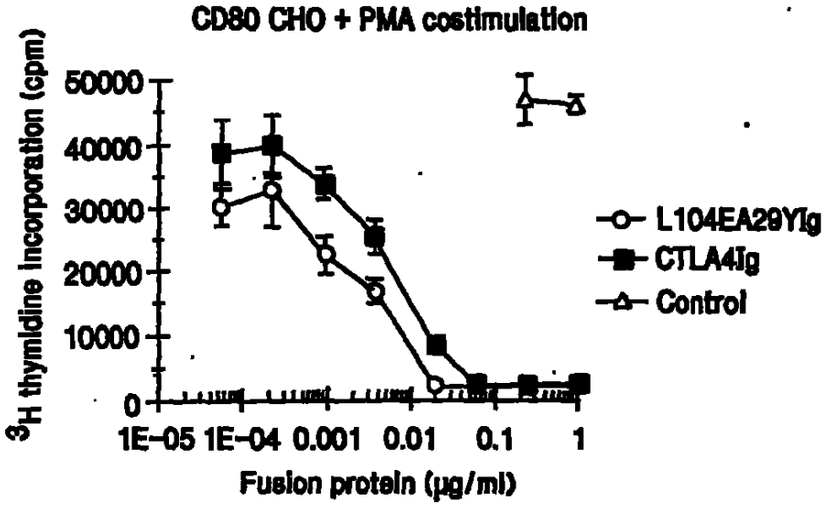


FIG. 28A

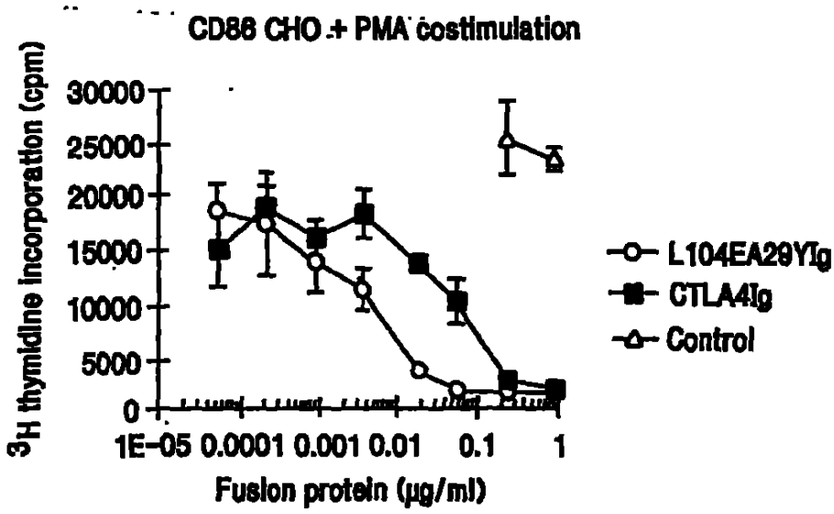


FIG. 28B

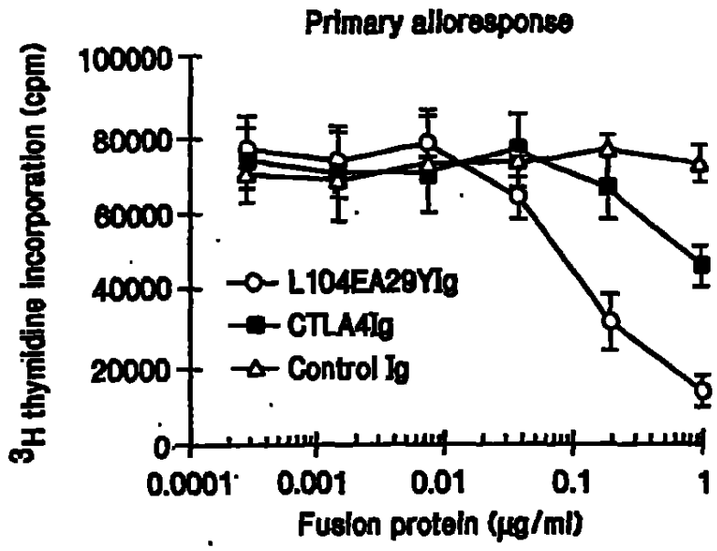


FIG. 29A

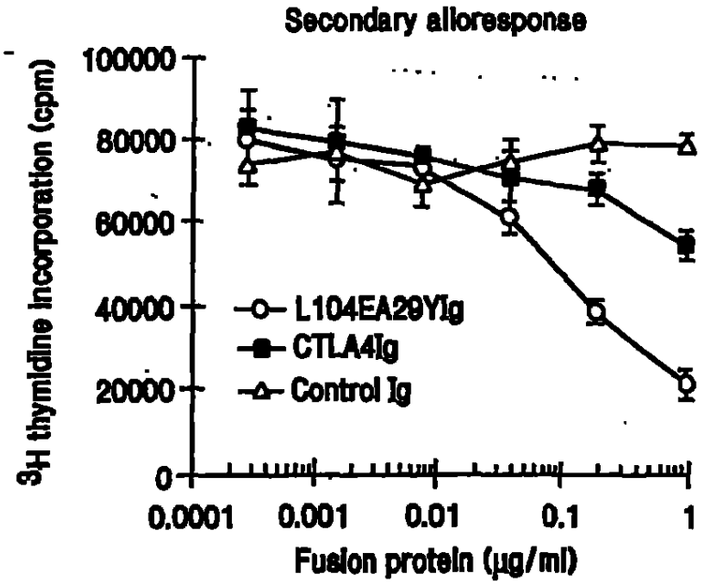


FIG. 29B

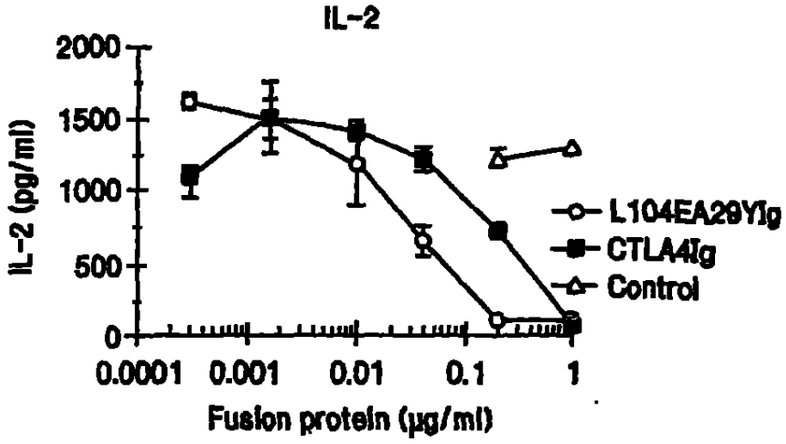


FIG. 30A

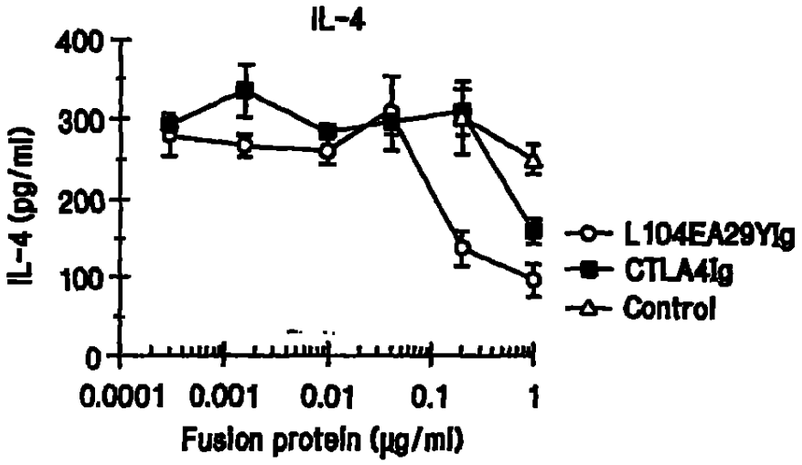


FIG. 30B

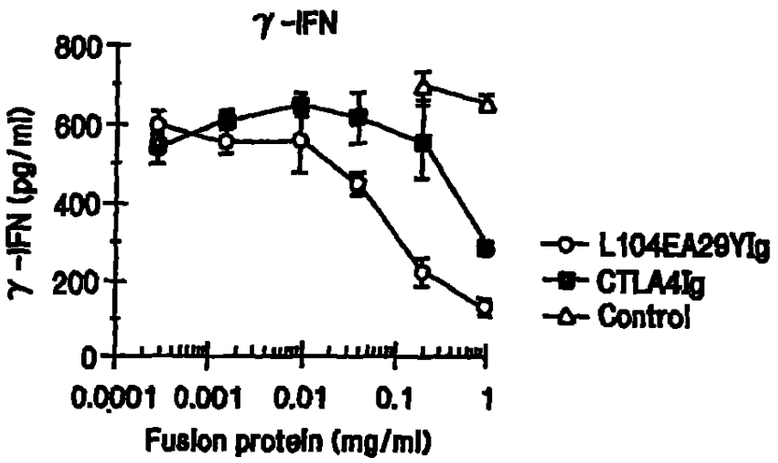


FIG. 30C

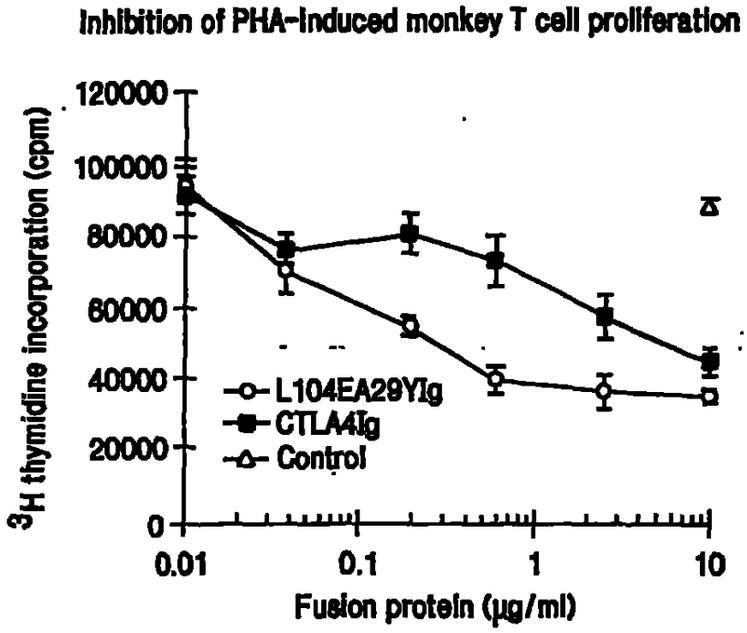

Inhibition of PHA-induced monkey T cell proliferation
^{3}H thymidine incorporation (cpm)
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
L104EA29YIg
CTLA4Ig
Control
0.01
0.1
1
10
Fusion protein (µg/ml)

FIG. 31

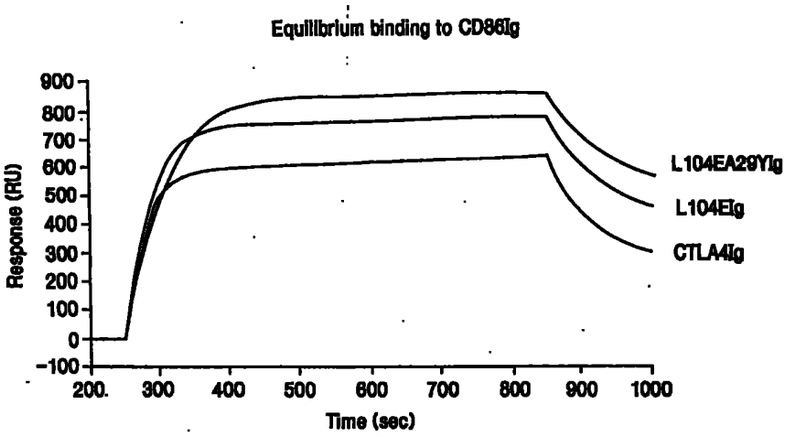

Equilibrium binding to CD86Ig
Response (RU)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
Time (sec)
L104EA29YIg
L104EIg
CTLA4Ig

FIG. 32

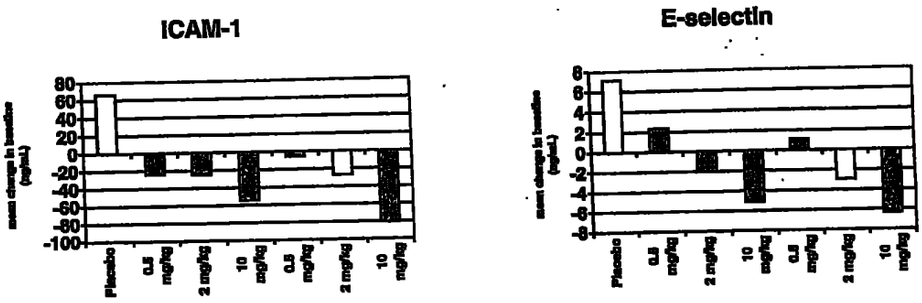

ICAM-1
E-selectin
Placebo
0.5 mg/kg
2 mg/kg
10 mg/kg
0.5 mg/kg
2 mg/kg
10 mg/kg

Figure 33

Figure 34. Summary of ACR20 Response by Visit Day CTLA4Ig

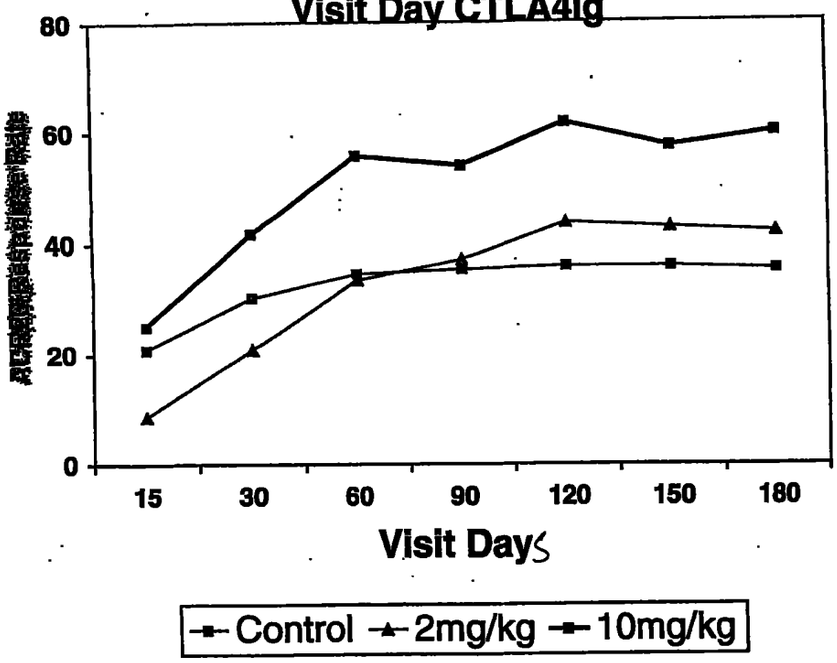


Figure 35: Summary of ACR50 Response by Visit Day CTLA4Ig

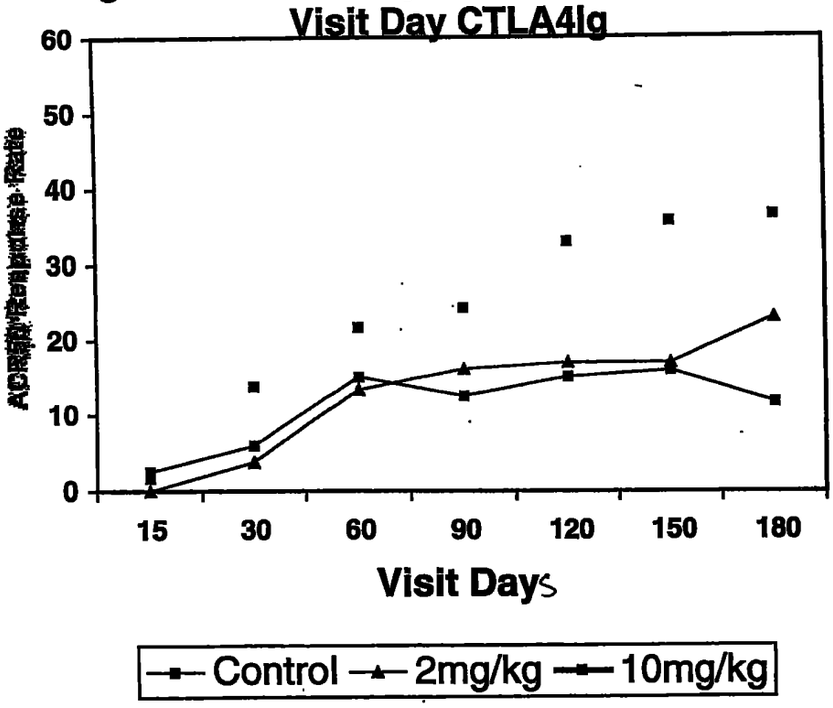


Figure 36: Summary of ACR70 Response by Visit Day CTLA4Ig

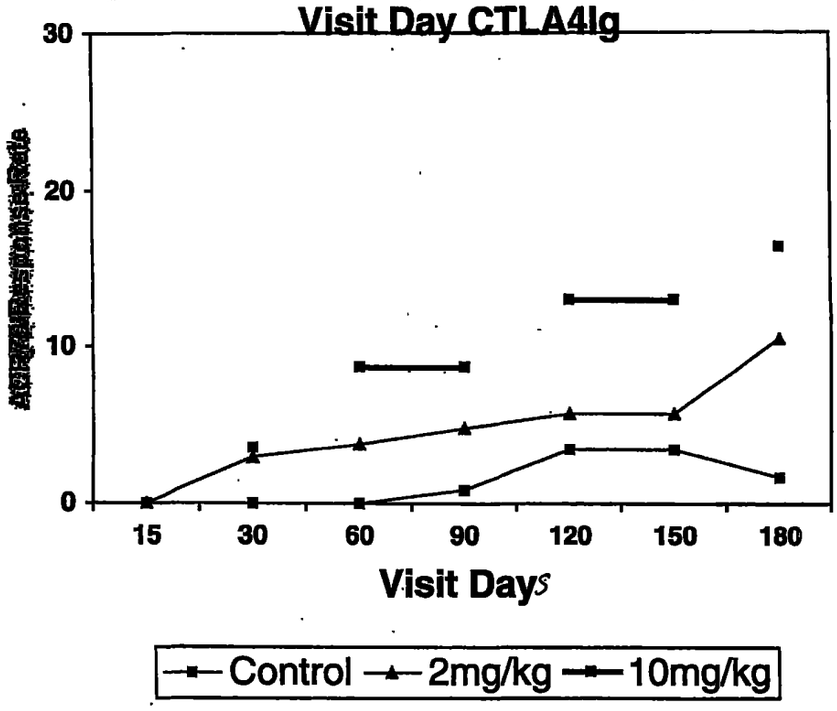
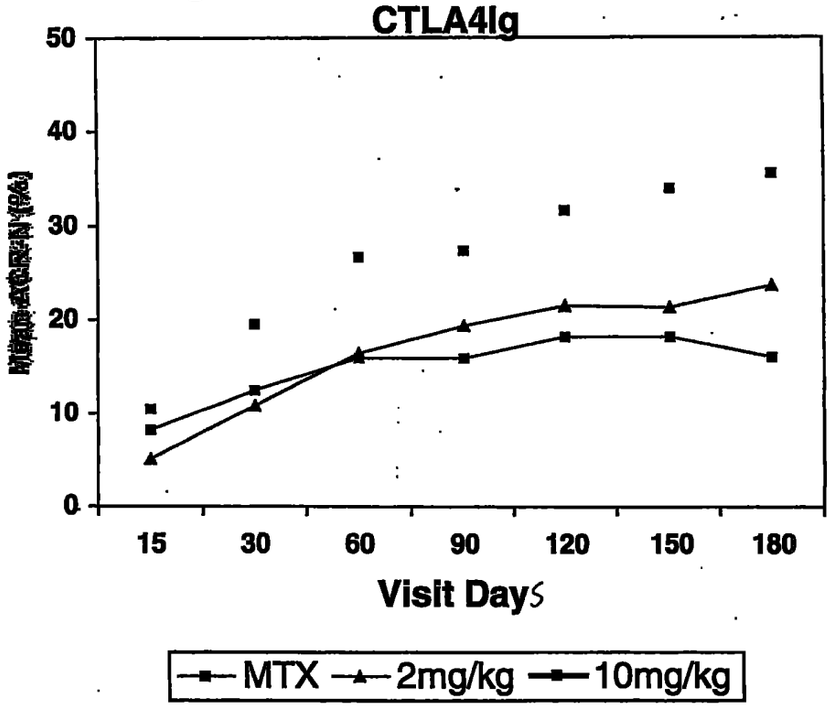


Figure 37: Mean ACR-N over Time CTLA4Ig



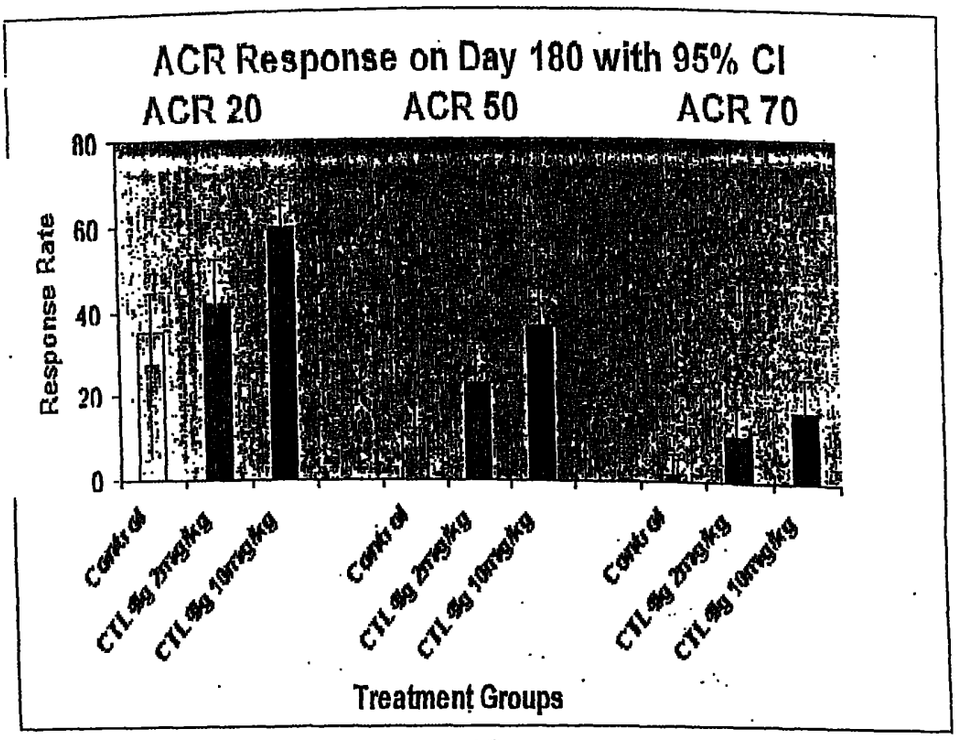

ACR Response on Day 180 with 95% CI
ACR 20
ACR 50
ACR 70
Response Rate
80
60
40
20
0
Control
CTL4g 2mg/kg
CTL4g 10mg/kg
Control
CTL4g 2mg/kg
CTL4g 10mg/kg
Control
CTL4g 2mg/kg
CTL4g 10mg/kg
Treatment Groups

Fig 38

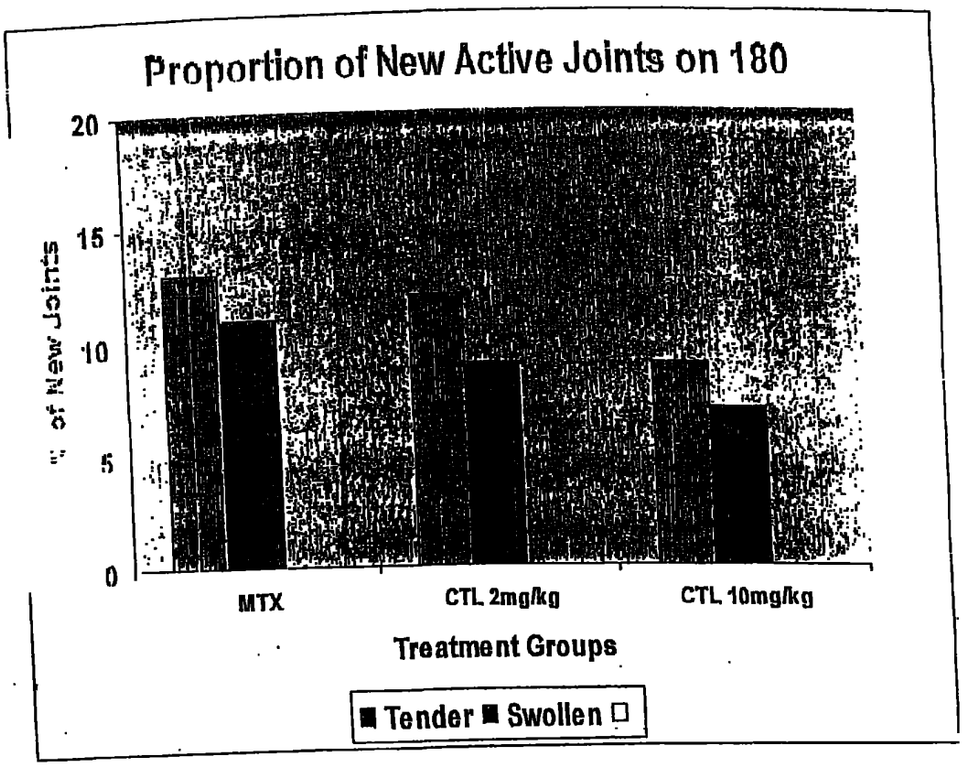
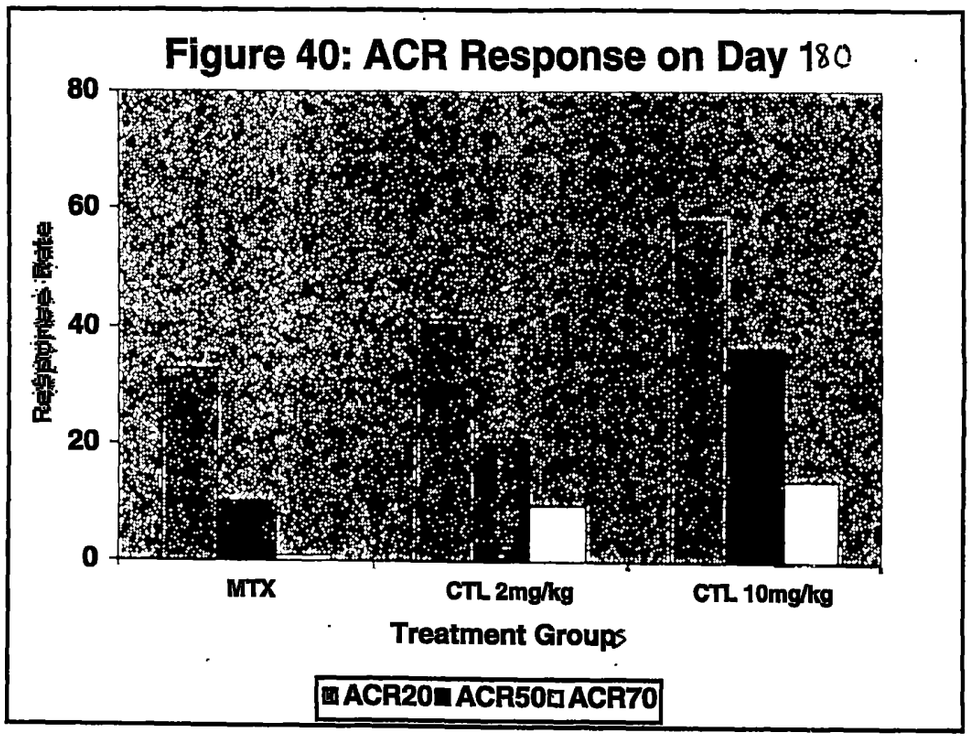
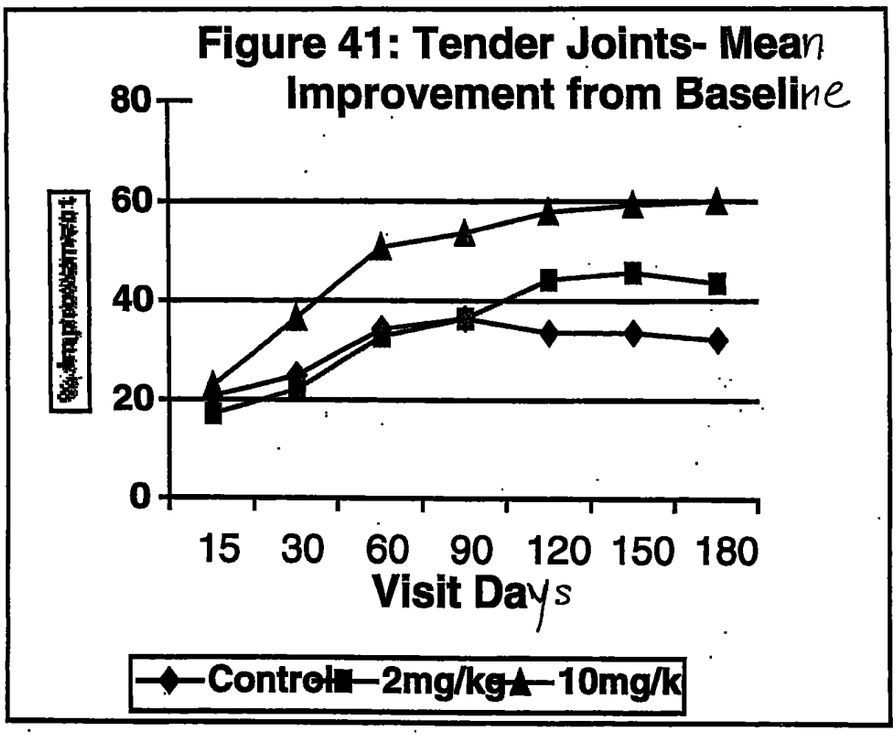
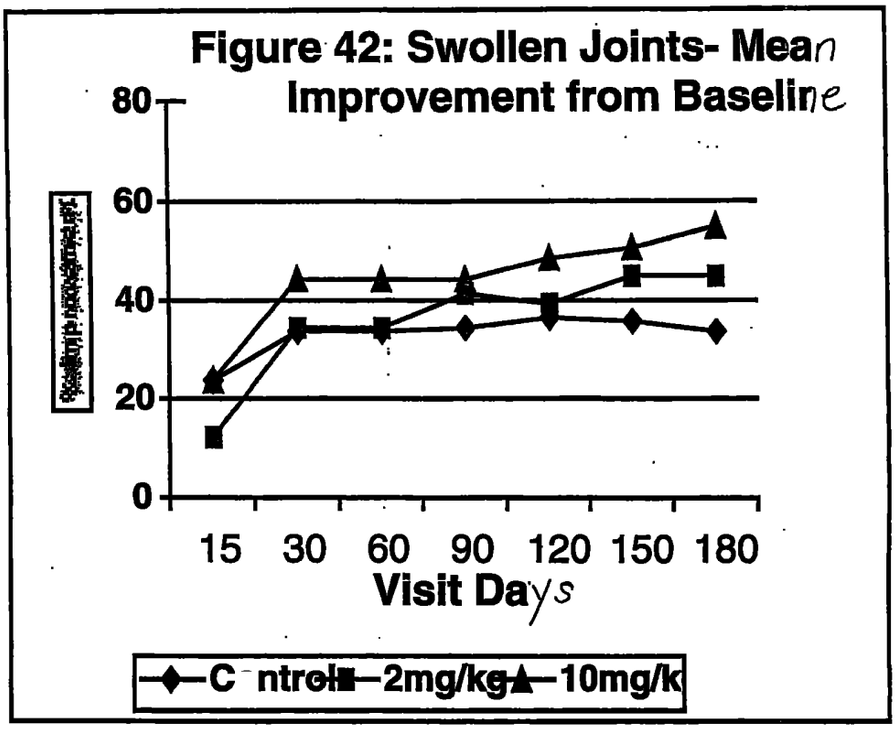
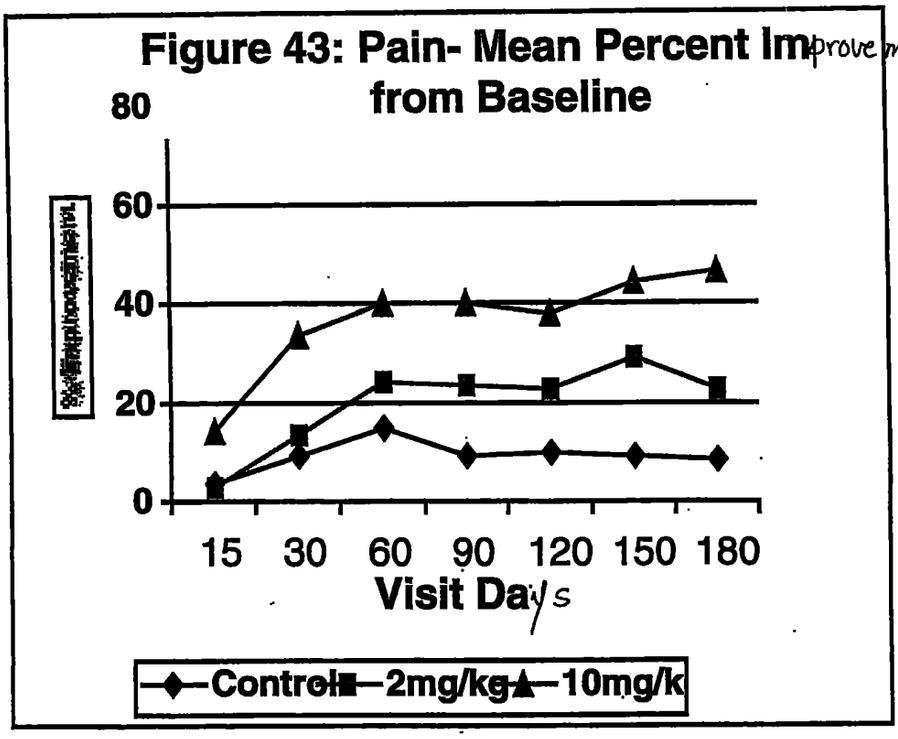

Proportion of New Active Joints on 180
20
15
10
5
0
MTX
CTL 2mg/kg
CTL 10mg/kg
Treatment Groups
Tender
Swollen

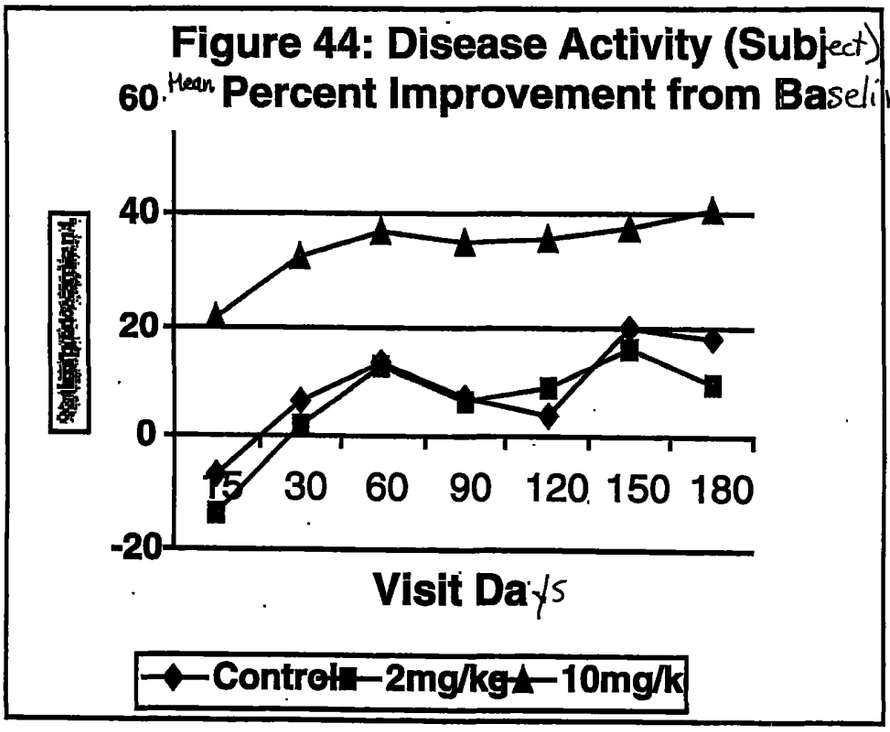
Fig 39

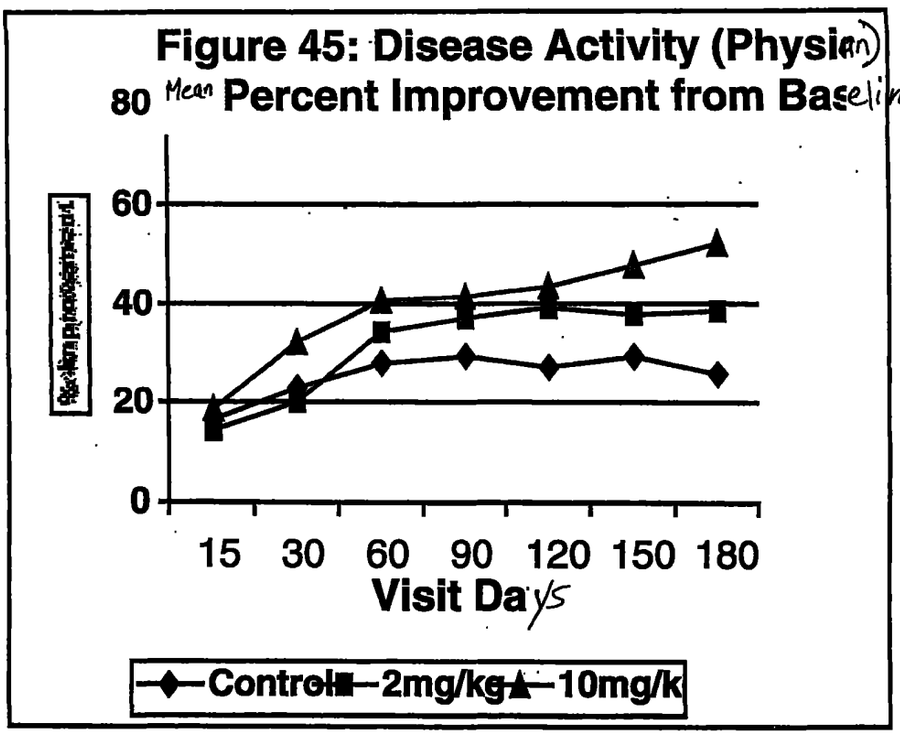

Figure 40: ACR Response on Day 180
80
60
40
20
0
MTX
CTL 2mg/kg
CTL 10mg/kg
Treatment Groups
ACR20
ACR50
ACR70

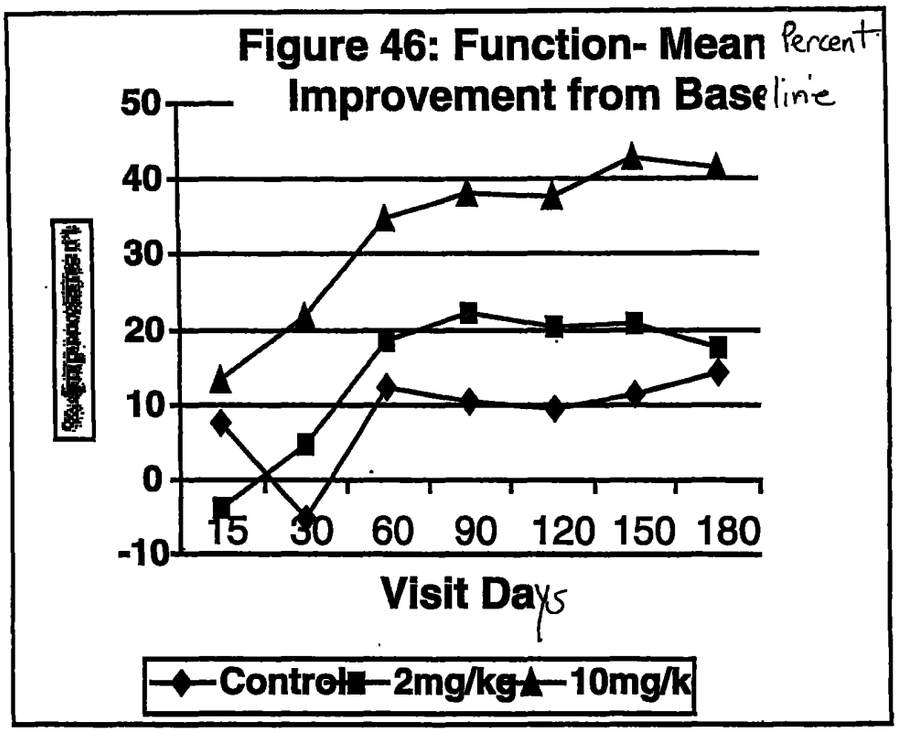

Figure 41: Tender Joints- Mean Improvement from Baseline
80
60
40
20
0
15 30 60 90 120 150 180
Visit Days
Control
2mg/kg
10mg/k

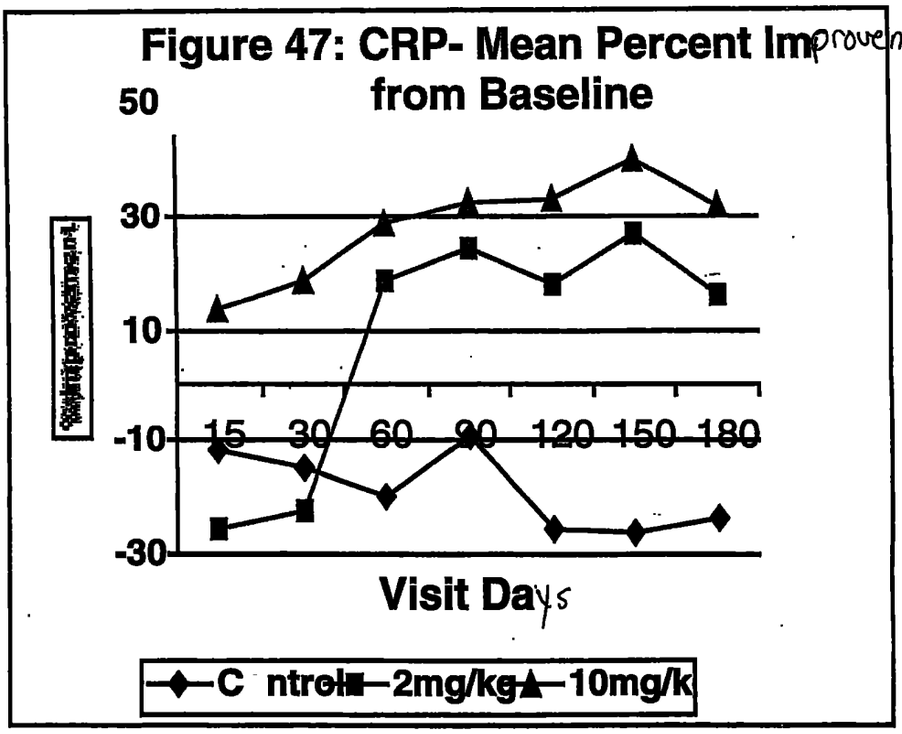

Figure 42: Swollen Joints- Mean Improvement from Baseline
80
60
40
20
0
15 30 60 90 120 150 180
Visit Days
Control
2mg/kg
10mg/k


Figure 43: Pain- Mean Percent Improvement from Baseline
80
60
40
20
0
15 30 60 90 120 150 180
Visit Days
Control
2mg/kg
10mg/k


Figure 44: Disease Activity (Subject)
Mean Percent Improvement from Baseline
60
40
20
0
-20
15
30
60
90
120
150
180
Visit Days
Control
2mg/kg
10mg/k


Figure 45: Disease Activity (Physician)
Mean Percent Improvement from Baseline
80
60
40
20
0
15 30 60 90 120 150 180
Visit Days
Control
2mg/kg
10mg/k


Figure 46: Function- Mean Percent Improvement from Baseline
50
40
30
20
10
0
-10
15
30
60
90
120
150
180
Visit Days
Control
2mg/kg
10mg/k


Figure 47: CRP- Mean Percent Improvement from Baseline
50
30
10
-10
-30
15
30
60
90
120
150
180
Visit Days
Control
2mg/kg
10mg/k

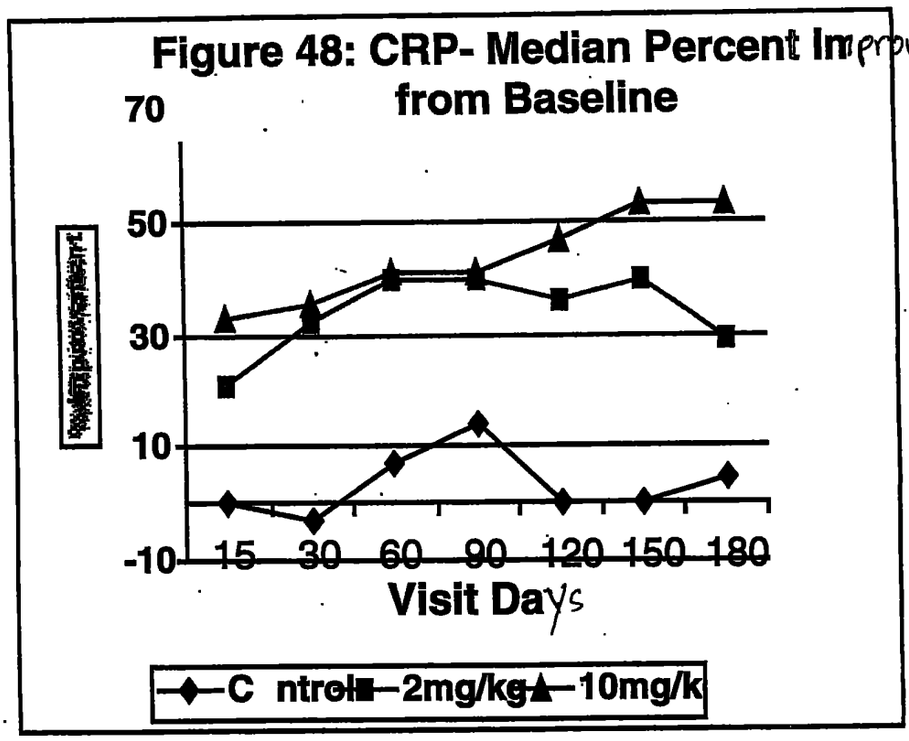

Figure 48: CRP- Median Percent Improvement from Baseline
70
50
30
10
-10
15
30
60
90
120
150
180
Visit Days
Control
2mg/kg
10mg/k

Figure 49: Difference in ACR Response on Day 180 w.r.t MTX only group (95% Confidence

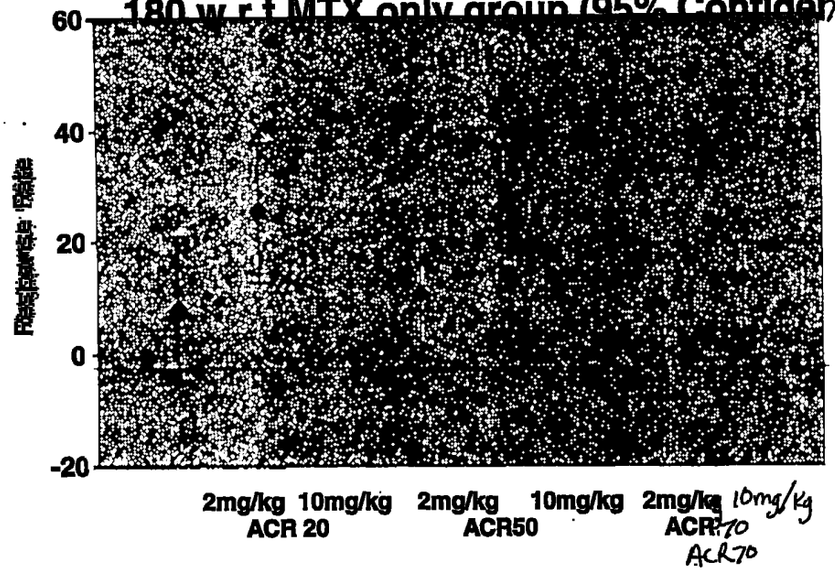


Figure 50: Change from Baseline for SF-36 Physical Health Component on Day 180 w.r.t MTX only group (95% Confidence Limits)

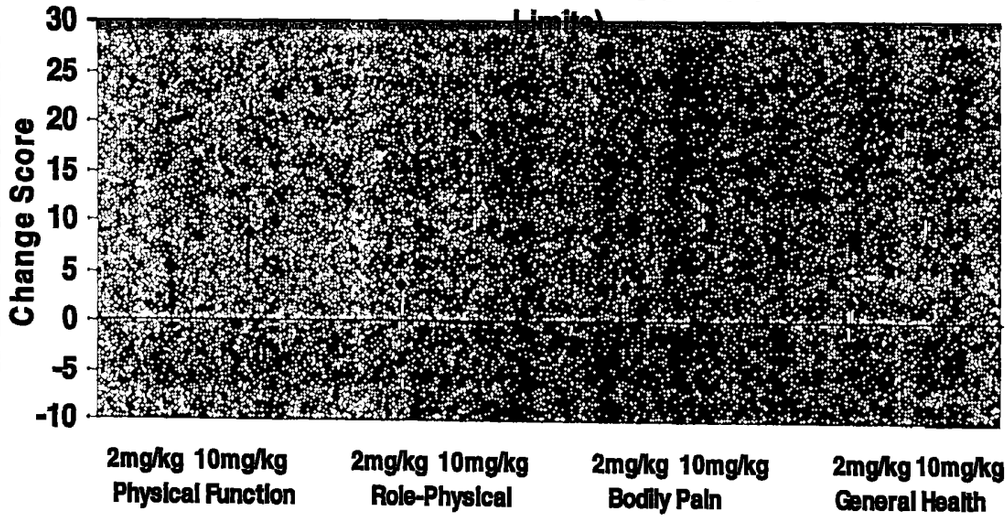


Figure 51: Change from Baseline for SF-36 Mental Health Component on Day 180 w.r.t MTX only group (95% Confidence Limits)

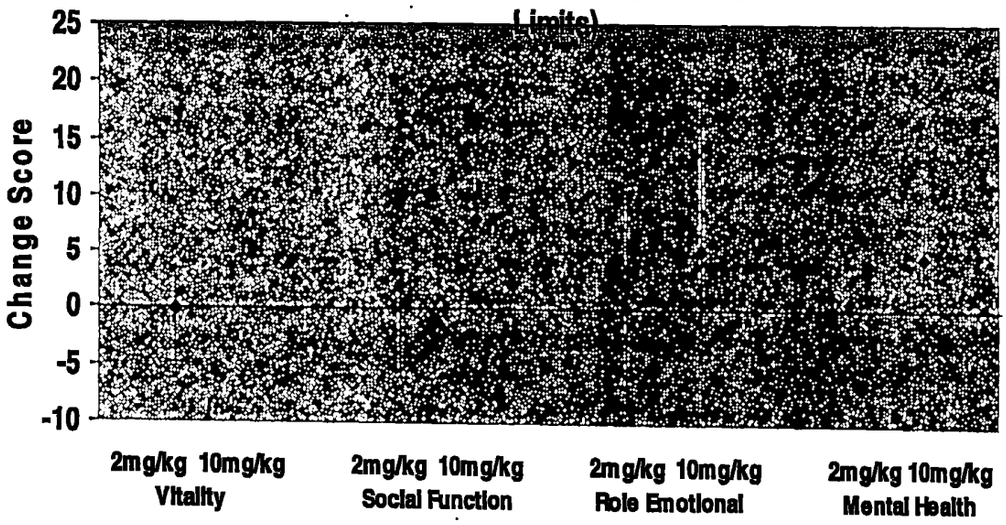


Figure 52: CRP at Day 180

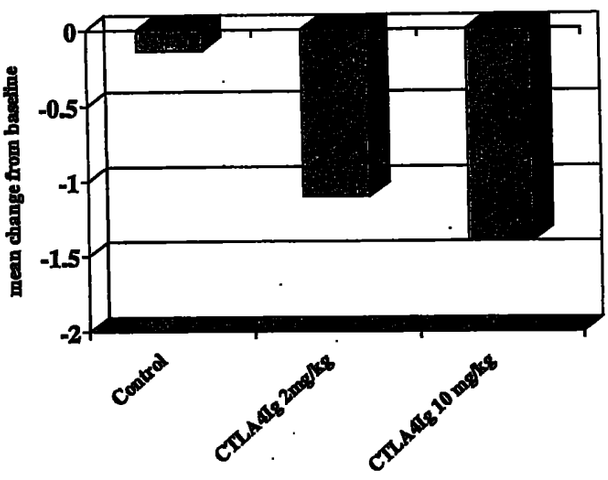


Figure 53: Rheumatoid Factor on Day 180

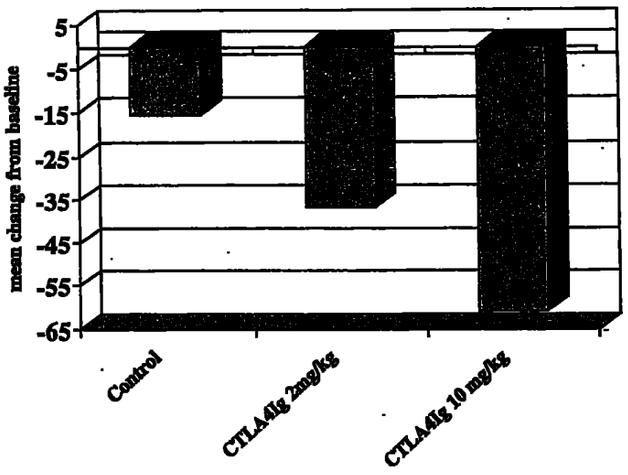


Figure 54: IL-2r on Day 180

Figure 55: IL-6 on Day 180

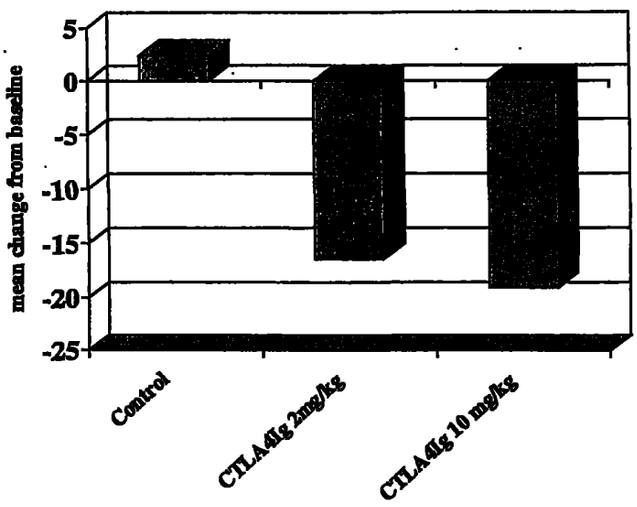
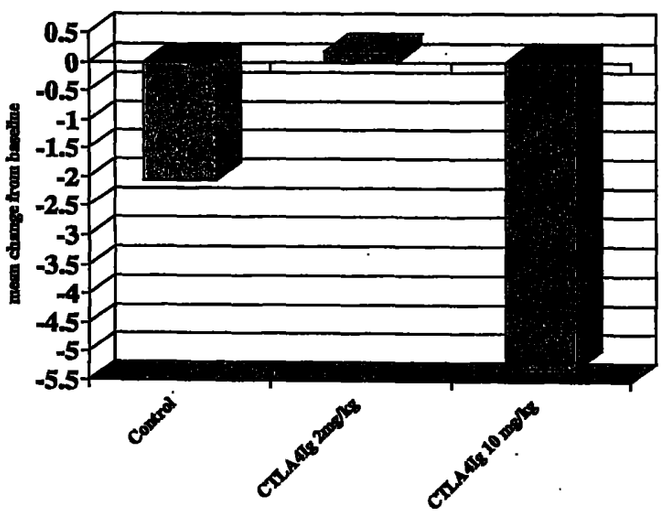


Figure 56: TNFα on Day 180



Protocol: [illegible]-198 Working Table 1, Univariate at Mathematics Score at Screening/Enrollment By Treatment Group Page: 1

GROUP=GRP 36

Univariate Procedure

Variable=MEDSCORE Score

Moments

N	134	Sum Wgts	134
Mean	14.38186	Sum	1923.35
Std Dev	4.881737	Variance	23.83461
Skewness	-0.68934	Kurtosis	0.143588
USS	30751.33	CSS	3167.857
CV	33.93187	Std Mean	0.421699
T:Mean=0	31.37818	Pr>|T|	0.0001
Num ^= 0	134	Num > 0	134
M(Sign)	67	Pr>=|M|	0.0001
Sgn Rank	4522.5	Pr>=|S|	0.0001

Quantiles (Def=5)

100% Max	25	99%	25
75% Q3	17.5	95%	23.5
50% Med	15	90%	20
25% Q1	12	10%	10
0% Min	8.4	5%	9
		1%	8.4
Range	16.6		
Q3-Q1	5.5		
Mode	12		

Extremes

Lowest	Obs	Highest	Obs
8.4	119	23	78
8.8	132	23	18
9.8	78	25	18
10	78	25	68
10	78	25	52
10	19	25	111

Missing Value
Count 3
% Count/Nobs 0.74

Fig 57

Protocol: IM101-109 Working Table : Univariate of Methotrexate Dose at Screening/Enrollment By Treatment Group Page: 2

GROUP=RMS 2

Univariate Procedure

Variable=METDOSE Dose

Moments

N	136	Sum Wgts	136
Mean	15.41176	Sum	1947.5
Std Dev	4.815921	Variance	23.19537
Skewness	-0.027	Kurtosis	0.7935
USS	32189.27	CSS	3134.312
CV	23.71729	Std Mean	0.4128
T:Mean=0	37.33145	Pr>|T|	0.0001
Num ^= 0	136	Num > 0	136
M(Sign)	63	Pr>=|M|	0.0001
Sgn Rank	4609.5	Pr>=|S|	0.0001

Quantiles(Def=5)

100% Max	30	99%	25
75% Q3	20	95%	25
50% Med	15	90%	22.5
25% Q1	12.5	10%	10
0% Min	5.7	5%	10
		1%	6.5
Range	24.3		
Q3-Q1	7.5		
Mode	15		

Extremes

Lowest	Obs	Highest	Obs
5.7(	125)	25(	119)
6.5(	113)	25(	120)
7.5(	112)	25(	121)
7.5(	78)	25(	122)
10(	126)	25(	99)

Fig. 58

GROUP=PLACEBO

Univariate Procedure

Variable=METHDOSE Dose

Moments				Quantiles(Def=5)			Extremes			
N	142	Sum Wgts	142	100% Max	25	99%	25	Lowest	Obs	Highest	Obs
Mean	15.11838	Sum	2146.75	75% Q3	20	95%	22.5	0.05	58	25	92
Std Dev	4.5775206	Variance	23.76783	50% Med	15	90%	20	0.6	69	25	99
Skewness	-0.4182	Kurtosis	0.8696695	25% Q1	12.5	10%	10	2	76	25	104
USS	36345.14	CSS	3370.803	0% Min	0.05	5%	10	3.14	79	25	105
CV	32.29429	Std Mean	0.4071895			1%	8.8	5	78	25	116
T:Mean=0	37.13255	Pr>|T|	0.0001	Range	24.95						
Num ^= 0	142	Num > 0	142	Q3-Q1	7.5						
M(Sign)	71.5	Pr>=|M|	0.0001	Mode	15						
Sgn Rank	5148	Pr>=|S|	0.0001								

Missing Value
Count 3
% Count/Nobs 2.05

Fig. 59.

Protocol: IM101-109 Page: 1
Working Table : Univariate of Methotrexate Dose During DB Up to and Including Day 169 Period
By Treatment Group

GROUP=RHE 10

Univariate Procedure

Variable=MEDDOSE Dose

Moments

N	147	Sum Wgts	147
Mean	14.18972	Sum	2045.88
Std Dev	4.814826	Variance	23.18082
Skewness	-0.12195	Kurtosis	0.339094
USS	32982.58	CSS	3384.177
CV	33.92831	Std Mean	0.397184
T:Mean=0	35.73308	Pr>|T|	0.0001
Num ^= 0	147	Num > 0	147
M(Sign)	73.5	Pr>=|M|	0.0001
Sgn Rank	5439	Pr>=|S|	0.0001

Quantiles(Def=5)

100% Max	25	99%	25
75% Q3	17.5	95%	20
50% Med	15	90%	20
25% Q1	10	10%	10
0% Min	0.4	5%	7.5
		1%	0.5
Range	24.6		
Q3-Q1	7.5		
Mode	10		

Extremes

Lowest	Obs	Highest	Obs
0.4(	132)	25(	91)
0.5(	113)	25(	93)
1.0(	82)	25(	98)
2.5(	78)	25(	103)
2.5(	78)	25(	126)

Missing Value
Count 1
% Count/Nobs 0.68

Fig. 60

Marking Table : Univariate of Methotrexate Dose During DB Up to and Including Day 180 Period
By Treatment Group

---------- TRTGRP=EXH 2 ----------

Univariate Procedure

Variable=METDOSE Dose

Moments				Quantiles(Def=5)				Extremes			
N	142	Sum Wgts	142	100% Max	30	99%	25	Lowest	Obs	Highest	Obs
Mean	15.00211	Sum	2130.3	75% Q3	20	95%	25	0.3(	141)	25(	134)
Std Dev	5.341698	Variance	28.53418	50% Med	15	90%	25	0.7(	140)	25(	135)
Skewness	-0.85889	Kurtosis	0.379857	25% Q1	10	10%	10	0.8(	128)	25(	136)
USS	36648.77	CSS	4035.789	0% Min	0.3	5%	10	0.8(	127)	25(	137)
CV	35.60429	Std Mean	0.451779			1%	0.7	1.5(	88)	30(	111)
T:Mean=0	33.20396	Pr>|T|	0.0001	Range	29.5						
Num ^= 0	142	Num > 0	142	Q3-Q1	10						
M(Sign)	71	Pr>=|M|	0.0001	Mode	15						
Sgn Rank	5076.5	Pr>=|S|	0.0001								

Fig. 61...

Protocol: IRI01-108 Page: 1
Working Table : Univariate of Methotrexate Dose During 48 Up to and Including Day 168 Period
By Treatment Group

GROUP=PLACEBO

Univariate Procedure

Variable=MEDDOSE Dose

Moments

N	161	Sum Wgts	161
Mean	17.0012	Sum	2737.19
Std Dev	13.49315	Variance	187.9869
Skewness	10.82753	Kurtosis	134.3445
USS	108424.9	CSS	30087.55
CV	113.8416	Std Mean	1.063193
T:Mean=0	10.98239	Pr>|T|	0.0001
Num ^= 0	161	Num > 0	161
M(Sign)	80.5	Pr>=|M|	0.0001
Sgn Rank	6520.5	Pr>=|S|	0.0001

Quantiles(Def=5)

100% Max	250	99%	75
75% Q3	20	95%	50
50% Med	15	90%	40
25% Q1	12.5	10%	15
0% Min	0.25	5%	7.5
		1%	0.5
Range	249.75		
Q3-Q1	7.5		
Mode	15		

Extremes

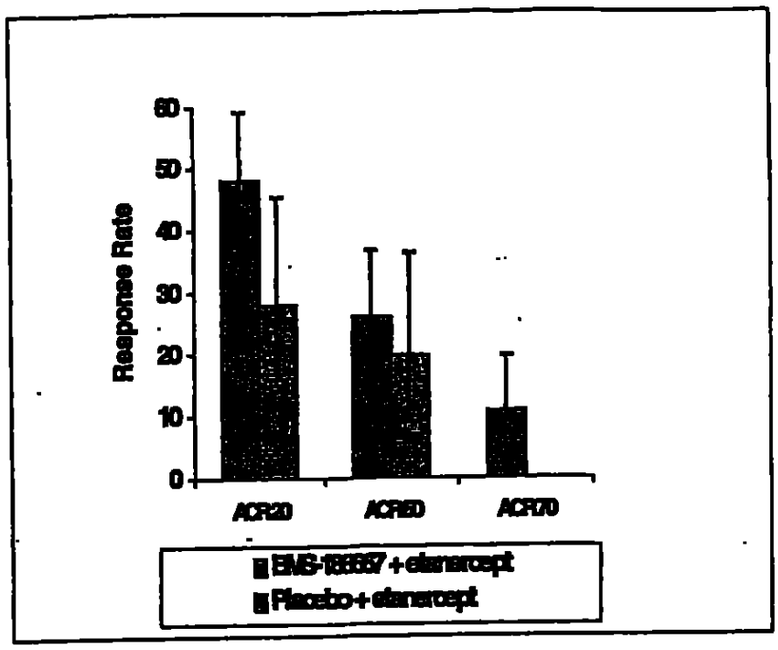
Lowest	Obs	Highest	Obs
0.25(	57)	75(	11)
0.5(	87)	125(	154)
1(	82)	150(	108)
2.16(	86)	175(	38)
5(	78)	250(	115)

Missing Value 1
Count
% Count/Nobs 1.8

Fig. 62

26

Figure 63: **Modified ACR Response on Day 180 (95% CI) ***



*See criteria for evaluation

Figure 64a to 64c: Individual Components of the modified ACR criteria by Visit

Fig. 64a:Tender Joint Count

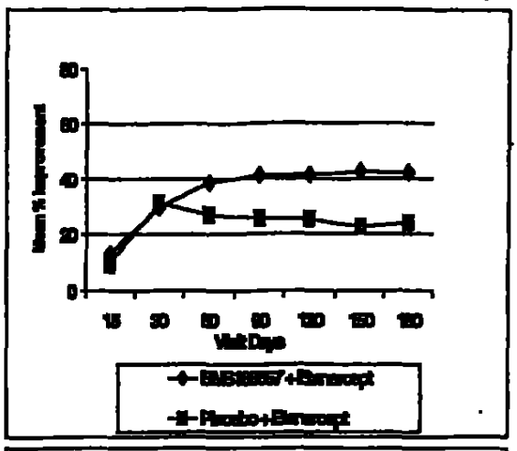


Fig 64b: Swollen Joint Count

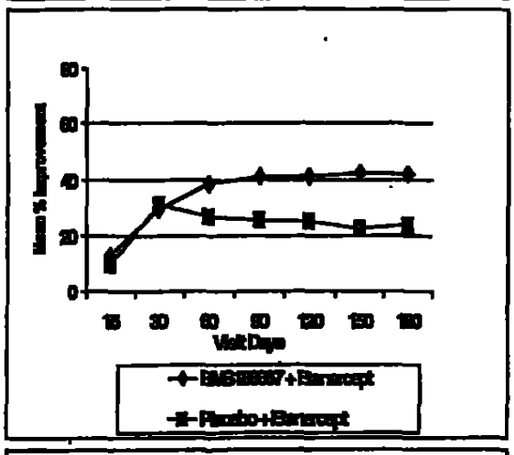


Fig 64c: Pain Assessment

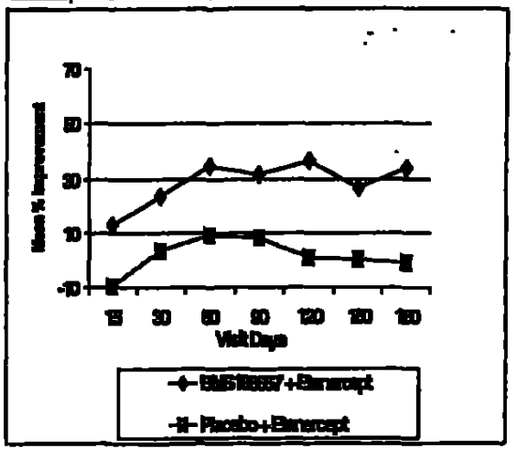
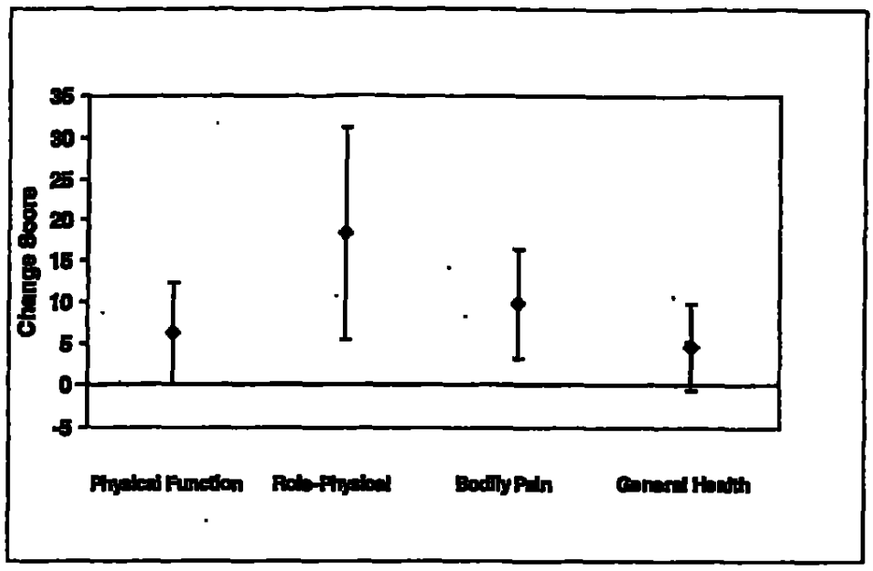
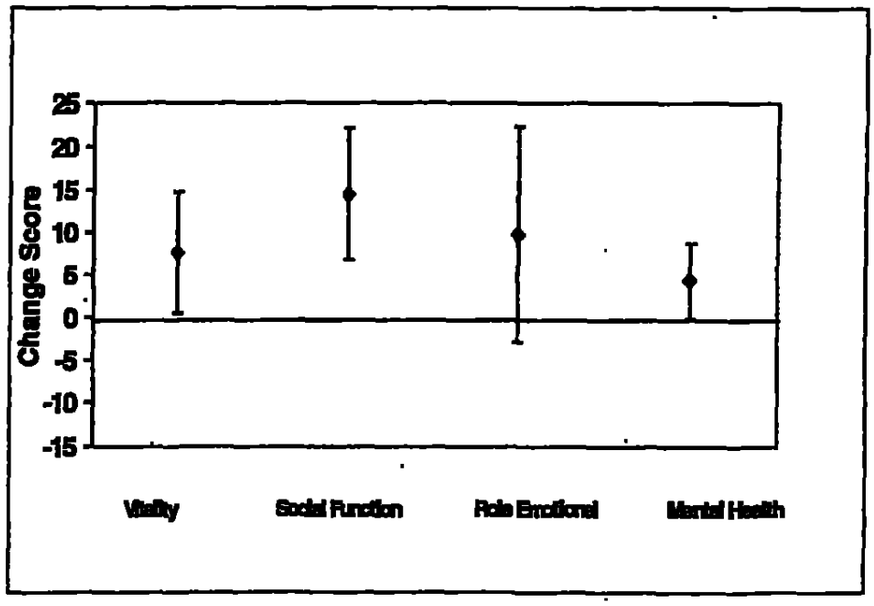


Figure 65: **Change from Baseline for SF-36 on Day 180 (±95 % CI)**

Physical Health



Mental Health



1660 267

ATGGGTGTAC TGCTCACAÇA GAGGACGCTG CTCAGTCTGG TCCTTGCACT CCTGTTTCCA
AGCATGGCGA GCATGGCAAT GCACGTGGCC CAGCCTGCTG TGGTACTGGC CAGCAGCCGA
GGCATCGCCA GCTTTGTGTG TGAGTATGCA TCTCCAGGCA AAGCCACTGA GGTCCGGGTG
ACACTGCTTC GGCAGGCTGA CAGCCAGGTG ACTGAAGTCT GTGCGGCAAC CTACATGATG
GGGAATGAGT TGACCTTCCT AGATGATTCC ATCTGCACGG GCACCTCCAG TGGAAATCAA
GTGAACCTCA CTATCCAAGG ACTGAGGGCC ATGGACACGG GACTCTACAT CTGCAAGGTG
GAGCTCATGT ACCCACCGCC ATACTACCTG GGCATAGGCA ACGGAACCCA GATTTATGTA
ATTGATCCAG AACCGTGCCC AGATTCTGAT CAGGAGCCCA AATCTTCTGA CAAAACTCAC
ACATCCCCAC CGTCCCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAT CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG
GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC
GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC
AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA
GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCCATCC CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTCAGC
CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT
GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA
TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT
CCGGGTAAAT GA

Fig 66

```
MGVLLTQRTL LSLVLALLFP SMASMAMHVA QPAVVLASSR GIASFVCEYA   50
SPGKATEVRV TVLRQADSQV TEVCAATYMM GNELTFLDDS ICTGTSSGNQ  100
VNLTIQGLRA MDTGLYICKV ELMYPPPYYL GIGNGTQIYV IDPEPCPDSD  150
QEPKSSDKTH TSPPSPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV  200
DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL  250
NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS  300
LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK  350
SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
```

Fig 67

Figure 68: Subject Disposition

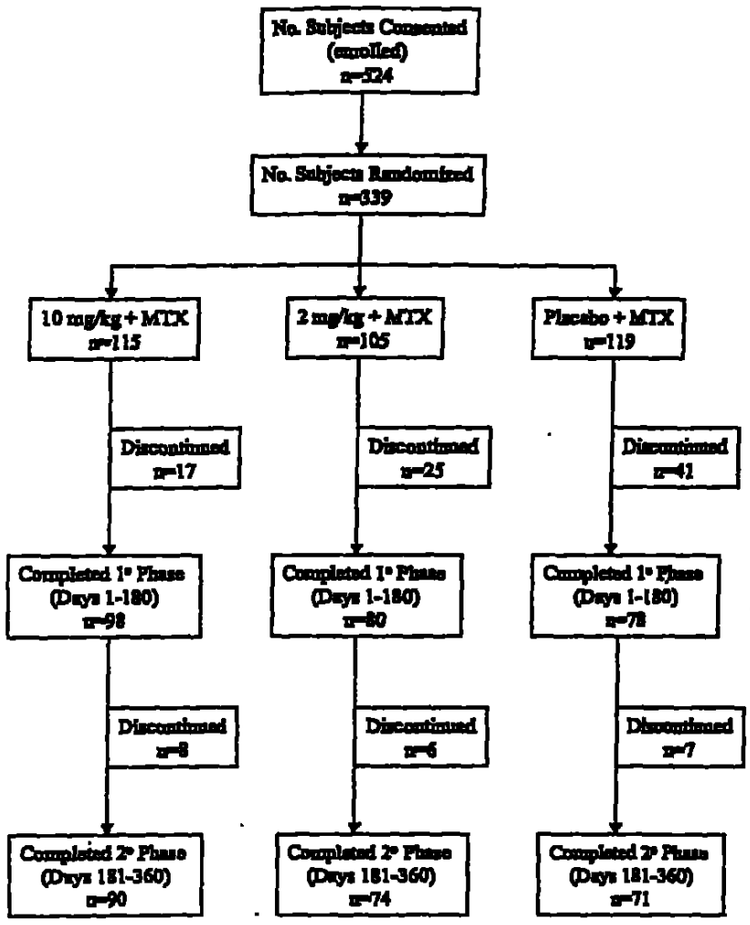


Figure 69: **Summary of Discontinuation Rates Through Day 360 (All Reasons Combined)**

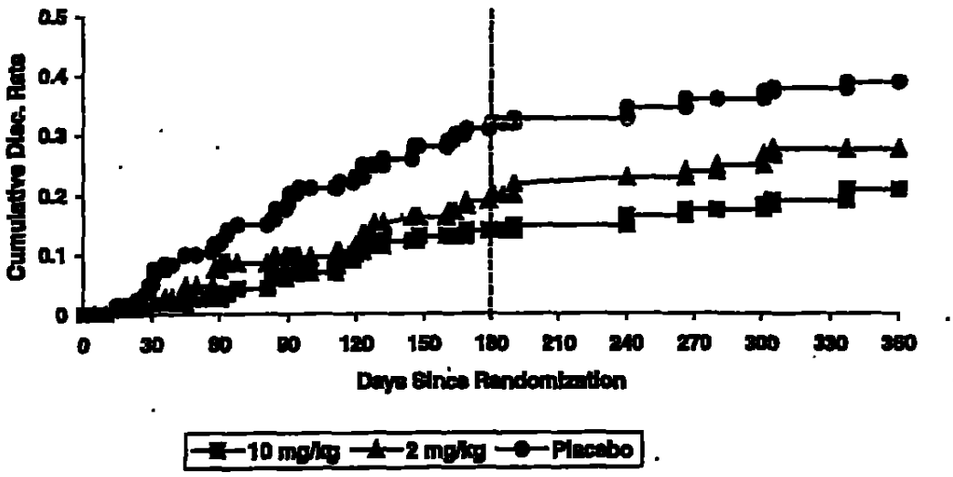


Figure 70: **Summary of Discontinuation Rates Through Day 360 (Due to Lack of Efficacy)**

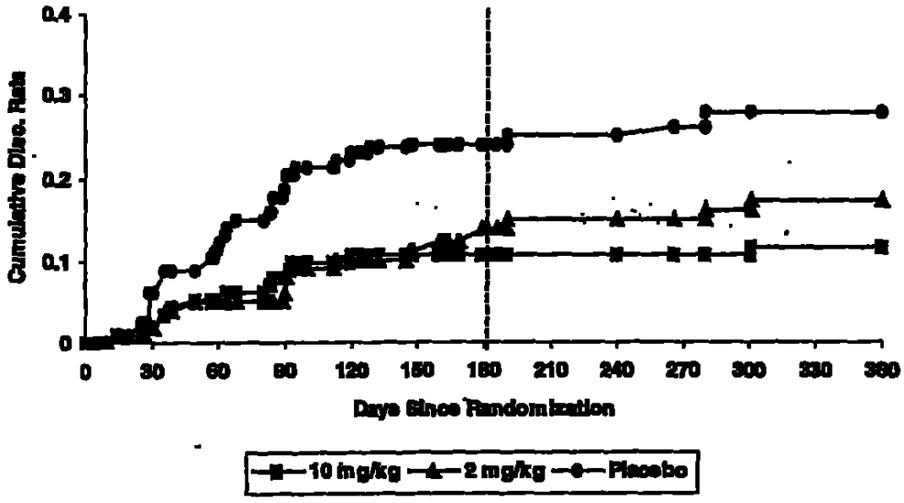
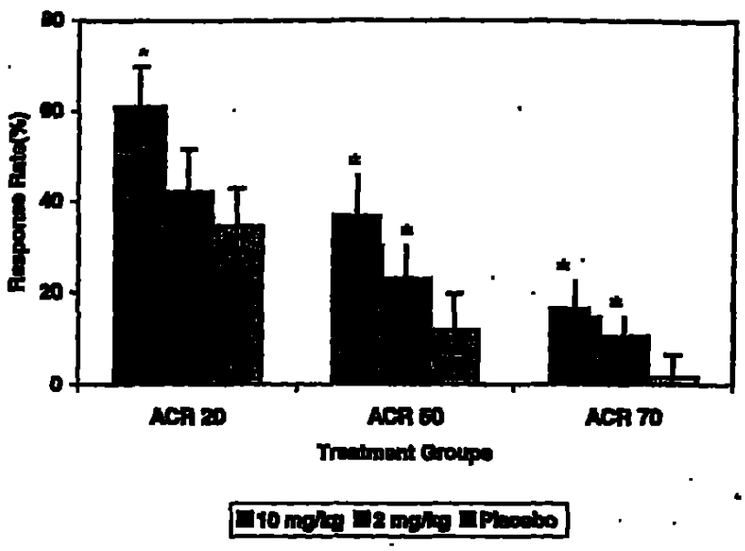


Figure 71A: ACR Response on Day 180



* Indicates a significantly significant result for comparison of BMS-188667 vs placebo.

Figure 71B: 95 Percent Confidence Intervals for Differences in ACR Responses on Day 180

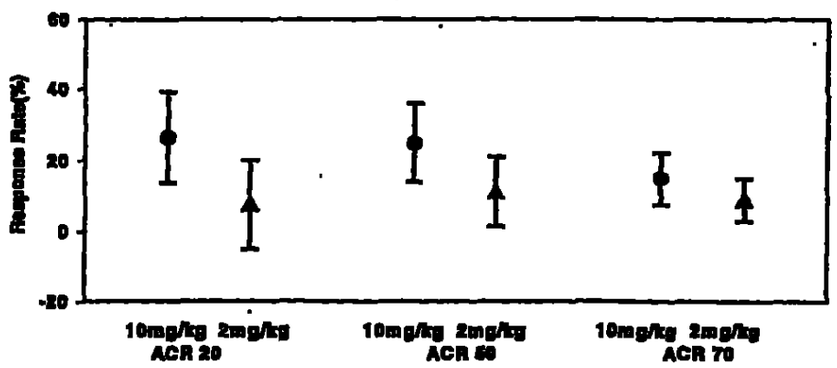
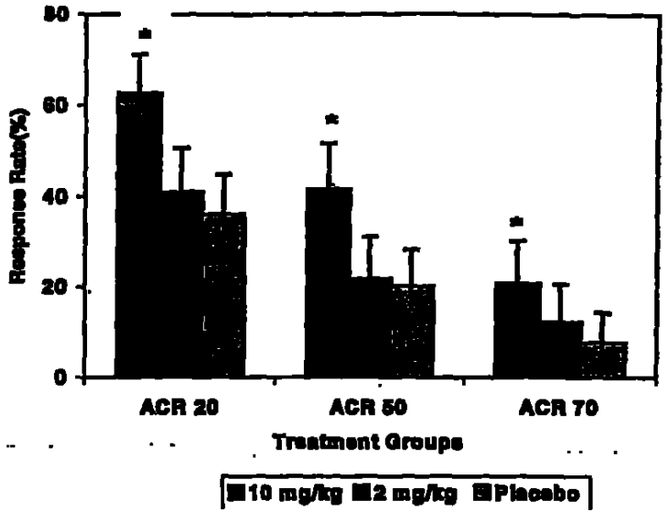


Figure 72A: ACR Response on Day 360



* Indicates a significantly significant result for comparison of 10 mg/kg vs placebo.

Figure 72B: 95 Percent Confidence Intervals for Differences in ACR Responses on Day 360

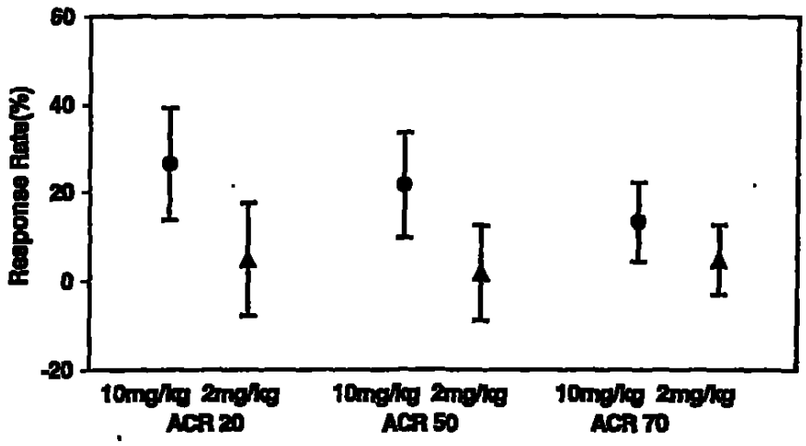


Figure 73A: Summary of ACR 20 Response by Visit

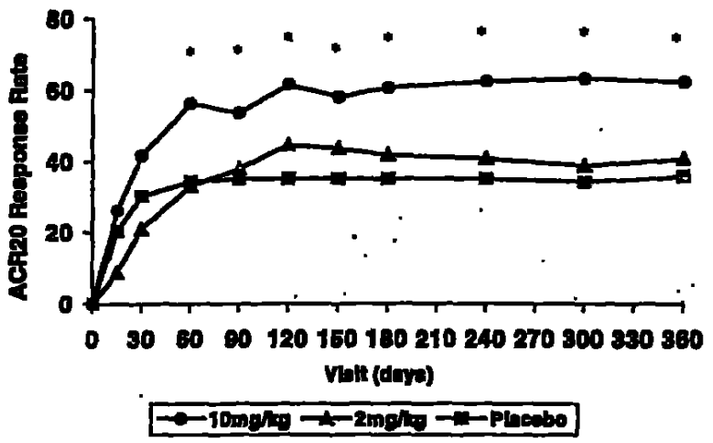


Figure 73B: Summary of ACR 50 Response by Visit

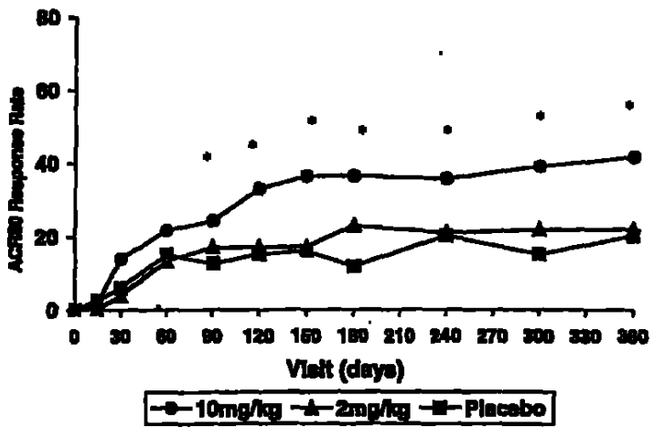
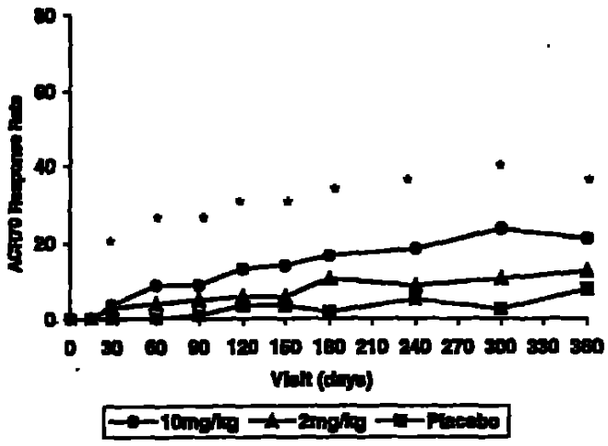


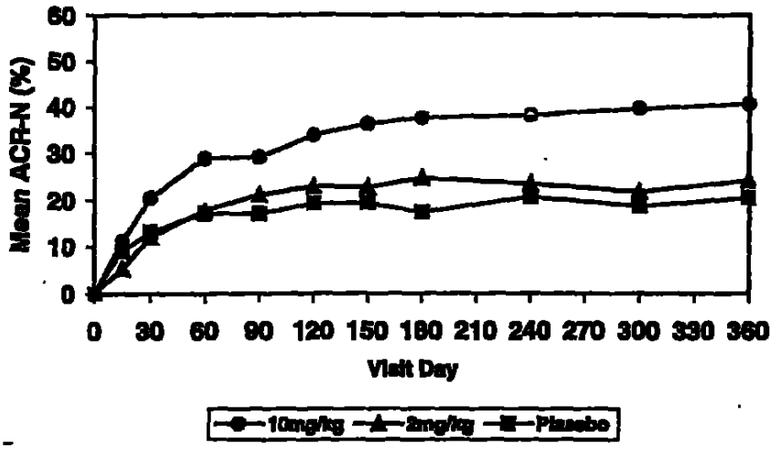
Figure 73C: Summary of ACR 70 Response by Visit



*Indicates a statistically significant difference for the comparison of 10 mg/kg vs placebo.

276

Figure 74: Mean ACR-N Over Time



* Indicates a statistically significant difference for the comparison of 10 mg/kg vs placebo.

Figure 75: **Proportion of New Active Joints at Day 180**

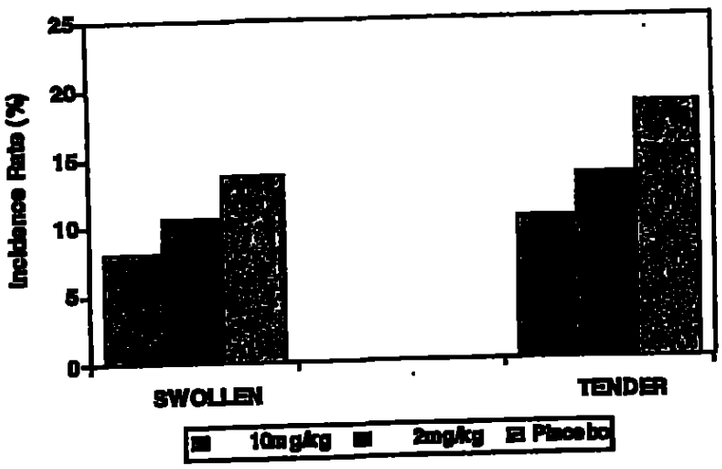


Figure 76A: Frequency of New Tender Joints per Subject at Day 180

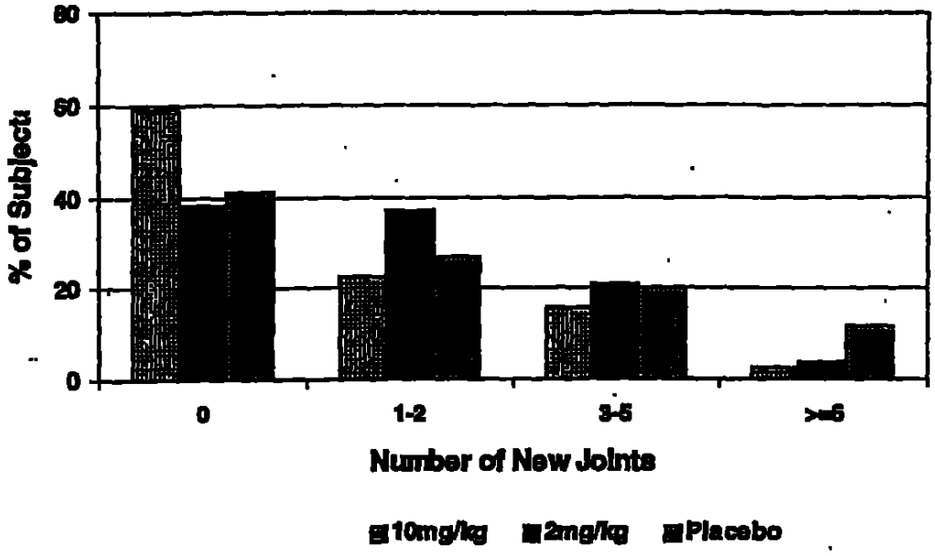


Figure 76B: Frequency of New Tender Joints per Subject at Day 360

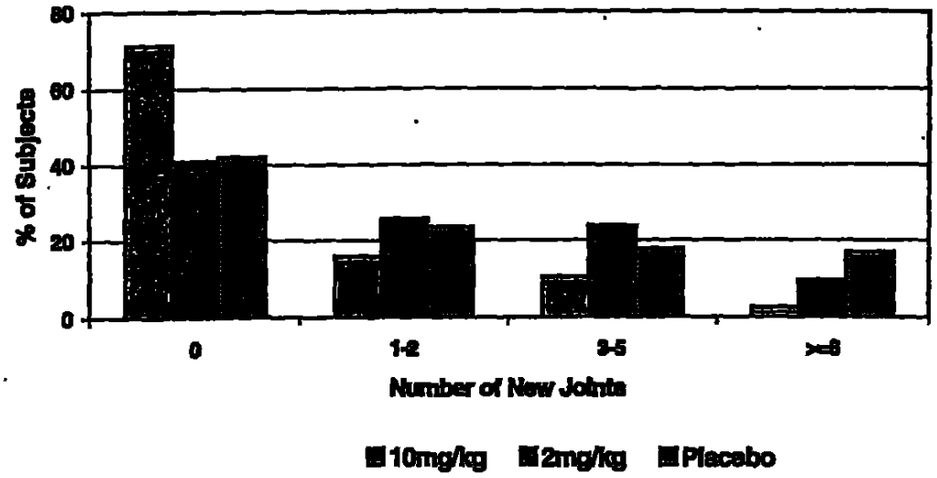


Figure 77A: Frequency of New Swollen Joints per Subject at Day 180

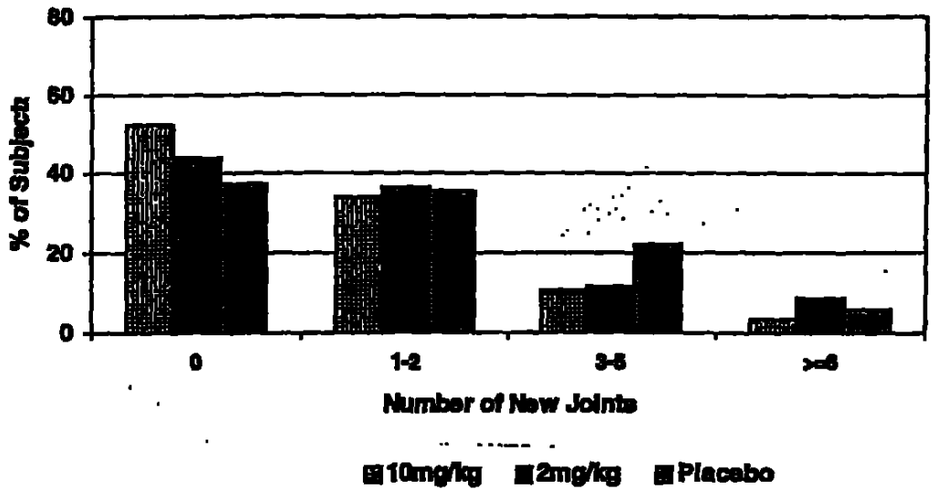


Figure 77B: Frequency of New Swollen Joints per Subject at Day 360

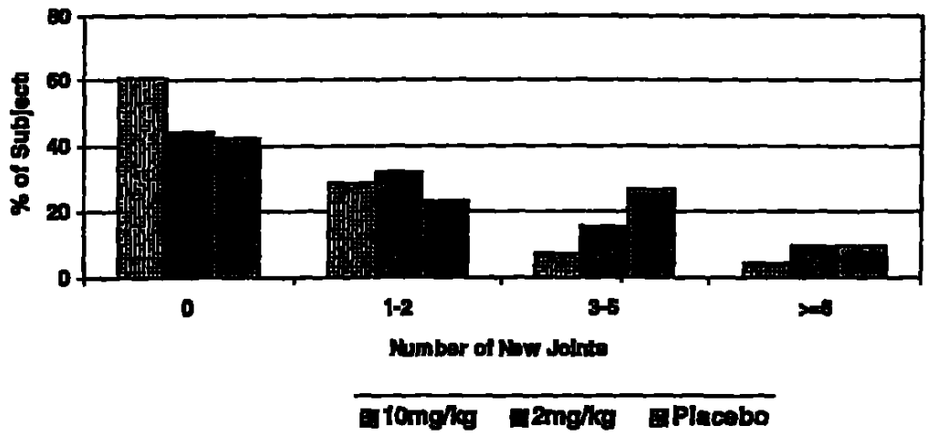


Figure 78: Proportion of New Active Joints at Day 360

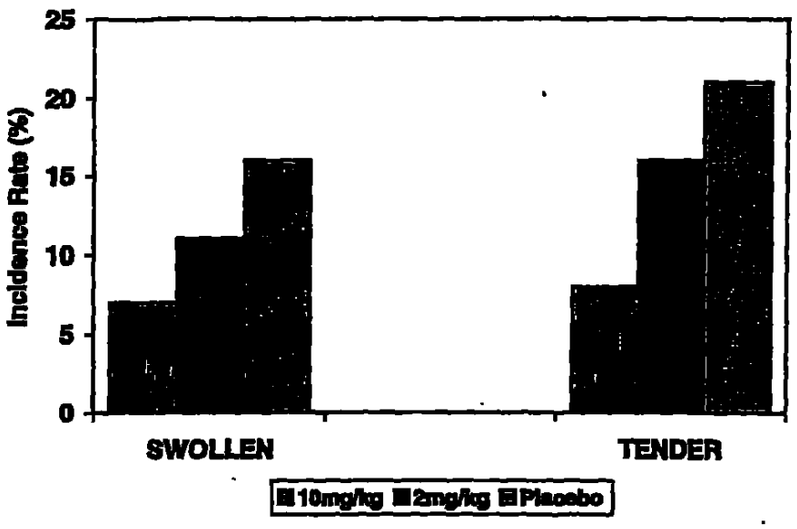


Figure 79A: **Change from Baseline in the Physical Health Domains on Day 180**

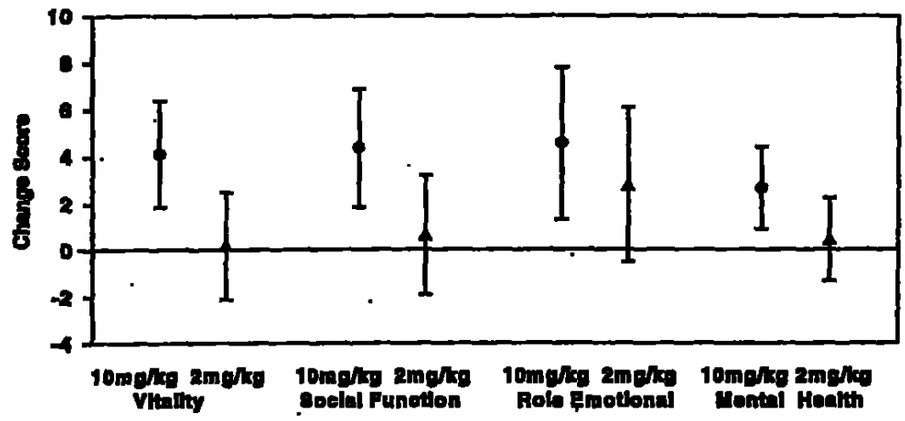


Figure 79B: **Change from Baseline in the Mental Health Domains on Day 180**

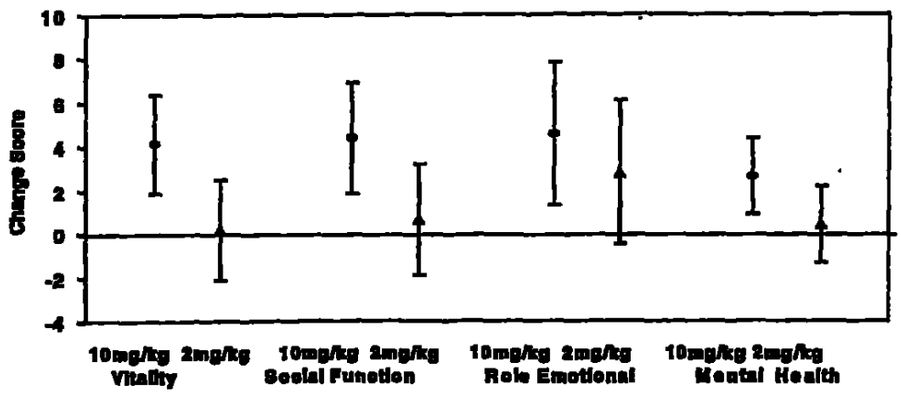


Figure 80A: **Change from Baseline in the Physical Health Domains on Day 360**

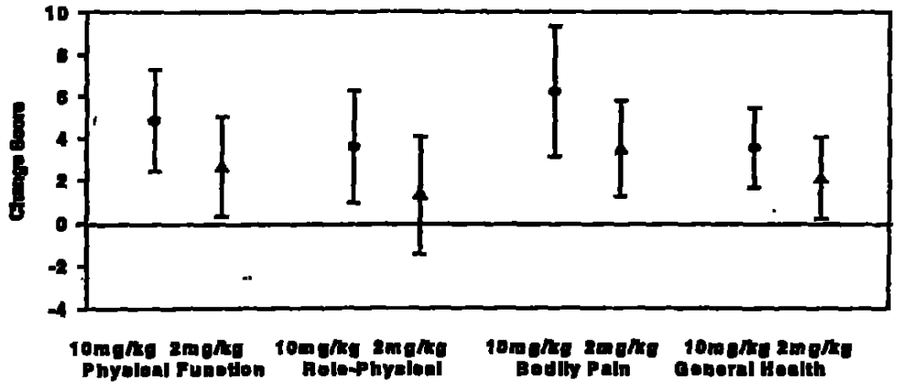


Figure 80B: **Change from Baseline in the Mental Health Domains on Day 360**

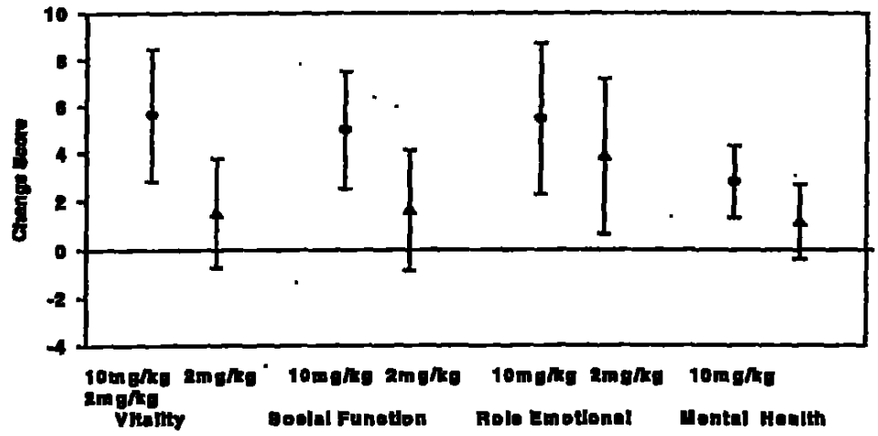


Figure 81: **Soluble IL-2r Levels Through Day 360**

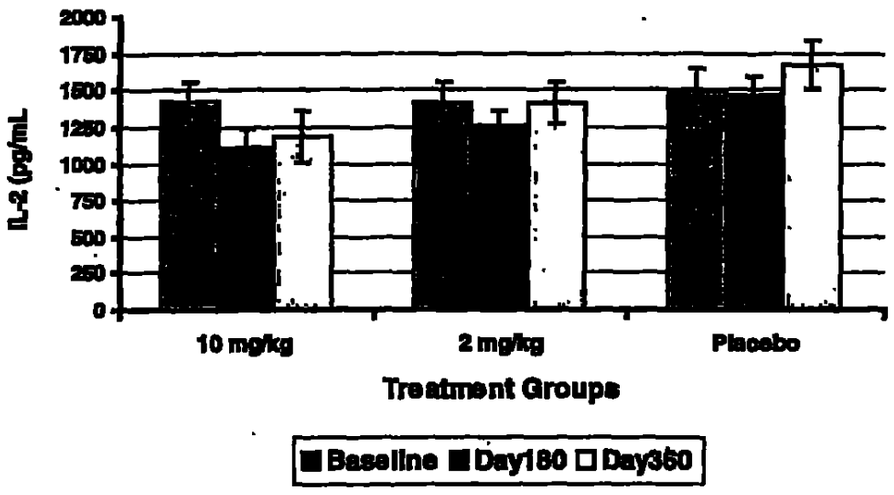


Figure 82: Rheumatoid Factor Levels Through Day 360

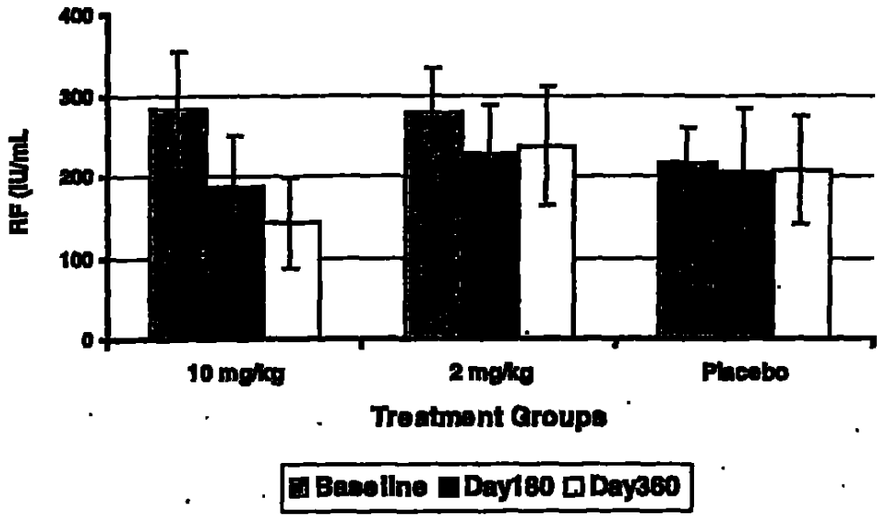


Figure 83: **ICAM-1 Levels Through Day 360**

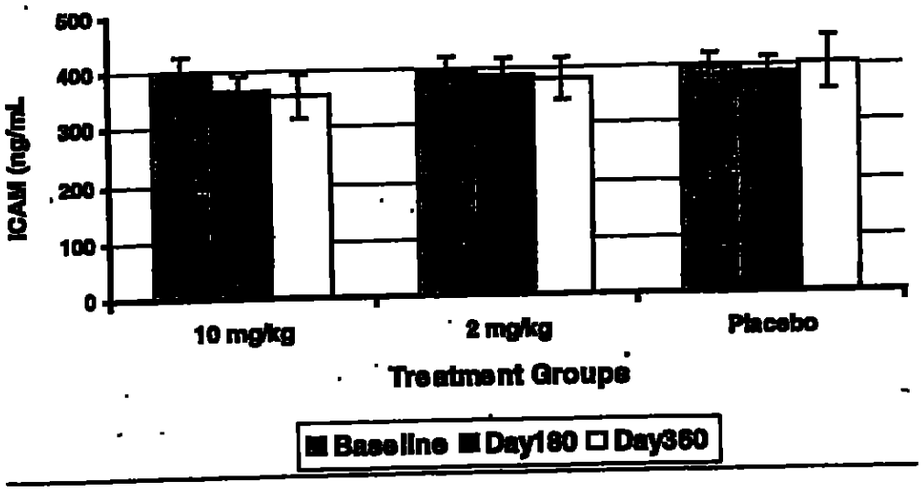


Figure 84: **e-Selectin Levels Through Day 360**

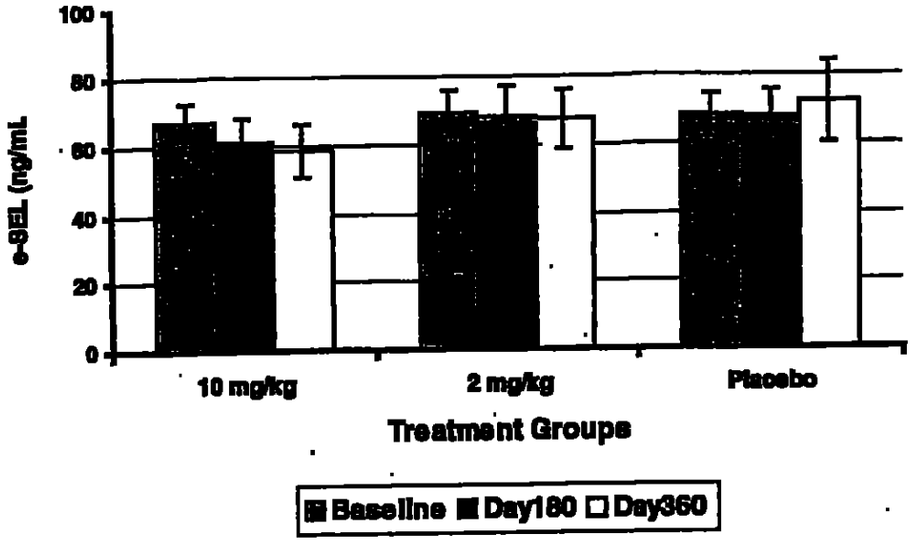


Figure 85: Serum IL-6 Through Day 360

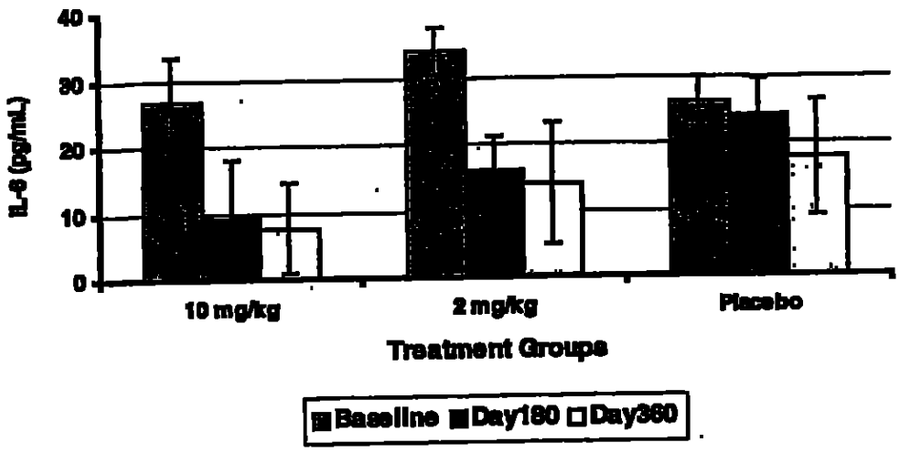


Figure 86A: **CRP Levels Through Day 360**

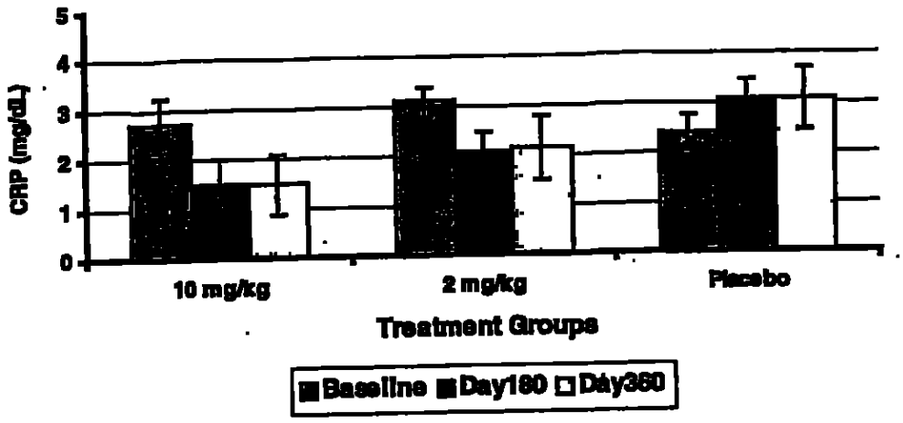
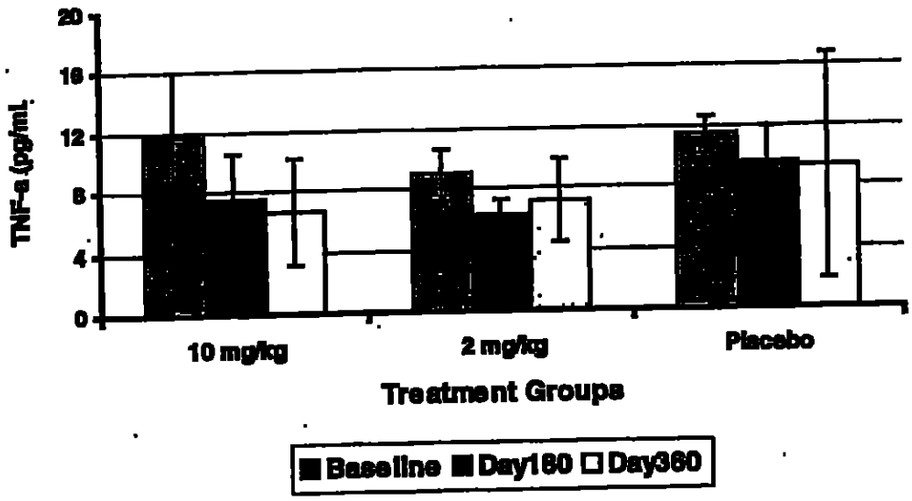


Figure 86B: **TNFα Levels Through Day 360**



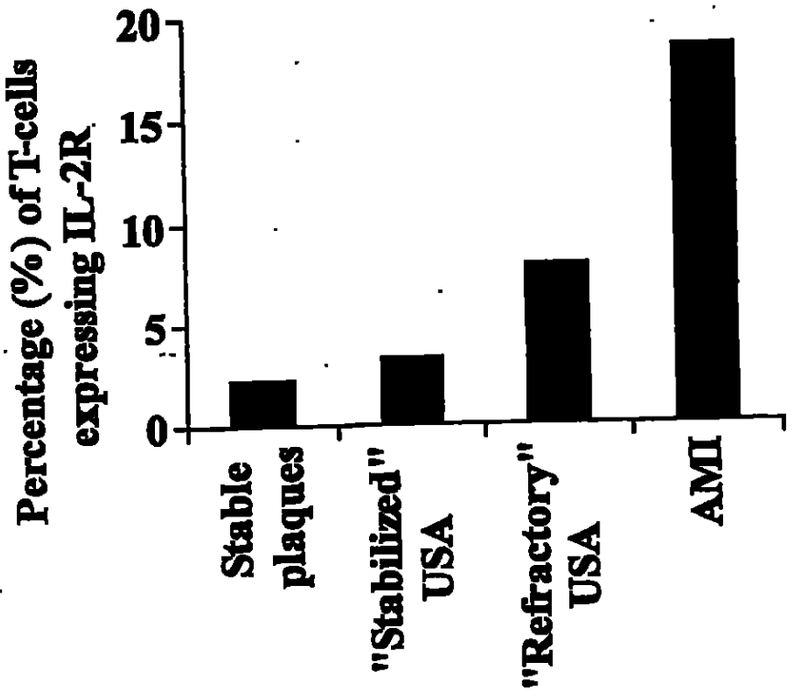

Percentage (%) of T-cells expressing IL-2R
20
15
10
5
0
Stable plaques
"Stabilized" USA
"Refractory" USA
AMI

FIG. 87

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional

(código de barras) 291

(43) Fecha de Publicación Internacional:
24 Febrero 2005 (24.02.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional:
WO 2005/016266 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes [7]: A61K

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2004/024840

(22) Fecha de Presentación Internacional: 3 Agosto 2004 (03.08.2004)

(25) Lenguaje de Presentación: Inglés

(26) Lenguaje de publicación: Inglés

(30) Fecha de Prioridad:

60/492,430 4 Agosto 2003 (04.08.2003) US

(71) Solicitante (*todos los estados designados excepto US*): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US]; P.O. BOX 4000, ROUTE 206 & PROVINCE LINE ROAD, PRINCETON, New Jersey 08543 (US).

(72) Inventor; y

(75) Inventor/Solicitante (*para US solamente*): RUSNAK, James [US/US]; 540 Pineville Road, Newton, Pennsylvania 18940 (US).

(74) Agentes: SIFER, Andrey, F. et al.; P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(81) Estados Designados (*nacional*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (*regional*): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GE, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada
- *con reporte de búsqueda internacional*
- *Antes de que expire el tiempo límite para enmendar las reivindicaciones y para republicarse en el evento de la recepción de las enmiendas.*

Para codigos de dos letras y otras abreviaciones, refiérase a la "Notas Guias en Códigos y Abreviaciones" que aparece al inicio de cada publicación regular de la Gaceta PCT"

(54) Título: MÉTODOS PARA TRATAR ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES USANDO UNA MOLÉCULA SOLUBLE CTLA4

		Placebo N=62	CTLA-8 N=65	CTLA-2 N=62	CTLA-15 N=62	LEA-5 N=63	LEA-3 N=59	LEA-10 N=61	Total N=434
Género	Hombre	6 (10%)	4 (12%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
	Mujer	26 (81%)	28 (88%)	29 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
Raza	Blanco	28 (94%)	32 (94%)	36 (90%)	28 (94%)	29 (91%)	28 (96%)	27 (87%)	204 (91%)
	Negro	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (3%)	0 (0%)	3 (9%)	9 (4%)
	Otro	0 (0%)	2 (12%)	4 (10%)	1 (3%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	11 (5%)
Enfermedad Duración en años	<2 años	22 (69%)	5 (15%)	5 (13%)	12 (38%)	10 (31%)	10 (34%)	11 (35%)	65 (30%)
	2-5 años	14 (44%)	11 (33%)	15 (38%)	13 (41%)	14 (44%)	14 (48%)	13 (42%)	94 (43%)
	5-7 años	6 (19%)	8 (24%)	4 (10%)	6 (19%)	6 (19%)	5 (17%)	7 (23%)	44 (21%)
	>7 años	0 (0%)	2 (6%)	6 (15%)	1 (3%)	2 (6%)	0 (0%)	1 (3%)	6 (3%)
Duración Enfermedad (años)	N	31	26	37	32	32	29	31	218
	Media	2.2	4.3	5.3	3.6	3.7	3.3	3	3.6
	Mediana	1	2	3.7	2.1	1	2.3	2.2	2
	Mín	0.3	0.3	0.4	0	0.3	0.4	0	0
	Máx	7	7.5	45.8	7.3	7.6	7	7.1	7.6

(57) Resumen: La presente invención se refiere a composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades del sistema cardiovascular, al administrar a un sujeto moléculas solubles de CTLA4 que bloquean las moléculas endógenas B7 de su enlace a los ligandos.

ad 292

METODOS DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR USANDO UNA MOLECULA SOLUBLE DE CTLA4

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere generalmente al campo de enfermedades cardiovasculares. En particular, la invención se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares al administrar a un sujeto una cantidad efectiva de moléculas solubles de CTLA4 solas o en conjunto con otros agentes terapéuticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Aproximadamente 62 millones de Americanos tienen uno o más tipos de enfermedad cardiovascular con la enfermedad coronaria del corazón (CHD por sus siglas en inglés) y la apoplejía que afectan a más de 17 millones de pacientes solamente en los Estados Unidos (Ref: American Heart Association. 2002 Heart and Stroke Statistical Update. Dallas, Tex.; American Heart Association; 2001). A pesar de las diversas opciones terapéuticas y avances tecnológicos, la morbilidad y mortalidad de estas enfermedades es sorprendentemente alta; de hecho, las enfermedades cardiovasculares son la causa principal en los Estados Unidos tomando 2 de cada 5 muertes. En consecuencia se necesitan nuevos métodos para el tratamiento y prevención de

293

enfermedades cardiovasculares.

El concepto de que la ateroesclerosis, la causa líder de CHD sea un proceso de acumulación pasiva de lípidos en las paredes arteriales que conduce eventualmente al desarrollo de enfermedad cardiovascular sintomática ya no es sostenible (Ref: Scientific American 2002 (Mayo): 46-55). En su lugar, esta hipótesis se reemplaza por la evidencia de que la enfermedad cardiovascular representa un proceso inflamatorio crónico (Ref: Circulation 2002, 105: 1135-43). Se ha propuesto que los eventos subyacentes y precedentes cerebrovasculares o coronarios agudos son placas ateroescleróticas "vulnerables" (o de alto riesgo). La inflamación se cree que es un factor importante que contribuye a la inestabilidad de placas y a la ruptura que conduce a angina inestable (UA) e infarto al miocardio agudo (AMI). Las placas vulnerables han demostrado estar con frecuencia presentes en diferentes ubicaciones anatómicamente distintas más que en una lesión aislada o sencilla (culpada) (Ref: Circulation 2003; 107; 2072-2075). La naturaleza multifocal de las placas vulnerables se ha documentado en una serie de autopsias y en estudios que utilizan técnicas angiográficas, intravasculares de ultrasonido (IVUS), angioscópicas, o de termografía. Los datos de punto final clínicos (por ejemplo muerte, infarto al miocardio, y apoplejía) que soportan además estas hipótesis, se derivan de

datos epidemiológicos, análisis retrospectivos generadores de hipótesis de ensayos clínicos terminados, y la evaluación prospectiva en ensayos clínicos (que se resume a continuación).

Los datos epidemiológicos de un Estudio de Salud de Médicos proporciona una evidencia contundente de que los marcadores de la inflamación (por ejemplo, proteína reactiva C [CPR], fibrinógeno, interleucina 6, molécula de adhesión intracelular soluble [s]CAM-1]) predicen un riesgo futuro de desarrollar AMI (Ref: Circulation 1999; 100: 1148-1150). Posteriormente, más de una docena de estudios epidemiológicos basados en la población han reportado observaciones similares (Ref; Circulation 2002, 105: 1135-43). El CRP (y el CRP de alta sensibilidad [hs-CRP]) ha sido el marcador inflamatorio más ampliamente estudiado a través de estudios epidemiológicos. CRP parece ser un predictor independiente de eventos cardiovasculares posteriores (AMI, muerte) tanto en la prevención primaria como en poblaciones de pacientes con prevención secundaria.

La evidencia clínica y experimental soporta la noción de que la reducción de la inflamación conduce a una reducción en los eventos clínicos. La aspirina se ha demostrado en el Estudio de Salud de Médicos que se asocia con una reducción de la inflamación cuando se mide por CRP, y se asocia con una reducción concomitante de eventos coronarios (Ref:

295

Circulation 1999; 100:1148-1150). No se sabe hasta que grado los efectos anti-inflamatorios/reducción de CRP contra los efectos antiplaquetas de la aspirina tienen en este hallazgo en una población de hombres aparentemente saludables. Los inhibidores de la coenzima A de hidroxi-3-metilglutarilo (HMG-CoA) reductasa (estatinas, por ejemplo pravastatina, simvastatina, atorvastatina, fluvastatina y lovastatina) sirven como un segundo ejemplo de una terapia existente que tiene propiedades anti-inflamatorias. Además de sus efectos en los lípidos del suero, las estatinas también reducen CRP (Ref: Circulation 2002; 105:1135-43). El estudio de la pravastatina en el colesterol y los eventos recurrentes (CARE) proporciona la primera evidencia clínica de que la terapia con estatina disminuye CRP en una forma no relacionada con el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) o lipoproteína de alta densidad (HDL). La magnitud de la reducción del riesgo relativo para eventos cardiovasculares posteriores en esta población hipercolesterolémica, fue mayor entre los sujetos que también tuvieron evidencia de inflamación (esto es, elevación de CRP) en comparación con aquellos sin evidencia de inflamación (Ref: Circulation 1999; 10:230-235). Esta observación se valida prospectivamente en el estudio de Evaluación de CRP de Inflamación por Pravastatina (PRINCE) y también se reporta en el análisis de varios otros ensayos con una diversidad de

344 296

estatinaa (Ref: Circulation 2002; 105:1135-43).

La evidencia que disocia los beneficios de la terapia de estatina en pacientes con elevaciones en CRP a partir de aquellos con elevación del colesterol, se deriva de un Estudio de Prevención de Ateroesclerosis Coronaria en Texas/Fuerza Aérea (AFCAPS/TexCAPS; Ref: New Engl J Med 2001; 344:1959-1965). Este estudio fue un estudio de prevención primario utilizando lovastatina en una población con riesgo cardiovascular de bajo a moderado. En este estudio la magnitud de la reducción del riesgo permitido por la lovastatina en comparación con el placebo fue casi tan grande en pacientes con bajos niveles de LDL/altos niveles de CRP en comparación con aquellos con altos niveles de LDL/bajos niveles de CRP.

Los hallazgos anteriores sugieren que la inflamación representa una categoría de riesgo novedosa que no se atiende actualmente como un estándar de cuidado en los lineamientos de la práctica clínica. Ya que aproximadamente la mitad de los ataques al corazón suceden en poblaciones con niveles de colesterol normales, la identificación y modulación de factores de riesgo recientemente identificados sería una estrategia importante para reducir la morbilidad y mortalidad cardiovascular. La población que se ajusta dentro de este ensayo de LDL bajo(CRP alto, se ha estimado que es de aproximadamente 25 millones de Americanos (Ref: Circulation

297

2002; 105:1135-43). La elevación de CRP parece suceder en una forma graduada consistente con el riesgo posterior de eventos cardiovasculares. Específicamente, el CRP (>3 mg/dL) elevado se encuentra el 10% de los individuos saludables, pero se eleva en <20%, >65% y >90% en pacientes con angina estable crónica, angina inestable (Braunwald clase IIIb), y AMI antecedido por USA, respectivamente (Ref; Circulation 2002; 105:1135-43). Por lo tanto, los marcadores inflamatorios representan una oportunidad para la identificación e intervención farmacológica en poblaciones en riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares.

Se sabe que otros marcadores de inflamación pueden ya sea reemplazar o aumentar la utilidad de la medición de CRP. Recientemente, los marcadores novedosos de inflamación, incluyendo los incrementos en el ligando soluble CD40 (sCD40L) y las disminuciones en la concentración de interleucina 10 en suero (IL-10) se han asociado con una morbilidad y mortalidad cardiovascular crecientes. La evidencia sugiere que CD40L es importante en la desestabilización de placas ateroescleróticas. El CD40L cubierto de linfocitos estimulados es pro-inflamatorio lo que provoca la sobre regulación de las citocinas inflamatorias y las moléculas de adhesión. Además, CD40L también promueve la coagulación al inducir la expresión del factor de tejido en macrófagos y células endoteliales y también activa la

glicoproteína IIb/IIa (Refs: Proc. Natl. Acad. Sci. 1997; 94: 1931-1936; Nature 1998; 394:200-203; Circulation 2002; 106:896-899).

La evidencia epidemiológica del Estudio de Salud en Mujeres, demuestra concentraciones en suero elevadas de sCD40L que se asocian con una elevación graduada y continua en el riesgo cardiovascular (Ref: Circulation 2001; 104:2266-2268). El incremento en el riesgo cardiovascular fue casi 12 veces superior entre mujeres con las concentraciones mayores de sCD40L. Se observaron también hallazgos similares en la terapia antiplaquetas c7E3 Fab en el estudio de angina refractaria inestable (CAPTURE) (Ref: NEJM 2003; 348:1104-1111). En este estudio, una elevación graduada y continua en el riesgo cardiovascular (infarto al miocardio no fatal o muerte) se observó entre sujetos tratados con el placebo con base en los quintilos de sCD40L de la línea base. Esta diferencia en el riesgo cardiovascular fue evidente en las terminaciones de punto final tanto tempranas (24 horas) y tardías (6 meses). Un análisis similar a partir del ensayo CAPTURE que investiga la citoquina anti-inflamatoria IL-10, reveló que los pacientes tratados con placebo con altos niveles de IL-10 (esto es, altos niveles de citosina anti-inflamatoria) tuvo un riesgo reducido de muerte (Ref: Circulation 2003; 107:2109-2114). Los pacientes en el cuartil más elevado de concentraciones de suero de la citoquina anti-

inflamatoria IL-10, tuvo una reducción de >50% en la velocidad de mortalidad en comparación con aquellos pacientes en el cuartil más bajo de los niveles de suero IL-10. Adicionalmente, si al momento de que las poblaciones de pacientes con descarga en hospital se dicotomizan con niveles ya sea altos o bajos del IL-10, hay una relación de riesgo ajustada observada para la mortalidad de 0.38 (esto es, una reducción de riesgo relativo de 62%) en 6 meses lo que favorece a los sujetos con altos niveles de IL-10 (anti-inflamatorios).

En resumen, el concepto de las enfermedades cardiovasculares que suceden como un proceso pasivo mediado por la deposición solamente de lípidos es anticuado. Existe un incremento substancial en la evidencia clínica y experimental que sugiere que la enfermedad cardiovascular es una manifestación de un proceso inflamatorio crónico, y que la intervención en esta inflamación puede reducir la morbilidad y la mortalidad del paciente. Sin embargo, actualmente los mediadores celulares y moleculares de estos procesos solamente se están ahora obteniendo. La producción de estos procesos se obstaculiza por la falta de un modelo preclínico adecuado para el síndrome coronario agudo (ACS). A pesar de la falta de conocimiento de estos mecanismos precisos, los efectos anti-inflamatorios de las estatinas parecen validar el concepto de que la intervención

farmacológica en pacientes con marcadores elevados de inflamación conduce a reducciones en la morbilidad y en la mortalidad cardiovascular. De manera notable, estos beneficios resultan a través de actividades anti-inflamatorias pleiotrópicas valiosas por casualidad de las estatinas, un mayor entendimiento de los procesos celulares y moleculares puede conducir al desarrollo de agentes anti-inflamatorios específicos y más eficaces para reducir además la morbilidad y mortalidad cardiovascular entre estos pacientes.

En general, la magnitud de la respuesta de células T se determina por la respuesta co-estimuladora producida por la interacción entre moléculas de superficie de células T y sus ligandos (Mueller, et al., 1989 Ann. Rev. Immunol. 7:445-480). Se proporcionan señales co-estimuladoras clave por la interacción entre los receptores de superficie de células T CD28 y CTLA4 y sus ligandos tales como las moléculas relacionadas con B7 CD80 (esto es, B7-1) y CD86 (esto es, B7-2), sobres células que presentan antígenos (Linsley, P. And Ledbetter, J. 1993 Ann. Rev. Immunol. 11:191-212). La activación de células T en ausencia de la co-estimulación resulta en una respuesta anergica de células T (Schwartz, R. H., 1992 Cell 71:1065-1068) en donde el sistema inmune se vuelve sin respuesta a la estimulación.

Las formas solubles de CD28 y CTLA4 se han construido al

301

fusionar dominios extracelulares variables de tipo (V) de CD28 y CTLA4 a los dominios constantes de inmunoglobulina (Ig) lo que resulta en CD28Ig y CTLA4Ig. Una secuencia de nucleótidos y aminoácidos de CTLA4IG se muestra en la Figura 24 con la proteína que comienza con la metionina en la posición +1 o alanina en la posición -1 y que termina con la lisina en la posición +357. El CTLA4Ig se enlaza tanto con las células positivas CD80 y positivas de CD86 más fuertemente que con CD28Ig (Linsley, P., et al., 1994 Immunity 1:793-80). Muchas respuesta inmunes dependientes de células T se ha encontrado que se bloquean por CTLA4 tanto in vitro como in vivo. (Linsley, P., et al., 1991b, supra; Linsley, P., et al., 1992a Science 257:792-795; Linsley, P., et al., 1992b J. Exp. Med. 176:1595-1604; Lenschow, D.J., et al., 1992 Science 257:789-792; Tan P., et al., 1992 J Exp. Med. 177: 165-173; Turka, L.A., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11102-11105).

Para alterar la afinidad de enlace con los ligandos naturales tales como B7 se modificaron moléculas de fusión solubles CTLA4Ig por mutación de los aminoácidos en la porción CTLA4 de las moléculas. Las regiones de CTLA4 que cuando se mutan alteran la afinidad de enlace o la avidez por los ligandos B7 incluyen la región 1 determinante de la complementariedad (CDR-1 como se describe en las Patentes de EUA 6,090,914, 5,773,253, 5,844,95; en el número de serie de

300 302

Solicitud de Patente de EU copendiente 60/214,065; y por Peach et al., 1994. J. Exp. Med., 180:2049-2058) y la región 3 determinante de la complementariedad en regiones tipo (CDR-3) (CDR-3 es la región conservada del dominio extracelular de CTLA4 como se describe en las Patentes de EUA 6,090,914, 5,773,253 y 5,844,095; en el número de serie de la solicitud de patente de EU 60/214,065; y por Peach, R.J., et al J Exp Med 1994 180:2049-2058; la región del tipo CDR-3 abarca la región CDR-3 y se extiende por varios aminoácidos en la dirección S' y/o descendente de la porción CDR-3). La región de CDR-3 incluye una porción hexapéptido MYPPPY (SEQ ID NO: 20) que está altamente conservada en todos los miembros de la familia CD28 y CTLA4. La mutagénesis de barrido de alanina a través de la porción de hexapéptido en CTLA4 y en residuos seleccionados en CD28Ig reduce o elimina el enlace para CD80 (Peach, R.J., et al., J Exp Med 1994 180:2049-2058; Patente de EUA No. 5,434,131; Patente de EUA No. 6,090,914; Patente de EUA No. 5,773,253.

Se hicieron modificaciones adicionales a las moléculas solubles de CTLA4 al intercambiar regiones homologas de CTLA4 y CD28. Estas moléculas mutantes homologas quiméricas CTLA4/CD28 identificaron la porción de hexapéptido MYPPPY común para CTLA4 y CD28, así como ciertos residuos de aminoácidos no conservados en las regiones tipo CDR-1 y CDR-3 de CTL4 como regiones responsables de incrementar la avidez

de enlace de CTLA4 con CD80 (Peach, R. J., et al., 1994 J Exp Med 180:2049-2058).

Las moléculas solubles de CTLA4 tales como CTLA4Ig, moléculas mutantes de CTLA4 o mutantes homólogos quiméricos CTLA4/CD28 como se describe en supra, introducen un nuevo grupo de fármacos terapéuticos para tratar enfermedades cardiovasculares.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, al administrar a un sujeto una molécula que bloquea las interacciones de B7 con CTLA4 y/o CD28, con lo cual se inhiben las moléculas endógenas B7 sobre las células positivas B7 a partir del enlace de CTLA4 y/ó CD28 sobre las células T. Moléculas solubles de CTLA4 usadas en los métodos de la invención incluyen CTLA4Ig y la molécula mutante soluble de CTLA4, L104EA29YIg.

La presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, al administrar a un sujeto moléculas solubles de CTLA4, las cuales se enlazan a moléculas de moléculas B7 sobre células positivas B7, con lo cual se inhiben las moléculas B7 endógenas del enlace de CTLA4 y/o CD28 sobre las células T. Moléculas solubles de CTLA4 usadas en los métodos de la

invención incluyen CTLA4Ig y la molécula mutante soluble de CTLA4, L104EA29YIg.

La presente invención también proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, reducción de los síntomas de) enfermedad cardiovasculares al administrar a un sujeto que padece de los spintomas de enfermedad cardiovascular, moléculas solubles de CTLA4 tales como CTLA4Ig y/o la molécula mutante soluble de CTLA4, L104EA29YIg y/o una mezcla de cualquier molécula soluble de CTLA. CTLA4Ig y la molécula mutante de CTLA4, L104EA29YIg por ejemplo, al comenzar con la metionina en la posición +1 o alanina en la posición -1 y terminando con la lisina en la posición +357, como se muestra en la Figura 19, se prefieren para su uso en los métodos de la invención.

La presente invención, también proporciona una composición farmacéutica para tratamiento cardiovascular, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un agente biológicamente efectivo, tales como moléculas solubles de CTLA4, solas o en conjunto con otros fármacos terapéuticos.

Los kits que comprenden composiciones farmacéuticas terpaúeticas para enfermedad cardiovascular también se abarcan por la invención. En una modalidad, un kit que comprende una o más de las composiciones farmacéuticas de la invención se usa para tratar una enfermedad cardiovascular.

Por ejemplo, la composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de moléculas solubles de CTLA4 que se anlazan a las moléculas B7 sobre células positivas B7, con lo cual se bloquean las moléculas B7 del enlace CTLA4 y/o CD28 sobre las células T. Además, el kit puede contener uno o más agentes terapéuticos usados en conjunto con las composiciones farmacéuticas de la invención.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1A : Datos demográficos de ensayos en pacientes. Los datos demográficos incluyen género, raza y duración de la enfermedad como se describe en el ejemplo 3, *infra*.

Figura 1B: Datos demográficos de ensayos en pacientes. Los datos demográficos incluyen género, edad, peso y actividad de la enfermedad, evaluada por el paciente y por el médico, como se describe en el ejemplo 3, *infra*.

Figura 1C: Datos demográficos de ensayos en pacientes como se describe en el ejemplo 3, *infra*. Los datos demográficos incluyen actividad de la enfermedad, velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR), función física (discapacidad evaluada por un cuestionario de salud), y proteína reactiva C (CRP).

Figura 1D: Datos demográficos de ensayos en pacientes como se describe en el ejemplo 3, *infra*. Los datos demográficos incluyen hinchazón en articulaciones,

sensibilidad en articulaciones, entumecimiento matutino y dolor.

Figura 1E: Datos demográficos de ensayos en pacientes como se describe en el ejemplo 3, *infra*. Los datos demográficos incluyen tratamientos previos.

Figura 2: Resumen de las descontinuaciones en el día 85 por razón como se describe en el ejemplo 3, *infra*.

Figura 3A: Respuestas de ACR en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*: respuestas a ACR 20, 50, y 70.

Figura 3B: Respuestas a ACR-20 en el día 85, incluyendo respuesta al placebo, como se describe en el ejemplo 3, *infra*: respuesta a ACR-20 con 95% de límites de confianza.

Figura 3C: Respuestaa a ACR-20 en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*: Diferencia en la respuesta a ACR-20 con respecto a 95% de intervalos de confianza.

Figura 4A: Respuestas clínicas básicas (mejora del 20%) en conteo de articulaciones hinchadas y sensibles en porcentaje de pacientes en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*: respuesta clínica básica, ACR-20.

Figura 4B: Respuestas clínicas (en porcentaje de mejora) en conteo de articulaciones hinchadas y sensibles en porcentaje de pacientes en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*: cambio en la respuesta clínica en mejora de porcentaje.

Figura 5A: Respuesta al dolor (por la escala de Likert por cambio de unidad media a partir de la línea base) en porcentaje de pacientes en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*: cambios de registro de dolor a partir de la línea base.

Figura 5B: Cambios de enfermedad globales en pacientes (por la escala de Likert por cambio de unidad media a partir de la línea base) en porcentaje de pacientes en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*: cambios globales en la actividad de la enfermedad en pacientes.

Figura 5C: Cambios de enfermedad global por médicos (por la escala de Likert por cambio de unidad media a partir de la línea base) en porcentaje de pacientes en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*: cambios globales en la actividad de la enfermedad por médicos.

Figura 5D: Dolor (por la escala de Likert por cambio de unidad media a partir de la línea base) en porcentaje de pacientes en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*: cambios en el dolor a partir de la línea base.

Figura 6A: Evaluación global de pacientes de cambio en la actividad de la enfermedad a partir de la línea base por un rango de 2 unidades en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*; mejora en la actividad de la enfermedad.

Figura 6B: Evaluación global del médico del cambio en la actividad de la enfermedad a partir de la línea base por un

306 306

rango de 2 unidades en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*; mejora en la actividad de la enfermedad.

Figura 7A: Porcentaje de reducción en los niveles de la proteína reactiva C (CRP) en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*: porcentaje de reducción en niveles de CRP a partir de la línea base.

Figura 7B: Diferencia en la reducción en los niveles de la proteína reactiva C (CRP) en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*: diferencia de reducción e porcentaje en niveles de CRP con 95% de intervalos de confianza.

Figura 7C: Reducción media en los niveles de la proteína reactiva C (CRP) en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*: cambio medio a partir de la línea base.

Figura 8 : Reducción en el cambio medio de los niveles del receptor soluble IL-2 a partir de la línea base en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*.

Figura 9A: El efecto de CTLA4Ig sobre articulaciones sensibles sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*: diferencia mediana a partir de la línea base.

Figura 9B: El efecto de CTLA4Ig sobre articulaciones sensibles sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*: diferencia media a partir de la línea base.

Figura 10A: El efecto de CTLA4Ig sobre articulaciones hinchadas sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*: diferencia mediana a partir de la línea base.

Figura 10B: El efecto de CTLA4Ig sobre articulaciones hinchadas sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*: diferencia media a partir de la línea base.

Figura 11: El efecto de CTLA4Ig sobre la evaluación del dolor diferencia media a partir de la línea base sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*.

Figura 12A: El efecto de CTLA4Ig sobre la evaluación del paciente de la diferencia media de la actividad de la enfermedad a partir de la línea base sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*.

Figura 12B: El efecto de CTLA4Ig sobre la evaluación del médico de la diferencia media de la actividad de la enfermedad a partir de la línea base sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*.

Figura 13A: El efecto de L104EA29YIg sobre articulaciones sensibles sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*: diferencia mediana a partir de la línea base.

Figura 13B: El efecto de L104EA29YIg sobre articulaciones sensibles sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*: cambio medio a partir de la línea base.

Figura 14A: El efecto de L104EA29YIg sobre articulaciones hinchadas sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*: diferencia mediana a partir de la línea base.

Figura 14B: El efecto de L104EA29YIg sobre articulaciones hinchadas sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*: cambio medio a partir de la línea base.

Figura 15: El efecto de L104EA29YIg sobre la evaluación del dolor sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*: cambio medio a partir de la línea base sobre el tiempo.

Figura 16A: El efecto de L104EA29YIg sobre la evaluación del paciente de la diferencia media de la actividad de la enfermedad a partir de la línea base sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*.

Figura 16B: El efecto de L104EA29YIg sobre la evaluación del médico de la diferencia media de la actividad de la enfermedad a partir de la línea base sobre el tiempo como se describe en el ejemplo 3, *infra*.

Figura 17: Porcentaje de mejora en la discapacidad de los pacientes evaluado por el Cuestionario de Evaluación de Salud (HAQ) comparado con la línea base en el día 85 con tratamiento con CTLA4Ig y L104EA29YIg como se describe en el ejemplo 3, *infra*.

Figura 18: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de L104EIg (SEQ ID NOs: 6- 7) como se describe en el ejemplo 1, *infra*.

Figura 19: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de

L104EA29YIg (SEQ ID NOs: 8-9) como se describe en el ejemplo 1, *infra*.

Figura 20: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de L104EA29LIg (SEQ ID NOs: 10-11) como se describe en el ejemplo 1, *infra*.

Figura 21: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de L104EA29TIg (SEQ ID NOs: 12-13) como se describe en el ejemplo 1, *infra*.

Figura 22: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de L104EA29WIg (SEQ ID NOs: 14-15) como se describe en el ejemplo 1, *infra*.

Figura 23: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del receptor CTLA4 (SEQ ID NOs: 16-17).

Figura 24: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de CTLA4Ig (SEQ ID NOs: 18-19).

Figuras 25A-25C: Gel de SDS (FIG. 25A) para CTLA4Ig (pista 1), L104EIg (pista 2), y L104EA29YIg (pista 3A); y cromatográficas de exclusión de tamaño de CTLA4Ig (FIG. 25B) y L104EA29YIg (FIG. 25C).

Figuras 26 (detalles a la izquierda y a la derecha): Un diagrama de cintas del pliegue de tipo "V" de Ig de CTLA4 extracelular, generado a partir de la estructura de la solución determinada por espectroscopia de RMN. FIG. 26 (detalle a la derecha) muestra una vista expandida de la región de CDR-1 (S25-R33) y la región de MYPPPY que indica la

ubicación y la orientación de la cadena lateral de las mutaciones que potencian la avidez, L104 y A29.

Figuras 27A y 27B: Ensayos FACS que muestran el enlace de L104EA29YIg, L104EIg, y CTLA4Ig a células CHO transfectadas con CD80 o CD86 humanas como se describe en el ejemplo 2, *infra*.

Figuras 28A y 28B: Gráficas que muestran inhibición de la proliferación de células CHO positivas a CD80 y positivas a CD86 como se describe en el ejemplo 2, *infra*.

Figuras 29A y 29B: Gráficas que muestran que L104EA29YIg es más efectivo que CTLA4Ig al inhibir la proliferación de células T primarias y secundarias aloestimuladas como se describe en el ejemplo 2, *infra*.

Figuras 30A-30C: Las gráficas que ilustran que L104EA29YIg es más efectivo que CTLA4Ig al inhibir la producción de citocinas IL-2 (FIG. 30A), IL-4 (FIG. 30B), y gamma (γ)-interferón (FIG. 30C) de células T humanas aloestimuladas como se describe en el ejemplo 2, *infra*.

Figura 31 : Un gráfica que demuestra que L104EA29YIg es más efectivo que CTLA4Ig al inhibir la proliferación de células T de mono estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) como se describe en el ejemplo 2, *infra*.

Figura 32: Una gráfica que muestra el análisis de enlace en equilibrio de L104EA29YIg, L104EIg, y CTLA4Ig de tipo silvestre a CD86Ig.

Figuras 33A y 33B: Reducción en los niveles de ICAM-1 soluble y E-selectina soluble, cambio medio a partir de la línea base en el día 85 como se describe en el ejemplo 3, *infra*.

Figura 34: Una gráfica que muestra el resumen de la respuesta de ACR20 por día de visita en respuesta a la terapia de metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg), como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 35: Una gráfica que muestra el resumen de la respuesta de ACR50 por día de visita en respuesta a la terapia de metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg), como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 36: Una gráfica que muestra el resumen de la respuesta de ACR70 por día de visita en respuesta a la terapia de metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg), como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 37: Una gráfica que muestra la media de ACR-N sobre el tiempo en respuesta a la terapia de metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg), como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 38: Una gráfica de barras que muestra la respuesta de ACR en respuesta a la terapia de metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg) el día 180 con un intervalo de confianza de 95%, como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 39: Una gráfica de barras que muestra la proporción de nuevas articulaciones activas en respuesta a la terapia de metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg) el día 180, como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 40: Una gráfica de barras que muestra la respuesta de ACR después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg) el día 180, como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 41: Una gráfica que muestra la mejora en porcentaje en articulaciones sensibles después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg)-mejora media en porcentaje a partir de la línea base, como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 42: Una gráfica que muestra la mejora en porcentaje en articulaciones hinchadas después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg)-mejora media en porcentaje a partir de la línea base, como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 43: Una gráfica que muestra la mejora en porcentaje en el dolor, después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg) -mejora media en porcentaje a partir de la línea base, como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 44: Una gráfica que muestra la mejora en porcentaje respecto a la actividad de la enfermedad como se

315

reporta por el sujeto después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg) -mejora media en porcentaje a partir de la línea base, como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 45: Una gráfica que muestra la mejora en porcentaje respecto a la actividad de la enfermedad como se reporta por el médico después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg) -mejora media en porcentaje a partir de la línea base, como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 46: Una gráfica que muestra la mejora en porcentaje respecto a la función física después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg) -mejora media en porcentaje a partir de la línea base cuando se mide por HAQ, como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 47: Una gráfica que muestra la mejora en porcentaje en niveles de la función de CRP después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg) -mejora media en porcentaje a partir de la línea base, como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 48: Una gráfica que muestra la mejora en porcentaje en niveles de la función de CRP después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg) -mejora mediana en porcentaje a partir de la línea base, como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

316
774

Figura 49: Una gráfica que muestra la diferencia en la velocidad de respuesta de ACR el día 180 en dos grupos después de la terapia con CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg) en comparación con el grupos tratado con metotrexato (MTX) solamente (95% de límites de confianza), como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 50: Una gráfica que muestra el cambio a partir de la línea base para el Componente de Salud Física SF-36 el día 180, en dos grupos después de la terapia con CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg) comparado con un grupo tratado con metotrexato solamente (95% de límite de confianza), como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 51 : Una gráfica que muestra el cambio a partir de la línea base para el Componente de Salud Mental SF-36 el día 180, en dos grupos después de la terapia con CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg) comparado con un grupo tratado con metotrexato solamente (95% de límite de confianza), como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 52: Una gráfica de barras que muestra los niveles de CRP en el día 180 después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg), como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 53: Una gráfica de barras que muestra niveles del factor reumatoide el día 180 después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg), como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 54: Una gráfica de barras que muestra los niveles de IL-2r el día 180 después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg), como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 55: Una gráfica de barras que muestra niveles de IL-6 el día 180 después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg), como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 56: Una gráfica de barras que muestra niveles de TNFα el día 180 después de la terapia con metotrexato solo o metotrexato y CTLA4Ig (2 y 10 mg/kg), como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 57: Una tabla de la dosis de metotrexato univariada en la selección/enrolamiento para el grupo de tratamiento tratado con BMS 10 con CTLA4Ig a 10 mg/kg de peso corporal como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 58: Una tabla de la dosis de metotrexato univariada en la selección/enrolamiento para el grupo de tratamiento tratado con BMS 2 con CTLA4Ig a 2 mg/kg de peso corporal como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 59: Una tabla de la dosis de metotrexato univariada en la selección/enrolamiento para el grupo de placebo, como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 60: Una tabla de la dosis de metotrexato univariada hasta e incluso el día 180 del estudio para el grupo de

318 316

tratamiento tratado con BMS 10 con CTLA4Ig a 10 mg/kg de peso corporal como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 61: Una tabla de la dosis de metotrexato univariada hasta e incluso el día 180 del estudio para el grupo de tratamiento tratado con BMS 2 con CTLA4Ig a 2 mg/kg de peso corporal como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 62: Una tabla de la dosis de metotrexato univariada hasta e incluso el día 180 del estudio para el grupo con placebo, como se describe en el ejemplo 5, *infra*.

Figura 63: Una gráfica de barras que muestra la diferencia en las velocidades de respuesta modificadas de ACR el día 180 en dos grupos después de la terapia con etanercept solo (25 mg dos veces por semana) o en combinación con CTLA4Ig (2mg/kg), como se describe en el ejemplo 6, *infra*.

Figuras 64A-64C: Gráficas que muestran la mejora en porcentaje de los componentes individuales de los criterios modificados de ACR cuando se evalúan en cada día de visita después de la terapia con etanercept solo (25 mg dos veces por semana) o en combinación con CTLA4Ig (2 mg/kg) como se describe en el ejemplo 6, *infra*. A. Conteo de Articulación Sensible. B. Conteo de Articulación Hinchada. C. Evaluación del Dolor.

Figura 65A. Una gráfica que muestra el cambio a partir de la línea base para el Componente de Salud Física SF-36 el día 180, en dos grupos después de la terapia con etanercept

(25 mg cada dos semanas) solo o en combinación con CTLA4Ig (2 mg/kg) (95% Límites de confianza), como se describe en el ejemplo 6, *infra*. Fig. 65B. Una gráfica que muestra el cambio a partir de la línea base para el Componente de Salud Mental SF-36 el día 180, en dos grupos después de la terapia con etanercept (25 mg cada dos semanas) solo o en combinación con CTLA4Ig (2 mg/kg) (95% Límites de confianza), como se describe en el ejemplo 6, *infra*.

Figura 66: Secuencia de nucleótidos de un CTLA4Ig que codifica un péptido de señal; una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre del dominio extracelular de CTLA4 partiendo en metionina en la posición +1 a ácido aspártico en la posición +124, o partiendo en alanina en la posición-1 a ácido aspártico en la posición +124 ; y una región Ig (SEQ ID NO.:21).

Figura 67: Secuencia de aminoácidos de un CTLA4Ig que tiene un péptido de señal; una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre del dominio extracelular de CTLA4 partiendo en metionina en la posición +1 a ácido aspártico en la posición +124, o comenzando en alanina en la posición-1 a ácido aspártico en la posición +124 ; y una región Ig (SEQ ID NO.: 22).

Figura 68: Un diagrama esquemático que muestra la disposición de los sujetos en tres ensayos como se describe en el ejemplo 7, *infra*.

320

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*.

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*.

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*.

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*.

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*.

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

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 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 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 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 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 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 76A: Una gráfica que muestra la Frecuencia de nuevas articulaciones sensibles por sujeto en 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*.

Figura 76B: Una gráfica que muestra la Frecuencia de nuevas articulaciones sensibles por sujeto en 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 77A: Una gráfica que muestra la Frecuencia de nuevas articulaciones hinchadas por sujeto en 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*.

Figura 77B: Una gráfica que muestra la Frecuencia de nuevas articulaciones hinchadas por sujeto en 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 78: Una gráfica que muestra la proporción de nuevas articulaciones activas en 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*.

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*.

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 TNFα 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 87: Porcentaje de células T activadas en especimenes de aterectomía.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

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 los significados especificados.

Como se usa en la presente, "ligando" se refiere a un 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 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 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 de longitud completa que se presenta naturalmente como se

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 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 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 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 inmaduro, el cual incluye un péptido de señal en el extremo de la terminal N. El polipéptido inmaduro se somete a un procesamiento post-traduccional el cual incluye el desdoblamiento y remoción del péptido de señal para generar un producto de desdoblamiento CTLA4 que tenga un extremo en la terminal N recientemente generado que difiera

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 amincácidos 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

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 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 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 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 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 inmunoglobulina que abarcan el ácido glutámico en la posición

+126 a través de la lisina en la posición +327 (el ADN que codifica CTLA4Ig se depositó el 31 de Mayo de 1991, con l 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

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 un 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

como IgCγ1 (IgCgamma), IgCγ2 (IgCgamma2), IgCγ3 (IgCgamma3), IgCγ4 (IgCgamma4), IgCμ(IgCmu), IgCα1 (IgCalfa1), IgCα2 (IgCalfa2), IgCδ(IgCdelta) o IgCεIgCepsilon), haciendo la molécula de fusión soluble, o fragmentos y derivados del 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 anfígeno p97 asociado con el melanoma (CTLA4-p97) o la 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. 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 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 métodos de la invención pueden o no incluir una secuencia de

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

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

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

Aminoácido	Símbolo	Símbolo de 1 letra	Codones
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
Glutamina	Gln	Q	CAA, CAG
Arginina	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Serina	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
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.

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 de una molécula de CTLA4 puede alterar la solubilidad o

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 Natura 366:7679 incorporada en la presente como referencia en su totalidad) que pueden reconocer y enlazar a CTAL4 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

número de serie EUA 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, sobreregular, 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

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/0 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 moleculas 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

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 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 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 Martin (Martin et al., 1984. J. Clin. Immun., 4(1):18-22)). También se incluyen moléculas 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 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 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 miocardial; angina; tolerancia al ejercicio reducido; disnea en ejercicio; disnea nocturna paroxismal, claudicación; ataques isquémicos pasajeros y calidad de vida.

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. 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 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 trastornos 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; ateroesclerosis; 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 ateroesclerosis, cirugía o complicaciones quirúrgicas, inmovilización prolongada, fibrilación arterial, trombofilia congénita, cáncer, diabetes, efectos de medicamentos u hormonas, y complicaciones de embarazo; arritmias cardiacas 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, Eugene Braunwald, Douglas P. Zipes, Meter Lobby, Douglas D. Zipes.

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

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 miocardio; infarto al miocardio agudo (AMI); que incluye infarto al miocardio primero o recurrente; infarto al miocardic 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: ateroesclerosis; 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; 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 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 molécula de ácido nucleico dentro de una célula se puede

343

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 ad Expression: A Laboratory Manual (W. H. Freeman and Co, New York, N. Y. 1993) y Wu, Methods en 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

métodos usados para transferir in vivo incluyen encapsulación del ácido nucleico 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), 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 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 miocardial; angina; tolerancia al ejercicio reducido; fatiga; disnea en 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.

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 molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/o CD28.

345

Por ejemplo, los ligándos 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 L104EA29WIg), 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 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 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 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 parcial o completa.

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

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.

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

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; ateroesclerosis; 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

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

RM 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 celulares y bioquímicas entre pacientes con artritis reumatoide (RA) y ateroesclerosis/angina inestable; (2) el mecanismo de acción de CTLA4Ig y L104EA29YIg aparentemente adecuado para la invención en enfermedades cardiovasculares; (3) efectos antiinflamatorios de CTLA4Ig y/o L104EA29YIg en modelos animales y estudios clínicos presentados aquí; (4) recientemente reportado el hallazgo en la importancia de interacción B7-CD28 en ateroesclerosis. Muchos de estos datos existen en estudios preclínicos diferentes (modelos celulares y animales), además en estudios clínicos presentados aquí, y se resumen a continuación.

(1) Semejanzas celulares y bioquímicas entre pacientes con artritis reumatoide y ateroesclerosis/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 Rheumatology 199; 16:2562-2571; Rheumatology 1999;38:668-674).

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		

	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

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.

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

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 ateroesclerosis para ruptura de placa aguda. Las células T están entre las células más comunes presentes en lesiones ateroescleróticas 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).

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); TNFα, e interlukin-2 (IL-2) (Refs: Ateroesclerosis 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

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

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 especimenes de aterectomía que las células T están activadas como evidenciado por la expresión del receptor IL-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 ateroctomía. La Figura 87 muestra el porcentaje de células T activadas en especimenes de aterectomía.

El HSP60 u otros antígenos novedosos pueden promover directamente inflamación cardiovascular

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

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 ateroesclerosis 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).

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.

	OR No Ajustado (95% CI)	OR Ajustado (95% CI)
CRP-		
Cp-	1	1
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-		
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)
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

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. 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 riego antigénico novedoso para la 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 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 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 sujetos con UA, y 40 sujetos con AMI (Tabla 3).

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)
Seropositividad Cp	30%	60%	68%	65%
Seropositividad HSP60	0%	20%	98%	99%
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 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 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 aumentado de muerte coronaria o MI no fatal basado en

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

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 metaloproteinasa de matriz y las células de endotelio activo y músculo liso (Ref: Circulation

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 ó L104EA29YIg. Por ejemplo, la evidencia

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

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 ateroesclerótica. 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 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.

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 CD4+T, macrófagos, y células de histocompatiblidad mayor II

(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, TGFβ). 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

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 ateroesclerosis o UA tienen un sinnúmero de semejanzas bioquímicas, celulares y antigénicas (ver anteriomente, 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 cratamiento 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 ateroesclerosis

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

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 ateroesclerosis acelerada cuando se alimentaron de una dieta rica en colesterol. En este estudio, los ratones $Ldlr^{-/-}$ fueron cruzados con ratones $B7\text{-}1^{-/-}B7\text{-}2^{-/-}$ y la progenie fue luego intercruzada para generar una línea $B7\text{-}1^{-/-}B7\text{-}2^{-/-}$ $Ldlr^{-/-}$ mutante de compuesto que carece completamente de CD80 y CD86. Este modelo único permitido para investigación del papel de las interacciones de B7-CD28 en un modelo animal propenso a desarrollar ateroesclerosis. Como se esperaba, cuando estos animales fueron alimentado con una dieta rica en colesterol, ambos ratones los $Ldlr^{-/-}$ y los $B7\text{-}1^{-/-}B7\text{-}2^{-/-}$ $Ldlr^{-/-}$ tuvieron colesterol significativamente 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 $B7\text{-}1^{-/-}B7\text{-}2^{-/-}$ $Ldlr^{-/-}$ alimentados con una dieta rica en colesterol. Las lesiones ateroescleróticas 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 ateroesclerosis mínima en ratones $Ldlr^{-/-}$ que recibieron la dieta de control. Los ratones $Ldlr^{-/-}$ que

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

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 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 ateroesclerosis, las células T de ratones Ldlr$^{-/-}$ se cebaron para responder al

mismo 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 apolioproteína E ($ApoE^{-/-}$). Los ratones $ApoE^{-/-}$ desarrollan ateroesclerosis 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 pantente prioritaria. Primero, la idea de que las células T están presentes en ateroma y están activadas in situ se fortaleció mediante el hallazgo de colocalización de CD80 y CD86 dentro de ambos ateromas el temprano y el avanzado. Segundo, los datos obtenidos de los ratones $B7\text{-}1^{-/-}$ $B7\text{-}2^{-/-}Ldlr^{-/-}$ demuestran clara y elegantemente que la interrupción de la señalización de B7-CD28 influye en el desarrollo y progreso de la enfermedad ateroesclerótica en un modelo bien aceptado de ateroesclerosis. Finalmente, la

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

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 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 eliminación del segmento de transmembrana CTLA4 (Oaks, M. K. y colaboradores, 2000 Cellular Immunclogy 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 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 IgCγ1 (IgCgama1), IgCγ2 (IgCgama2), IgCγ3 (IgCgama3), IgCγ4 (IgCgama4), IgCμ (IgCmu), IgCα1 (IgCalfa1), IgCδ (IgCdelta) o IgCε (IgCepsilon).

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 Cγ1 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 mediad 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

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 extreo 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.

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 IgCγ1) fusionadas a los fragmentos de CTLA4 mutados.

En una modalidad, las moléculas mutantes CTLA4 solubles comprenden IgCγ1 (IgCgama1) 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

375

Además, la invención proporciona moléculas mutantes que tienen el dominio extracelular de CTLA4 con dos mutaciones, fusionadas a una porción IgCγ1 (IgCgamma1). 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
L104EG105FIg	Fenilalanina TTC
L104EG105WIg	Triptofano TGG
L104EG105LIg	Leucina CTT
L104ES25RIg	Arginina CGG
L104ET30GIg	Glicina GGG
L104ET30NIg	Asparagina AAT
L104EA29YIg	Tirosina TAT
L104EA29LIg	Leucina TTG
L104EA29TIg	Treonina ACT
L104EA29WIg	Triptofano TGG

Todavía más, la invención proporciona moléculas que tienen el dominio extracelular de CTLA4 que comprenden tres mutaciones, fusionadas a una porción IgCγ1 (IgCgamma1). 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:

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

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

La presente invención proporciona moléculas mutantes 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 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 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 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 posición +126 a través de la lisina en la posición +357. La

+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. 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 dominio extracelular de CTLA4, tal como L104EG105FIg, L104EG105WIg y L104EG105LIg, 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 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 +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 oposición +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 +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 asparigina, 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,

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 +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 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 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).

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 ejemplo, ADNc) o un híbrido del mismo. Por ejemplo, una

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 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 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 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 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 forma dependiente de un par base (Zamecnik, P., C. , et al. ,

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 residuo de aminoácidos tales como lisina y un grupo amino. Estas pequeñas moléculas, también designadas agentes antigen, 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: 53-63). 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 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 and Perspectives iM 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, cósmidos y fagémidos. En una modalidad, el vector puede ser

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

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 CTLA4 soluble. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. En casos en dónde 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 control traduccional adicionales. Sin embargo, en casos dónde 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 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 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 eucarióticas incluyen elementos de control de expresión,

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, Fritch, 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

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 hibridos 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

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 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 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 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 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.

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, Fritch, 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-

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

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

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.

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 IIIa, agentes trombolíticos o fibrinolíticos, agentes anti-arrítmicos, 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 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 anti-osteoporosis, terapias de reemplazo de hormonas,

394

anticonceptivos orales, agentes anti-obesidad, agentes antiansiolíticos, agentes anti-proliferativos, agentes anti-tumor, anti-úlcera y agentes de la enfermedad de reflujo gastroesofagal, hormona de crecimiento y/o secretagogos de la 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 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 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 agregación, adherencia o secreción granular de plaquetas. Agentes incluyen, pero no se limitan a, varios fármacos conocidos no esteroidales antiinflamatorios (NSAIDS) tales como aspirina, ibuprofen, naproxeno, sulindac, indometacina, mefenamato, droxicam, diclofenaco, sulfinpirazona, piroxicam, y sales farmacéuticamente aceptables o profármacos de los

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), antagonistas del tromboxano-A2-receptor (por ejemplo, ifetroban), inhibidores de tromboxano-A2-sintetasa, inhibidores PDE-III (por ejemplo, dipiridamol), 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 P_2Y_1 y P_2Y_{12}, con P_2Y_{12} que se prefiere más. Los antagonistas del receptor P_2Y_{12} preferidos incluyen 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 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 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 isotiouronio 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, inactivadotes de los

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 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 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: 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 ditiazem y verapamil); abridores del canal K^+ tales como los inhibidores IAch, e inhibidores I_{Kur} (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, bloqueadores beta adrenérgicos, bloqueadores del canal de

calcio (por ejemplo, diltiazem, verapamil, nifedipina, amlodipina y mibefradil); diuréticos (por ejemplo, clorotiazida, clorhidrotiazida, flumetiazida, hidroflumetiazida, bendroflumetiazida, metilclorotiazida, triclorometiazida, politiazida, benztiazida, tricrinafen del ácido etacrínico, clortalidona, furosemida, musolimina, bumetanida, triamtreneno, amilorido, espironolactona); inhibidores de renina, inhibidores de ACE (por ejemplo, captopril, zofenopril, fosinopril, enalapril, ceranopril, 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 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).

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.

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); insulinas (que incluyen secretagogues 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, 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), einhibidores de 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 usarse en combinación con los compuestos de la presente

JU4 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); inhibidores de la ciclooxigenasa (que incluyen NSAIDs, y COX-1 y/o inhibidores de COX-2); aspirina; indometacina; ibuprofen; prioxicam; naproxeno; celecoxib y/o rofecoxib.

Ejemplos de agentes anti-osteoporosis adecuados para usarse en combinación con los compuestos de la presente 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.

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 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

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, epitilonas, cisplatina y carboplatina.

Ejemplos de agentes de enfermedades de reflujo gastroesofageal y anti-úlcera 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

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.

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 (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 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 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 síntomas. Anakinra, una proteína recombinante que bloquea la

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

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

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: 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, 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, 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 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 anticuerpos para CD40 y anticuerpos para CD40-L.

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 sinergística). 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 sinergística 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

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

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 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 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 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 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.

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 substancias 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, substancias 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

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 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 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 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 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 dextrosa. Este puede incluir otros materiales deseables desde

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 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 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), 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 esteroidal), agentes anti-osteoporosis, terapias de reemplazo de hormonas, contraceptivos orales, agentes anti-obesidad, agentes anti-ansiedad, agentes anti-proliferativos, agentes anti-tumor, agentes anti-úlcera y agentes de la enfermedad de reflujo gastroesofageal, hormona del crecimiento y secretagogues de la hormona de crecimiento, imitaciones tiroideas (que

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

El kit comprende un recipiente con una etiqueta y/o 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 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 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 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 con instrucciones de uso.

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

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, 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

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

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

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; ateroesclerosis; 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 ateroesclerosis, cirugía o complicaciones quirúrgicas, inmovilización prolongada, fibrilación arterial, trombofilia congénita, cáncer, diabetes, efectos de medicamentos u

hormonas, y complicaciones de embarazo; arritmias cardiacas 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, Eugene Braunwald, Douglas P. Zipes, Meter Lobby, Douglas D. Zipes.

Las enfermedades cardiovasculares preferidas son: ateroesclerosis; enfermedad coronaria del corazón (CHD); 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 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.

Las enfermedades cardiovasculares más preferidas son: ateroesclerosis; 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;

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 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 (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, 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 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 inhibidoras in vivo. Bajo condiciones en donde las interacciones de células positivas B7/células T por ejemplo, las interacciones de células B/ y células T se

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

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 lo 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

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.

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 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 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 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 de cada sujeto y el modo de administración. Las moléculas

427

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

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.

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 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.

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 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 en un vector diseñado para expresar las secuencias externas

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, 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 (penicilinasa) y lactosa (lac) (Chang, et al., (1977) Nature 198: 1056), el sistema promotor del triptofano (trp) (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 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 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 $CaCl_2$ (Cohen, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110, y Sambrook et al.

430

(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. 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 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 cellular Tet-On CHO-K1 (Clontech), CHO designada ECACC 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, 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 vector diseñado para expresar las secuencias extranjeras en

431

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 πLN). 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 polioma, 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 hospdadoras de mamíferos (por ejemplo BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Techonologies); vectores pVPakc, vectores pCMV, vectores pSG5 (Stratagene)),

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 2μ, 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, Stinchcfomb 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

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 T_i, 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

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

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

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 el las figuras 19-22) que se expresaron como proteínas y probaron para cinética de enlaces. Las secuencias mutantes CTLA4 de sitio doble incluyen: 1104E29Yig, L104EA29LIg, L104EA29TIg, y L104EA29WIg. Los mutantes de sitio triple también se generaron.

Construcción de CTLAA4Ig

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

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

cebador inverso. El producto de la reacción por PCR se digiere con Hind III/Xband III y Bcl I y se liga junto con un ADNc desdoblado por Bcl 1/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 πLN).

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 teñían 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

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 Ángstrom) 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

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 valuar 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 tinina 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/Xbal y se subclonaron en un corte similarmente CTLA4Ig (como se incluye

441

en la figura 24) vector de expresión πLN. 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 Nhel silente 5' a este rizo, por una mutagénesis dirigida al cebador PCR. Se digirieron los productos por PCR con Nhel/Xbal y se subclonaron en vectores de expresión CTLA4Ig ó 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 CTLA4de sito 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

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 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 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 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 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 métodos de separación por exclusión usados para identificar

443

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.

Los estudios actuales de CTLAIg 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 CTLAIg y cualquier anticuerpo monoclonal específico para CD80 o CD86 que mide la inhibición de la proliferación de células T, indica que el anticuerpo monoclonal CD80 no aumenta la inhibición de CTLAIg. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal CD86 aumenta la inhibición lo que indica que CTLAIg no fue tan efectivo en bloquear las interacciones CD86. Estos datos apoyan hallazgos previos por Linsley et al. (Immunity, (1994), 1:973-801) que muestran la inhibición de las respuestas celulares mediadas por CD80 que requirieron aproximadamente concentraciones de CTLAIg 100 veces inferiores que para las respuestas medidas por CD86. con base en estos hallazgos, se conjetura que las moléculas 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 CTLAIg.

Hasta este punto, las moléculas mutantes CTLA4 solubles 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 avidez 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 iondependiente 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
445

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 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 J. Biol. Chem. 271:26762-26771), y se identificaron las moléculas mutantes con relaciones de apagado más lentas que aquellas obsèrvadas 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 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 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, $A+B \leftrightarrow AB$), y las constantes de asociación en equilibrio ($Kd=[A]\bullet[B]\backslash[AB]$) se calcularon a partir de la ecuación $R=R_{max}\bullet C/(K_d+C)$. 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 $R=R_{max1}\bullet C\backslash(K_{d1}+C)+R_{max2}\bullet C\backslash(K_{d2}+C)$.

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

447

estadisticamente 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 ($p<0.1$).

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 interacciones de sitio sencillo, los valores K_{on} se calcularon de acuerdo con la ecuación $R_1=R_{eq}(1-exp^{-ks(t-t)}0)$, 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 $K_s=dR/dt=K_{on}*CK_{off}$, en donde C es una concentración 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 $R_t=R_{eq1}(1-exp^{-ks1(t-t}0)+R_{eq2}(1-exp^{ks2(t-t}0)$. Para cada modelo, los valores de K_{on} se determinaron a partir de la pendiente calculada (hasta alrededor de un 70% de asociación maxima) 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 (AiBj=Ai+Bj), y las constantes de velocidad (K_{off}) se calcularon de las curvas de mejor ajuste. El modelo de

448

sitio de enlace se usó, excepto cuando los residuos fueron mayores que el respaldo de la máquina (2-10RU, de acuerdo con la maquina), 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 x 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 fluoresceina (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 tiñeron los

449

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% NAN_3 a una relación de flujo de 1.0 ml/min.

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 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) correspondio con los últimos siete aminoácidos (esto es, los aminoácidos 118-124) en el dominio extracelular de CTLA4, y contenia 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 34-36) de cebador reverso mostrado arriba se reemplaza con una

450
SH4

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. 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 πLN (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ). L104EA29YX$_{C120S}$ se preparó en una forma idéntica. Cada constructo se verificó por la formación de secuencias de ADN.

Identificación y caracterización bioquímica de los mutantes de alta avidez

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

451

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 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 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 avidez global para CD86Ig que fue aparentemente similar a aquella que se observa con el CTLA4Ig de tipo silvestre. Además, la 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 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 codificaba una mutación de leucina a ácido glutámico (L104E).

452
HD

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 triptofano (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) tuvó aparentemente la misma mobilidad

453
477

que el CTLA4Ig (FIG. 25B) dimérico. Los picos principales representan un dímero de proteínas mientras que el pico menor de elusión más rapida 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.

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.

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 avidez 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 avidez de L104EA29YIg para CD86Ig y CD80Ig se debia a las mutaciones que afectan la forma en que cada monómero asociado como un dimero, o si hubieron cambios estructurales que mejoren la avidez 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 dimeros 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 avidez (Greene et al., (1996) J. Biol. Chem., 271:26762-26771).

L104EA29YX$_{C120S}$ enlazado con una afinidad aproximadamente 2 veces superior que CTLA4X$_{C120S}$ 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 avidez 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 avidez

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

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 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.

Las consecuencias estructurales de las dos mutantes que potencian la avidez 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 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 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 que la cadena lateral de ácido glutámico resalta sobre la

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.

Enlace de los mutantes de alta avidez 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 L104EIg, y luego se lavaron. La proteína de fusión de inmunoglobulina enlazada se detectó usando una inmunoglobulina antihumana de cabra conjugada con isotiocianato de fluoresceina.

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), 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 fluoresceina. Al enlazar un total de 5000 células viables se analizaron (determinación sencilla) en un FACScan, y se determinó la intensidad de fluorescencia media (MFI) a partir

458

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 x 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

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 $3.0x10^4$/pozo y PM a $8.0x10^3$/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

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 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 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 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; $3.5x10^4$/pozo de cada mono) a partir de 2 monos se purificación sobre un medio de separación con linfocitos (LSM) y se mezclaron con 2 µg/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 células T de mono mejor que CTLA4Ig.

461

TABLA I

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

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±0.29	2.21±0.18	6.51±1.08
CD80Ig	L104EIg	3.02±0.05	1.35±0.08	4.47±0.36
CD80Ig	L104EA29YIg	2.96±0.20	1.08±0.05	3.66±0.41
CD80Ig	$CTLA4X_{C120S}$	12.0±1.0	230±10	195±25
CD80Ig	$L104EA29YX_{C120S}$	8.3±0.26	71±5	85.0±2.5
CD86Ig	CTLA4IG	5.95±0.57	8.16±0.52	13.9±2.27
CD86Ig	L104EIg	7.03±0.22	4.26±0.11	6.06±0.05
CD86Ig	L104EA29YIg	6.42±0.40	2.06±0.03	3.21±0.23
CD86Ig	$CTLA4X_{C120S}$	16.5±0.5	840±55	511±17
CD86Ig	$L104EA29YX_{C120S}$	11.4±1.6	300±10	267±29

462

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

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 68629. 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 substituto 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.

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 esteroidales estables (NSAIDS) o esteroides (≤ 10 mg/día).y se prohibió un DMARDS 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

potenciales que podían 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 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 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 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).

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 coincide con el placebo.

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.

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.

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: 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 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).

Los estudios de respuesta clínica se basaron en los

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). 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 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-2sRα, sICAM-1, sE-selecina y MMP-3. Se evaluaron los TNFα y IL-6 a una infusión previa y posterior a 2 horas, si es necesario.

Se midieron los IL-2sRα, 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.

MMP-3 se midió usando un kit EIA colorimetrico 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%. De acuerdo con el fabricante del kit, los valores normales en suero estuvieron en el intervalo de 28-99 ng/ml.

IL-6 y TNFα 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.

467 469

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

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 descontinuó 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 descontinuó el tratamiento debido a aparición de artritis. Los pacientes tratados con CTLA4Ig descontinuaron el tratamiento menos con dosis creciente. Muy pocos pacientes tratados con L104EA29YIg descontinuaron 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 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, 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 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 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 menos 2 unidades, resultantes del tratamiento con CTLA4Ig,

477 473

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

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

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

(Cuestionario de Evaluación de la Salud (HAQ); Fries, 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

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 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 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 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 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. T., et al., 1985 Arthritis and Rheumatism 28:1326-

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 articulaciones siendo más estrecho y/o la prevención de nuevas erosiones.

EJEMPLO 5

Estudio para evaluar la seguridad y eficacia clínica de 2 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 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 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, hidroxicloroquina, sulfasalasina) usados para tratar RA. Se puede observar el

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 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 descontinuar el tratamiento.

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 del riesgo de una toxicidad aumentada. Alternativamente, el co-tratamiento con metotrexato y un bloqueadro 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 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 buen perfil de tolerancia. También se ha confirmado que

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.

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.

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 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 farmacocinética de 2 dosis de CTLA4Ig: 2 o 10 mg/kg. Un total de aproximadamente 330 sujetos con RA activa y que recibian 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 (N= 110) a quien se le dieron infusiones mensuales por

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 le 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.

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 esteroidales (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 ccntrola adecuadamente por

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

Criterios para evaluación

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 de cuentas de articulaciones sensibles e hinchadas y una

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.

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

(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

Resultados

Características de línea base de demografía

TABLA III

Disposición del sujeto y demografía

	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%)
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%)
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)

	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 ± SD	9.7 ± 9.8	9.7 ± 8.1	8.9 ± 8.3

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 ± 9.8, 9.7 ± 8.1, y 8.9 ± 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).

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

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.

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

TABLA IV

Características clínicas de línea base

	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

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

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 ± 12.2 y 21.3 ± 8.4, respectivamente. El número medio de articulaciones sensibles y articulaciones hinchadas en el

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 todas la otras evaluaciones clínicas fueron similares entre todos los grupos de tratamiento (Tabla IV):

Respuestas ACR y componentes del núcleo

TABLA V

Respuesta ACR a los 6 meses

	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	-

	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

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 metatrexato solo o en combinación con CTLA4Ig (administrado a 2 ó 0 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)

Componentes del núcleo	Metotrexato+ CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	Metotrexato+ CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	Metotrexato+ Placebo (n = 119)
Articulaciones sensibles	59.9%	43.3%	32.1%
Articulaciones hinchadas	54.9%	45.1%	33.4%
Dolor	46.4%	22.7%	8.4%
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%

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 es 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

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

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 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 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 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 muestran una tendencia clara de respuesta a la dosis después de 6

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.

Farmacocinética

Valores de parámetros farmacocinéticos

	CMAX (µG/ML)	TMAX (H)	AUC(TAU) (µG.H/ML)	T-MEDIA (Días)	CLT (ML/H/KG)	VSS (L/KG)
2 mg/kg						
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						
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

*Mediana (mínimo, máximo)

14795

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 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.

Farmacodinámica

TABLA VII

Valores de línea base media para los biomarcadores farmacodinámicos

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
TNFα (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

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 TNFα en suero no fueron concluyentes. El grupo de 2 mg/kg incremento y el grupo de 10 mg/kg diminuyo con relación al grupo de control (Ver Figura 56).

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.

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

Inmunogenicidad

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 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 mgkg/ que en el grupo de 2 mg/kg. CTLA4Ig a dosis de 10 mg/kg demostró mejoras clínicas y estadísticamente importantes en todos los 8 dominios del SF-36. Todos los biomarcadores farmacodinámicos ensayados parecieron disminuir en proporción al nivel de dosis de CTLA4Ig excepto para TNFα. CTLA4Ig fue seguro y bien tolerado en sujetos con artritis reumatoide que reciben metotrexato. El perfil del evento advero para ambas 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 artritis reumatoide activa

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 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 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 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. 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 etanercept (n = 47).

1076 - 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.

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 coloco en infusión intravenosa por aproximadamente 30 minutos.

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 sal etanercept. Corticosteriodes estables de baja dosis (a 10 mg diario o menor) y/o fármaco anti-inflamatorio no esteroidal estable (NSAID), incuyendo 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 controlo adecuadamente por la 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 datos referentes a la proporción de sujetos que reúnen los

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

Métodos estadísticos

El tratamiento de un grupo de pacientes con CTLA4Ig 2mg/kg en combinación con etanercept se comparo con un grupo de control 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 seria de 35% en el grupo de control. Esta en la proporción de respuesta esperada entre sujetos que no respondieron adecuadamente a la terapia de

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 2, con base en la prueba chi-cuadrada sin ajuste para corrección de continuidad).

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

Características de demografía y de línea base

TABLA 1

Disposición del sujeto en el día 180

	CTLA4Ig + etancerpt	Placebo + etancerpt	TOTAL
Aleatorio*	85	36	121
Terminado	68 (80%)	22 (61%)	90 (74%)
Descontinuado	17 (20%)	14 (39%)	31 (26%)
Eventos advêrsos	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%)

* Excluye a un sujeto que no recibió tratamiento

Después de... seis meses, la proporción de descontinuaciones 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 descontinuación 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 Clinicas y Demográficas de la línea Base Media

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

	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).

Respuestas ACR y componentes del núcleo

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

305

TABLA 3

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

	ACR 20	ACR 50	ACR 70
CTLA4Ig + etanercept***	48.2%	25.9%	10.6%
Dif. del placebo + etanercept	20.5%	6.4%	10.6%
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 + 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 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 con el grupo de placebo más etanercept (Tabla 4).

506

TABLA 4

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

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)
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)
Evaluación Física del medico	43% (4.3)	27% (5.8)

Calidad de vida

En comparación con la línea base, los sujetos en el grupo de CTLA4Ig más etanecerpt demostraron mejoras estadisticamente 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 etanecerpt. Los cambios absolutos en la sub-escala de HRQOL se consideraron clínicamente significativos.

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

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 esquelético, nausea/vomito, hipertensión y diarrea sucedieron a una velocidad superior en el grupo de CTLA4Ig más etanecerpt comparado con el grupo placebo más etanecerpt. Las anormalidades de los senos nasales y el salpullido fueron ligeramente mayores en el grupo de CTLA4Ig más etanecerpt también.

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

Dos sujetos que recibieron CTLA4Ig y etanecerpt tuvieron una malignidad dermatológica. Un sujeto tuvó un carcinoma de célula basal que se extirpo después de la visita en el día 150. El otro sujeto tuvo un carcinoma de célula escamosa que fue una lesión pre-existente que el sujeto decidio 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.

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

Inmunogenicidad

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

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

509

TABLA 5

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

	CTLA4Ig + Etanecerpt[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

[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 etanercpt (Ejemplo 6) los criterios para evaluación fueron el ACR modificado que excluye CRP.

Conclusión

La evaluación preliminar del estudio a los seis meses encontró que CTLA4Ig (2 mg/kg) en combinación con etanercept redujo los signos y sintomas de la artritis reumatoide en comparación con el etanercept solamente. Los incrementos en los ensayos ACR20 y ACR 70 modificados fueron estadisticamente 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 via 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

30 of 511

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.

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 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 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.

Los sujetos con RA activa, a pesar del tratamiento con MTX y que cumplen los criterios de inclusión/exclusión para este estudios 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 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 tratamiento:

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

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

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.

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 cardiaco, temperatura corporal) desde el inicio de cada infusión (previo a la

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)

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. 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

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

bitartrato de oxicodona, etc), o tramadol: Para sujetos que experimentan dolor no controlado adecuadamente por la línea base o medicamento del estudio (excepto para 12 horas antes de la evaluación de articulación).

La Tabla 1 es un programa de procedimientos y evaluaciones de estudio.

TABLA 1

Programa de Procedimientos y Evaluaciones de Estudio

Periodo de Tratamiento	Pretratamiento (Día)		Día de Tratamiento[a,b,c]													
Día de Visita	Selección (-28 a -2)	(-2)	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Evaluaciones de selección																
Consentimiento informado	X															
Historia y Física Completa	X															X[d]
CXR	X[d]															
EKG	X[d]															X
Medicamentos estabilizados/ Retirados prohibidos (si es necesario)[b]	X									—						
Sujeto enrolado	X	X[e]														
Sujeto en aleatorio[f]	X	X[e]														
Dosificación[g]																
Evaluaciones de Intermedio[c]																

Periodo de Tratamiento	Pretratamiento (Día)		Día de Tratamiento[2,3,4]													
Duración de rigidez matutina	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Historia y Física Intermedia			X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		
Cuenta de articulación sensible	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Cuenta de articulación hinchada	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Evaluación del dolor del sujeto	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Evaluación global del sujeto de la actividad de la enfermedad	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Evaluación global del médico de la actividad del sujeto	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Evaluación del sujeto de la función física	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
Cuestionario de salud forma 36 corta (SF-36)	X		X				X			X						X
Respuesta del sujeto a la terapia							X			X						X
Evaluaciones de Seguridad																
Monitoreo de evento adverso		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X[5]
Peso[6]	X	X														X
Mamografía (sólo mujeres)[1]	X															X
Signos vitales	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Periodo de Tratamiento	Pretratamiento (Día)		Día de Tratamiento[c,f,g]													
Laboratorio																
CBC	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Panel de química	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análisis de orina	X															X
Prueba de embarazo orina/ suero[d]	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Antígeno de superficie de hepatitis B	X															
Anticuerpo de hepatitis C	X															
Farmacodinámicos (FD)																
Factor reumatoide	X		X							X						X
CRP	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
IL-2R			X		X	X	X	X	X	X		X		X		X
Citocinas exploratorias (ICAM-1 e-Selectina, IL-6 y TNFα)			X				X			X						X
Farmacocinéticos			X			X	X			X						
Determinaciones de inmunoglobulina																
Inmunoglobulinas cuantitativas (IgG, IgA, IgM)			X							X						X
Inmunogenicidad																
Prueba Anti-BMS-188667Ab			X		X		X			X			X			X
Evaluaciones radiográficas[h]																
Rayos X (manos/ muñecas y pies)			X							X						X

[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 reemplazan las que pueden programarse en el día de la descontinuación. 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 descontinuación 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

519

el estudio se basan en este peso.

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

[i] Sólo examen físico completo.

[j] 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 para requerimientos de elegibilidad antes de poner en contacto con el Central Randomization System para colocar en forma aleatoria.

[l] Ver Sección 2.1.4.3 del protocolo para racionalización de mamografía. Si no se realiza dentro de 6 meses (la 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.

[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.

[o] Los sujetos que terminaron tempranamente que tienen eventos

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

Evaluaciones de Eficacia

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 silgas en inglés). Para esta evaluación, los datos se colectan en siete 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 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%, 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 define como el mantenimiento de una respuesta ACR 70 sobre un

1610 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

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 frecuentcia 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

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 descontinuación.

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 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 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 + 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 TNFα. Estos parámetros se resumen por el grupo de tratamiento, usando frecuencias y cambio medio de la línea base hasta el Día 180 y Día 360.

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, rito cardiaco, 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

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:Tc 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 descontinuación 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

Relaciones de Respuesta y Energía con 107[a] 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

[a] El tamaño de muestra se ajusta para una relación de descontinuación del 15% posible; el tamaño de la muestra actual fue 91.

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 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).

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; 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 Primária (Días 1-180)

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 descontinuación que se debe a la carencia de eficacia y la

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

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

	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

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

TABLA 4

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

	CTLA4Ig (BMS 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)

[a] Otras razones para la descontinuación 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 descontinuación del estudio; sin embargo, este sujeto no se incluye en esta tabla.

Un lote Kaplan-Meier de la proporción acumulada de

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 ± SD (rango)	55.8±12.5 (17, 83)	54.4±11.3 (23, 80)	54.7±12.0 (23, 80)
Peso (kg)			
Media ± SD (rango)	77.8±18.6 (40.1, 144.0)	78.7±21.4 (48.4, 186.8)	79.9±17.6 (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 ± SD (rango)	n=114[a] 9.7±9.8 (0, 38)	n=105 9.7±8.1 (0, 36)	n=117[a] 8.9±8.3 (0, 41)

La duración del RA no se reporta para 3 sujetos.

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).

TABLA 6

Características de Artritis Reumatoide Clínica de Línea Base

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Características	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
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

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

533

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%).

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) fueros hallazgos músculoesqueletales (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.

El uso general de MTX, costicosteroides sistémicos

(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)		
Antes de Medicamento Reumático, n (%)[a]	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
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.

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 m/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)

	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)

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.

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).

TABLA 9

Número de Infusiones Perdidas del Fármaco de Estudio

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
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

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.

TABLA 10

Resumen de Medicamentos Concomitantes Reumáticos Durante la Selección/Enrolamiento

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Medicamento Reumático, n (%)[a]	10 mg/kg (n=115)	2 m/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)

	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

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

	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)

[a] Las categorías del fármaco no son exclusivas mutuamente

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

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

	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)
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)
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
Valor p	<0.001[a]	0.005[a]	N/A

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

Respuestas ACR el Día 360

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 numéricamente mayores en comparación con el grupo placebo, estas diferencias no son estadísticamente importantes.

TABLA 13

Respuestas ACR el Día 360

	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)
CI	26.5 (13.7, 39.3)	4.8 (-7.9, 17.6)	N/A
Valor p	<0.001[a]	0.459	N/A

	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

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

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

	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)
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

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.

548

TABLA 15

Porcentaje Medio de Mejora desde la Línea Base el Día 180

(Componentes Individuales de Criterios ACR)

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
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
% 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
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
% 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

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

Mejora en Porcentaje desde la Línea Base el Día 360

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 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.

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 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)

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Componente	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
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
% 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
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
% de Cambio Medio	42.32*	22.94	10.25
Duración del Entumecimiento Matutino	n=88	n=71	n=72
Medio ± SD (Minutos)	66.2±59.5*	66.6±72.2	49.7±73.9

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

Articulaciones Activas Nuevas

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).

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.

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

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

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%, 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.

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.

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 ≥Día 60 para ACR50 en ≥Día 90 para ACR70 en ≥Día 30 y en cada caso, continúa hasta día 360 (ver Figura 73A, Figura 73B y Figura 73C).

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.

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.

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

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.

TABLA 17

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

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Registro Resumido	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
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
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
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)

555

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.

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) -

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Registro Resumido	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Componente de Salud Mental	n=115	n=103	n=118.
Línea Base Media	44.52	43.06	44.75
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
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)

Biomarcador y Datos Farmacodinámicos

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

(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.

TABLA 19

Mediciones Farmacodinámicas el Día 180

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

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

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)

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 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. 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.

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 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 se incrementan ligeramente (IL-2r soluble, RF, TNF α). Para

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.

TABLA 20

Mediciones Farmacodinámicas el Día 360

	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 (±SD)	1372.10± 770.11	1373.86± 567.75	1459.93± 695.07
Línea Base Posterior Media (±SD)	1185.51± 638.95	1413.84± 452.50	1666.59± 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 (±SD)	261.43± 333.58	258.42± 318.65	179.12± 207.72

sfk 562

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Medición	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
Línea Base Posterior Media (±SD)	143.13± 180.80	236.61± 287.36	206.42± 256.27
Cambio Medio	-118.30	-25.64	20.90
95% CI	(-175.19, -61.42)	(-58.50, 7.23)	(-10.72, 52.51)
ICAM-1	n=77	n=68	n=64
Línea Base Media (±SD)	406.44± 145.22	393.41± 132.97	405.67± 245.16
Línea Base Posterior Media (±SD)	354.90± 111.40	380.42± 113.20	405.07± 194.15
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
Línea Base Media (±SD)	68.84± 34.38	66.75± 37.10	69.72± 44.38
Línea Base Posterior Media (±SD)	58.77± 26.61	67.58± 31.50	71.90± 47.43
Cambio Medio	-10.89	0.83	2.34
95% CI	(-15.70, -6.08)	(-5.62, 7.28)	(-4.53, 9.20)

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
Medición	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
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
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
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
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 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)

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 m/kg (n=105)	Placebo (n=119)
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

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

Además, todos los análisis de eficacia primarios se 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 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 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

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:

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≤ 0. 003)

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 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 (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)

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 uniones y un número alto de sujetos que no reportaron

suavidad activa y uniones hinchadas en comparación con el placebo el día 180 y el día 360.

El mejoramiento significativo con 10 mg/kg CTLA4Ig comparado con el placebo se observó de manera muy cercana a todos los parámetros farmacodinámicos medidos (IL12r soluble, RF, ICAM-1, E-selectina e IL-6) y el mejoramiento numérico en el grupo TNF-α fue superior a 1 año.

Para el grupo CTLA4Ig 2 mg/kg, algunos parámetros eficaces se compararon significativamente mejor con el grupo placebo:

- Respuesta ACR50 el día 180 (p=0.027)
- Respuesta ACR70 el Día 180 (p=0.005)
- Se observaron diferencias estadísticamente significativas el día 60 (p=0.032) y diferencias estadísticamente significativas en ACR 50 y ACR 70 el día 180 (p=0.027 y p=0.005).
- Proporciones de sujetos que obtuvieron una Respuesta Clínica Principal (mantenimiento de una respuesta ACR 70 durante un periodo de 6 meses continuo) en el día 360 (p=0.036)
- La media en porcentaje mejoró en algunos de los componentes ACR individuales en el día 180 y el día 360 (p<0.05, 95% CIs no incluye 0)

Para muchos otros parámetros, 2 mg/kg de CTLA4Ig fue numéricamente mejor que el placebo.

Resultados de Seguridad

En general, el perfil de seguridad de CTLA4Ig (BMS-188667) fue similar al placebo. No se presentaron problemas de seguridad.

Evaluación del laboratorio clínico

En general, no surgen cuestiones de seguridad a partir de la evaluación de los cambios en la media dentro de los valores de laboratorio. Los valores medios para la hemoglobina, WBCs, neutrófilos, plaquetas, ALT, AST, GGT y la proteína total se encontraron dentro del rango normal en la línea base y permanecieron dentro de un rango normal durante el estudio. En general, los resultados de las pruebas de laboratorio no revelaron valores consistentes fuera del rango o tendencias anormales que pudieran atribuirse a una medicación en el estudio.

Señales vitales, descubrimientos físicos y observaciones relacionadas con la seguridad

En cada estudio de la administración del fármaco en estudio, las señales vitales (temperatura corporal, ritmo cardiaco y presión sanguínea establecida) se monitorearon con una pre-dosis y en 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después de la infusión. En general, los valores medios para todos los parámetros de la señal vital se encontraron dentro de un

rango normal y estable a través del periodo de estudio el día 360 para todos los grupos de tratamiento.

EJEMPLO 8

Aún cuando los modelos animales establecidos que imitan el síndrome coronario agudo en humano no existen, puede ser posible el uso de CTLA4Ig o L104EA29YIg para inhibir la aterosclerosis en modelos animales. Al usar CTLA4Ig murino, se explora la capacidad para suprimir la aterosclerosis en la apoliproteína en un ratón E null (apoE-/-) mantiene en una dieta alta en grasas con y sin un estímulo para promover la inflamación (es decir, agentes infecciosos, administración de citocinas). Se anticipa que la CTLA4Ig puede proporcionar una reducción de la formación de una placa aterosclerótica en este modelo animal en comparación con el ratón que recibe inyecciones del placebo (sham).

EJEMPLO 9

El uso potencial de CTLA4Ig o L104EA29YIg se explora adicionalmente en varias poblaciones de pacientes.

Los pacientes que se presentan al hospital con angina inestable o infarto al miocardio sin elevación del segmento ST (sin STEMI) y evidencia de una inflamación notable (es decir, hsCRP elevada) se coloca aleatoriamente para recibir ya sea placebo o CTLA4Ig/L104EA29YIg. Los pacientes que

reciben un antecedente de terapias de intervención o médicas estándar éticamente ordenadas y consistentes con la mayoría de los lineamientos del Colegio Americano de Cardiología/Asociación Americana del Corazón. El punto de vista principal podría ser un compuesto clínico que refleje una reducción en la morbididad del paciente posterior y una mortalidad y/o reducción de una reducción del riesgo posterior medido por hsCRP (u otro marcador(es) inflamatoria).

571

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratamiento de una enfermedad cardiovascular caracterizado porque comprende administrar a un sujeto, una cantidad efectiva de una molécula que bloquea las interacciones de B7 con CTLA4 y/o CD28.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la molécula que bloquea las interacciones de B7 con CTLA4 y/o CD28 es una molécula soluble de CTLA4

3. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo que consiste de: ateroesclerosis; enfermedad coronaria del corazón (CHD); restenosis; enfermedad arterial periférica; cirugía por injerto de desviación coronaria; enfermedad de las arterias carótidas; arteritis; miocarditis; inflamación cardiovascular; inflamación vascular; angina inestable (UA); angina inestable refractaria; angina estable (SA); angina estable crónica; síndrome coronario agudo (ACS); infarto al miocardio; infarto al miocardio agudo (AMI), incluyendo un primer o recurrente infarto al miocardio, infarto al miocardio que no es de onda "Q", infarto al miocardio que no es de elevación del segmento ST e infarto al miocardio que es de elevación del segmento ST.

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo que consiste de: ateroesclerosis; 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), incluyendo un primer o recurrente infarto al miocardio, infarto al miocardio que no es de onda "Q", infarto al miocardio que no es de elevación del segmento ST e infarto al miocardio que es de elevación del segmento ST.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la enfermedad cardiovascular está mediada por interacciones de células T con células B7 positivas.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la enfermedad cardiovascular se asocia con al menos un marcador de inflamación.

7. El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque el marcador de inflamación se selecciona del grupo que consiste de CRP, hsCRP, IL-10, CD40L, sCD40L, IL-6, sICAM-1, TNF-α, conteo de células de glóbulos blancos, fibrinógeno, y amiloide A de suero.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el marcador de inflamación se selecciona

573

del grupo que consiste de CRP, hsCRP, IL-6, y TNF-α.

9. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la cantidad efectiva de la molécula soluble de CTLA4 es de alrededor de 0.1 a 100 mg/kg de peso del sujeto, alrededor de 0.5 a 100 mg/kg de peso de un sujeto 0.5 a 5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 5 a 10 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 10 a 15 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 15 a 20 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 20 a 25 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 25 a 30 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 30 a 35 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 35 a 40 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 40 a 45 mg/kg de un sujeto, alrededor de 45 a 50 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 50 a 55 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 55 a 60 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 60 a 65 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 65 a 70 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 70 a 75 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 75 a 80 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 80 a 85 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 85 a 90 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 90 a 95 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 95 a 100 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 2 a 10 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 0.1 a 4 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 0.1 a 0.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 0.5 a 1.0 mg/kg de peso de un sujeto,

alrededor de 1.0 a 1.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 1.5 a 2.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 2.0 a 2.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 2.5 a 3.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 3.0 a 3.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 3.5 a 4.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 4.0 a 4.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 4.5 a 5.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 5.0 a 5.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 5.5 a 6.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 6.0 a 6.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 6.5 a 7.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 7.0 a 7.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 7.5 a 8.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 8.0 a 8.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 8.5 a 9.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 9.0 a 9.5 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 9.5 a 10.0 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 0.1 a 2 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 2 a 4 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 4 a 6 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 6 a 8 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 8 a 10 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 10 a 12 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 12 a 14 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 14 a 16 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 16 a 18

mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 18 a 20 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 0.5 mg/kg de peso del sujeto, 2 mg/kg de peso del sujeto, 10 mg/kg de peso del sujeto, alrededor de 0.5 mg/kg a 100 de peso del sujeto, alrededor de 0.5 a 10 mg/kg de peso de un sujeto, alrededor de 0.1 a 20 mg/kg de 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 sujeto que pesa más de 100 kg.

10. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la molécula soluble de CTLA4 comprende un dominio extracelular de una molécula de CTLA4, o porción de la misma, que se enlaza a un antígeno B7 expresado en células B activadas.

11. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el dominio extracelular de la molécula de CTLA4 comprende los aminoácidos mostrados en la Figura 23 comenzando con metionina en la posición +1 o con alanina en la posición-1 y terminando con ácido aspártico en la posición 124.

12. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la molécula soluble de CTLA4 es una molécula de fusión de CTLA4.

13. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la molécula de fusión de CTLA4 comprende

un dominio extracelular de una molécula de CTLA4 que se enlaza a un antígeno B7 expresado en las células B activadas unidas a una molécula que no es de CTLA4.

14. El método de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el dominio extracelular de la molécula de CTLA4 comprende los aminoácidos que se muestran en la Figura 23 comenzando con metionina en la posición +1 o con alanina en la posición -1 y terminando con ácido aspártico en la posición 124.

15. El método de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque la molécula que no es de CTLA4 comprende una secuencia de aminoácidos la cual altera la solubilidad o afinidad de la molécula soluble de CTLA4.

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la secuencia de aminoácidos la cual altera la solubilidad o afinidad comprende una porción de inmunoglobulina.

17. El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la porción de inmunoglobulina comprende una o más mutaciones para reducir la función del efector.

18. El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la porción de inmunoglobulina comprende una unión articulada y cualquiera o todos los residuos de cisteína dentro de la unión articulada, se substituyen con serina.

19. El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la porción de inmunoglobulina es una región constante de inmunoglobulina o porción de la misma.

20. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque la región constante de inmunoglobulina o porción de la misma se muta para reducir la función del efector.

21. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque la región constante de inmunoglobulina comprende una unión articulada, regiones CH2 y CH3 de una molécula de inmunoglobulina.

22. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque la región constante de inmunoglobulina o porción de la misma es una región constante de inmunoglobulina de humano o de mono o porción de la misma.

23. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la molécula de fusión de CTLA4 es CTLA4Ig.

24. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque la CTLA4Ig se muestra en la Figura 24 comenzando con metionina en la posición +1 o con alanina en la posición -1 y terminando con lisina en la posición +357.

25. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la molécula soluble de CTLA4 es una

molécula mutante soluble de CTLA4.

26. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la molécula mutante soluble de CTLA4 se enlaza a un antígeno B7 expresado sobre células B activadas y comprende una mutación en el dominio extracelular de una molécula de CTLA4.

27. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la molécula mutante soluble de CTLA4 comprende un dominio extracelular de CTLA4,

a) en donde el dominio extracelular de CTLA4 comienza con metionina en la posición +1 o con alanina en la posición-1 y termina con ácido aspártico en la posición +124 como se muestra en la Figura 23, y

en donde en la posición +104 del dominio extracelular de CTLA4, la leucina se substituye con cualquier otro aminoácido.

28. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la molécula mutante soluble de CTLA4 comprende un dominio extracelular de CTLA4,

a) en donde el dominio extracelular de CTLA4 comienza con metionina en la posición +1 o con alanina en la posición-1 y termina con ácido aspártico en la posición +124 como se muestra en la Figura 23,

b) en donde la posición +104 del dominio extracelular de CTLA4, la leucina se substituye con ácido glutámico, y c) en

376 579

donde en la posición +29 del dominio extracelular de CTLA4, la alanina se substituye con tirosina.

29. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la molécula mutante soluble de CTLA4 es L104EA29YIg como se muestra en la Figura 19 que comienza con metionina en la posición +1 o con alanina en la posición -1 y terminando con lisina en la posición +357 como se muestra en la Figura 19.

S80

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades del sistema cardiovascular, al administrar a un sujeto moléculas solubles de CTLA4 que bloquean las moléculas endógenas B7 de su enlace a los ligandos.

XP 581

Listado de Secuencias

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

<120>

<130> D0340

<140> PCT/US04/24840
<141> 2004-08-03

<150> 60/492,430
<151> 2003-08-04

<<160> 22

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador delantero M CTLA4 de Oncostatina

<400> 1
ctcagtctgg tccttgcact cctgtttcca agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc 60

cagcc 65

<210> 2
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador delantero M CTLA4 de Oncostatina

<400> 2
tttgggctcc tgatcagaat ctgggcacgg ttg 33

<210> 3
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador delantero M CTLA4 de Oncostatina

<400> 3
ctagccactg aagcttcacc aatgggtgta ctgctcacac agaggacgct gctcagtctg 60

gtccttgcac tc 72

<210> 4
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador delantero M CTLA4 (OMCTLA4) de Oncostatina

<400> 4
gaggtgataa agcttcacca atgggtgtac tgctcacaca g 41

<210> 5
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador delantero M CTLA4 (OMCTLA4) de Oncostatina

<400> 5
gtggtgtatt ggtctagatc aatcagaatc tgggcacggt tc 42

<210> 6
<211> 1152
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> L104EIg, proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<220>
<221> Péptido_mat
<222> (79)..()

<400> 6

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca      48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct      96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag     144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg     192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg     240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc     288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac     336
```

```
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac  384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                 100

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa  432
Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac  480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc  528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc  576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag  624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag  672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc  720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag  768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc  816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc  864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg  912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat  960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    280                 285                 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                315                 320                 325
```

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
345 350 355

<210> 7
<211> 383
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> L104EIg, proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<400> 7

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
-25 -20 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10 -5 -1 1 5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
10 15 20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
25 30 35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
40 45 50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55 60 65 70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
75 80 85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
90 95 100

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
105 110 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
120 125 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135 140 145 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
155 160 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
170 175 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
185 190 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
200 205 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215 220 225 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
235 240 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295 300 305 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
345 350 355

<210> 8
<211> 1152
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> L104EA29YIg, proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<220>
<221> Péptido_mat
<222> (79)..()

<400> 8

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca      48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct      96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag     144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa tat act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg     192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg     240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50
ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc     288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac     336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac     384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa     432
Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac     480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc     528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc     576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag     624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag     672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195
```

```
aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc      720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag      768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc      816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc      864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg      912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat      960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    280                 285                 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc     1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg     1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                315                 320                 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg     1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga     1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355
```

<210> 9
<211> 383
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> L104EA29YIg, proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<400> 9

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20
```

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
25 30 35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
40 45 50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55 60 65 70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
75 80 85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
90 95 100

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
105 110 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
120 125 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135 140 145 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
155 160 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
170 175 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
185 190 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
200 205 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215 220 225 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
235 240 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295 300 305 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
345 350 355

<210> 10
<211> 1152
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> L104EA29LIg, proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<220>
<221> Péptido_mat
<222> (79)..()

<400> 10

atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca 48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
-25 -20 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct 96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10 -5 -1 1 5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag 144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
10 15 20

tat gca tct cca ggc aaa ttg act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg 192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Leu Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
25 30 35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg 240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
40 45 50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc 288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55 60 65 70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac 336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
75 80 85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac 384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
90 95 100

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa 432
Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
105 110 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac 480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
120 125 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc 528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135 140 145 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc 576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
155 160 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag 624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
170 175 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag 672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
185 190 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc 720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
200 205 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag 768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215 220 225 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc 816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
235 240 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
250 255 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295 300 305 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

```
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg     1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga     1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355
```

<210> 11
<211> 383
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> L104EA29LIg, proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<400> 11

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Leu Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
```

155 160 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
170 175 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
185 190 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
200 205 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215 220 225 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
235 240 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295 300 305 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
345 350 355

<210> 12
<211> 1152
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> L104EA29YIg, proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<220>
<221> Péptido_mat
<222> (79)..()

<400> 12

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca      48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct      96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag     144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
             10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa act act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg     192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Thr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
         25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg     240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
     40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc     288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac     336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                 75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac     384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
             90                  95                  100

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa     432
Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
         105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac     480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
     120                 125                 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc     528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc     576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                 155                 160                 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag     624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
             170                 175                 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag     672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
         185                 190                 195
```

```
aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc      720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag      768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc      816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc      864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg      912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat      960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    280                 285                 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc     1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg     1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                315                 320                 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg     1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga     1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355
```

<210> 13
<211> 383
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> L104EA29YIg, proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<400> 13

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
                10                  15                  20
```

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Thr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
25 30 35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
40 45 50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55 60 65 70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
75 80 85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
90 95 100

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
105 110 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
120 125 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135 140 145 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
155 160 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
170 175 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
185 190 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
200 205 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215 220 225 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
235 240 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295 300 305 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
345 350 355

<210> 14
<211> 1152
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> L104EA29WIg, proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<220>
<221> Péptido_mat
<222> (79)..()

<400> 14

atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca 48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
-25 -20 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct 96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10 -5 -1 1 5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag 144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
10 15 20

tat gca tct cca ggc aaa tgg act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg 192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Trp Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
25 30 35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg 240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
40 45 50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc 288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55 60 65 70

```
agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac      336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac      384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                 100

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa      432
Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac      480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc      528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc      576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag      624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag      672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc      720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag      768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc      816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc      864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            250                 255                 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg      912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        265                 270                 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat      960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    280                 285                 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc     1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295                 300                 305                 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg     1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
```

```
                315                 320                 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg    1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            330                 335                 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga    1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        345                 350                 355
```

<210> 15
<211> 383
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> L104EA29WIg, proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<400> 15

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
-25                 -20                 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Trp Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130
```

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135 140 145 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
155 160 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
170 175 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
185 190 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
200 205 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215 220 225 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
235 240 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295 300 305 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
345 350 355

<210> 16
<211> 636
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(636)

<220>
<221> Péptido_mat
<222> (79)..()

<400> 16

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca      48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct      96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag     144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg     192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg     240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc     288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac     336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac     384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa     432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gac ttc ctc ctc tgg atc ctt gca gca gtt agt     480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
    120                 125                 130

tcg ggg ttg ttt ttt tat agc ttt ctc ctc aca gct gtt tct ttg agc     528
Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
135                 140                 145                 150

aaa atg cta aag aaa aga agc cct ctt aca aca ggg gtc tat gtg aaa     576
Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
                155                 160                 165

atg ccc cca aca gag cca gaa tgt gaa aag caa ttt cag cct tat ttt     624
Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
            170                 175                 180

att ccc atc aat                                                    636
Ile Pro Ile Asn
        185
```

<210> 17

<211> 212
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
-25 -20 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10 -5 -1 1 5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
10 15 20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
25 30 35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
40 45 50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55 60 65 70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
75 80 85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
90 95 100

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
105 110 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
120 125 130

Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
135 140 145 150

Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
155 160 165

Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
170 175 180

Ile Pro Ile Asn
185

<210> 18
<211> 1152

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CTLA4Ig ,proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<220>
<221> Péptido_mat
<222> (79)..()

<400> 18

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca      48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct      96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag     144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg     192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg     240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc     288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac     336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac     384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa     432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac     480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggt gga tcg tca gtc     528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc     576
```

603

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
155 160 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag 624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
170 175 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag 672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
185 190 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc 720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
200 205 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag 768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215 220 225 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc 816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
235 240 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
250 255 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295 300 305 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
345 350 355

<210> 19
<211> 383
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CTLA4Ig, proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<400> 19

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
-25                 -20                 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                235                 240                 245
```

605

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295 300 305 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
345 350 355

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 20

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
1 5

<210> 21
<211> 1152
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CTLA4Ig, proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<220>
<221> Péptido_mat
<222> (79)..()

<400> 21
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca 48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala

```
    -25             -20             -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct      96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5              -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag     144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg     192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg     240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc     288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70
agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac     336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac     384

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa     432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac     480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
    120                 125                 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc     528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135                 140                 145                 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc     576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                155                 160                 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag     624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            170                 175                 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag     672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        185                 190                 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc     720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    200                 205                 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag     768

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215                 220                 225                 230
```

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc 816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
235 240 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
250 255 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295 300 305 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
345 350 355

<210> 22
<211> 383
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CTLA4Ig, proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de CTLA4 humano

<400> 22

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
-25 -20 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10 -5 -1 1 5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
10 15 20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
25 30 35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
40 45 50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55 60 65 70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
90 95 100

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
105 110 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
120 125 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135 140 145 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
155 160 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
170 175 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
185 190 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
200 205 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215 220 225 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
235 240 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295 300 305 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
345 350 355

		Placebo N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	Total N=214
Género	Hombre	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
	Mujer	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
Raza	Blanco	30 (94%)	23 (88%)	30 (94%)	30 (94%)	29 (91%)	25 (86%)	27 (87%)	194 (91%)
	Negro	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (3 %)	3 (10%)	2 (6%)	9 (4%)
	Otro	0 (0%)	3 (12%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	11 (5%)
Enfermedad Duración	<2 Años	12 (38%)	5 (19%)	8 (25%)	12 (38%)	10 (31%)	10 (34%)	11 (35%)	68 (32%)
	2-5 Años	14 (44%)	11 (42%)	18 (56%)	13 (41%)	14 (44%)	14 (48%)	12 (39%)	96 (45%)
	5-7 Años	6 (19%)	8 (31%)	6 (19%)	6 (19%)	6 (19%)	5 (17%)	7 (23%)	44 (21%)
	>7 Años	0 (0%)	2 (8%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (6%)	0 (0%)	1 (3%)	6 (3%)
Duración Enfermedad (años)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Media	3.2	4.2	3.3	3.4	3.7	3.1	3	3.4
	Sd	2	2	1.7	2.1	2	1.8	2.2	2
	Min	0.3	0.2	0.4	0	0.7	0.4	0	0
	Max	7	7.5	6.8	7.3	7.6	7	7.1	7.6

FIG. 1A

		Placebo N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	Total N=214
Género	Hombre	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
	Mujer	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
Edad	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Media	48.3	46.9	46.2	51.5	49.3	50.8	45.6	48.4
	Sd	11.7	12.2	13.4	11.5	8.8	10.7	10.1	11.3
	Min	22	25	21	24	27	24	28	21
	Max	66	64	64	66	66	65	64	66
Peso (kg)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Media	72.9	70.6	72.7	70	69.8	68.9	71.7	71
	Sd	13.5	17.4	14.4	16.7	12.8	12.1	15.8	14.6
	Min	46.7	45	50	40.1	48	47	39.2	39.2
	Max	98.2	101.3	99	101.3	95	93.8	99	101.3
Actividad de enfermedad (paciente)	N	32	26	32	32	32	29	31	215
	Media	3.6	3.6	3.7	3.6	3.5	3.6	3.5	3.6
	Sd	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.7	0.8
	Min	2	2	2	2	2	2	2	2
	Max	5	5	5	5	5	5	5	5

FIG. 1B

		Placebo N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	Total N=214
Actividad de Enfermedad (Médico)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Media	3.6	3.5	3.5	3.7	3.4	3.4	3.5	3.5
	Sd	0.7	0.6	0.8	1	0.6	0.8	0.6	0.7
	Min	2	3	2	2	2	2	3	2
	Max	5	5	5	5	5	5	5	5
ESR	N	32	26	32	32	32	29	30	213
	Media	43.3	35.2	41.6	36.3	29.8	40.9	39.3	38.1
	Sd	29.4	22.5	27.4	27.9	24.2	30.2	24.6	26.8
	Min	2	4	4	3	0	6	2	0
	Max	116	90	94	98	91	110	102	116
Función física (registro)	N	32	26	31	32	32	29	31	213
	Media	16.8	15.5	16.2	17.1	15.3	16.3	16.1	16.2
	Sd	5.4	4.2	5.5	5.7	3.7	4.8	3.8	4.8
	Min	8	8	8	8	8	8	9	8
	Max	32	23	26	28	24	26	26	32
CRP	N	30	23	31	31	31	28	31	205
	Media	56.7	26.4	48	33.6	28.1	48.1	37.5	40.1
	Sd	62.7	30.3	47.3	46	39.1	64.5	35.2	48.6
	Min	2	5	3	3	3	3	3	2
	Max	248	115	198	182	200	333	135	333

FIG. 1C

		Placebo N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	Total N=214
Articulaciones sensibles (registro)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Media	32.1	32.5	32.1	29.4	25.6	30.7	30.6	30.4
	Sd	14.8	14.8	15	14.6	12	13.3	12.9	13.9
	Min	12	14	11	12	12	12	12	11
	Max	63	64	68	68	61	63	59	68
Articulaciones hinchadas (registro)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Media	23.9	18.6	26.9	22.7	18.3	22.6	19.9	21.9
	Sd	10	6.3	11.4	12.7	7.6	8.5	8.9	10
	Min	10	10	10	10	10	10	10	10
	Max	51	33	53	58	36	40	44	58
Dolor (registro)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	Media	3.5	3.4	3.5	3.5	3.5	3.3	3.5	3.5
	Sd	0.9	0.6	0.6	1	0.7	0.8	0.7	0.8
	Min	2	2	2	1	2	2	3	1
	Max	5	5	5	5	5	5	5	5
Entumecimiento AM (mins.)	N	31	26	32	31	32	29	30	211
	Media	156.6	211.5	145.2	149.5	160.9	160.3	147.5	160.5
	Sd	121.5	370.6	102.1	148.7	151.1	152.3	258.3	198.1
	Min	30	0	5	35	30	0	15	0
	Max	600	1440	420	720	600	720	1440	1440

FIG. 1D

		Placebo N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	Total N=214
Etanercept	Si	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	No	32 (100%)	26 (100%)	32 (100%)	32 (100%)	32 (100%)	29 (100%)	31 (100%)	214 (100%)
Metotrexato	Si	23 (72%)	22 (85%)	26 (81%)	24 (75%)	24 (75%)	21 (72%)	28 (90%)	168 (79%)
	No	9 (28%)	4 (15%)	6 (19%)	8 (25%)	8 (25%)	8 (28%)	3 (10%)	46 (21%)
Otros DMARDs	Si	28 (86%)	23 (88%)	25 (78%)	26 (81%)	28 (86%)	24 (83%)	25 (81%)	179 (84%)
	No	4 (13%)	3 (12%)	7 (22%)	6 (19%)	4 (13%)	5 (17%)	6 (19%)	35 (16%)
Esteroides C	Si	31 (97%)	26 (100%)	29 (91%)	27 (84%)	27 (84%)	28 (97%)	24 (77%)	192 (90%)
	No	1 (3%)	0 (0%)	3 (9%)	5 (16%)	5 (16%)	1 (3%)	7 (23%)	22 (10%)
NSAIDs	SI	27 (84%)	20 (77%)	30 (94%)	29 (91%)	26 (81%)	25 (86%)	25 (77%)	181 (85%)
	No	5 (16%)	6 (23%)	2 (6%)	3 (9%)	6 (19%)	4 (14%)	7 (23%)	33 (15%)
Otros	SI	30 (94%)	22 (85%)	29 (91%)	30 (94%)	31 (97%)	29 (100%)	29 (94%)	200 (93%)
	No	2 (6%)	4 (15%)	3 (9%)	2 (6%)	1 (3%)	0 (0%)	2 (6%)	14 (7%)

FIG. 1E

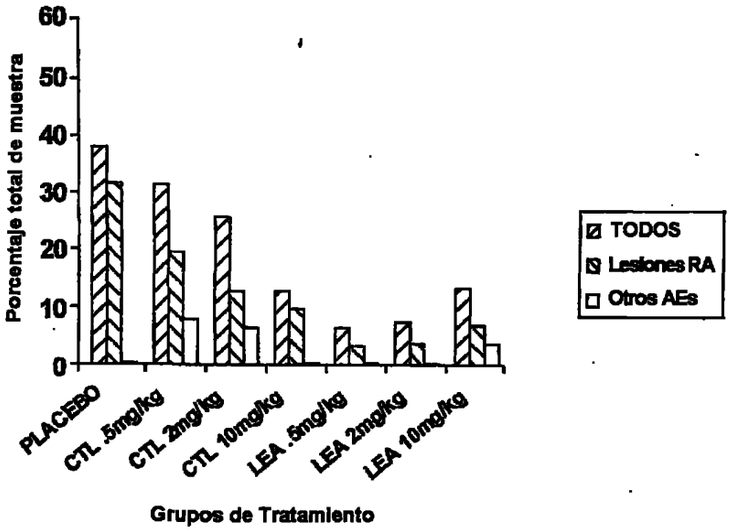

60
50
40
30
20
10
0
Porcentaje total de muestra
PLACEBO
CTL .5mg/kg
CTL 2mg/kg
CTL 10mg/kg
LEA .5mg/kg
LEA 2mg/kg
LEA 10mg/kg
Grupos de Tratamiento
TODOS
Lesiones RA
Otros AEs

FIG. 2

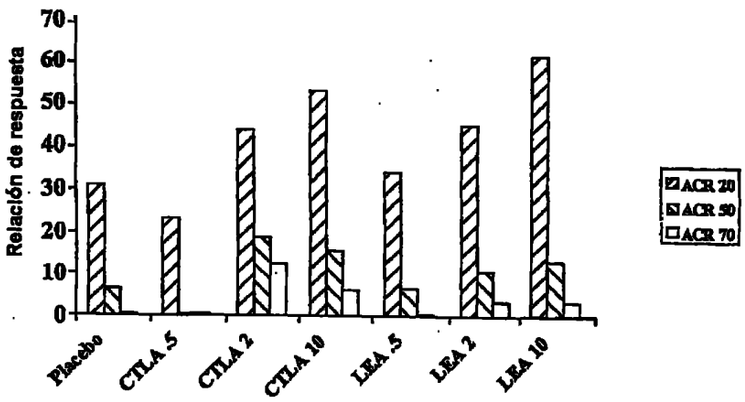

Relación de respuesta
70
60
50
40
30
20
10
0
Placebo
CTLA 5
CTLA 2
CTLA 10
LEA 5
LEA 2
LEA 10
ACR 20
ACR 50
ACR 70

FIG. 3A

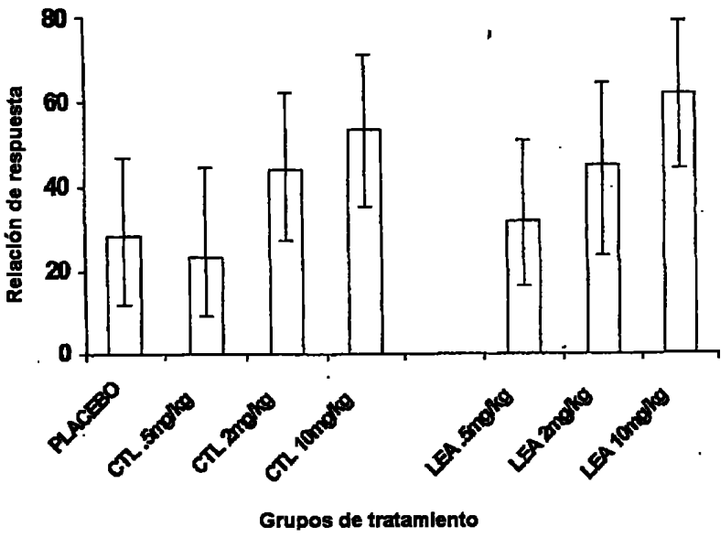

80
60
40
20
0
Relación de respuesta
PLACEBO
CTL .5mg/kg
CTL 2mg/kg
CTL 10mg/kg
LEA .5mg/kg
LEA 2mg/kg
LEA 10mg/kg
Grupos de tratamiento

FIG. 3B

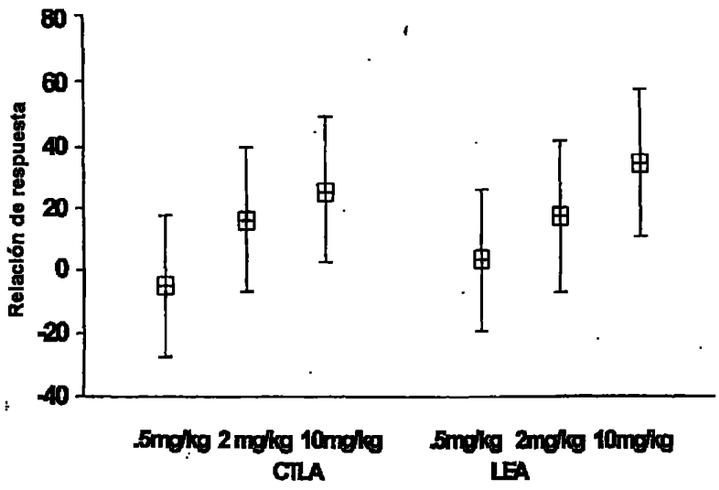

80
60
40
20
0
-20
-40
Relación de respuesta
.5mg/kg 2 mg/kg 10mg/kg
CTLA
.5mg/kg 2mg/kg 10mg/kg
LEA

FIG. 3C

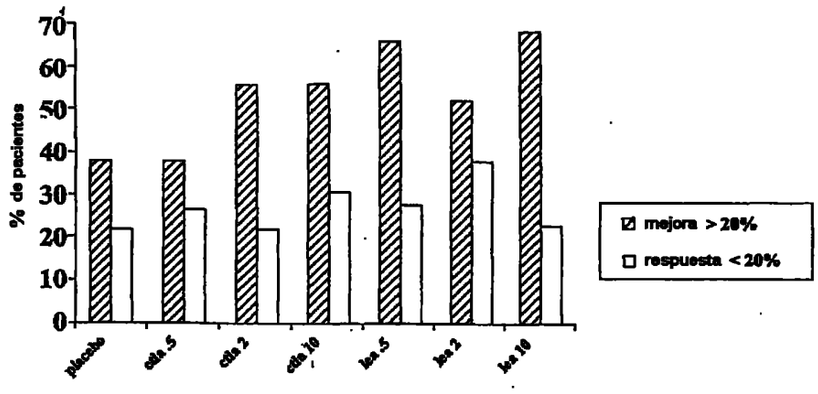

% de pacientes
70
60
50
40
30
20
10
0
placebo
cdla 5
cdla 2
cdla 10
lea 5
lea 2
lea 10
mejora > 20%
respuesta < 20%

FIG. 4A

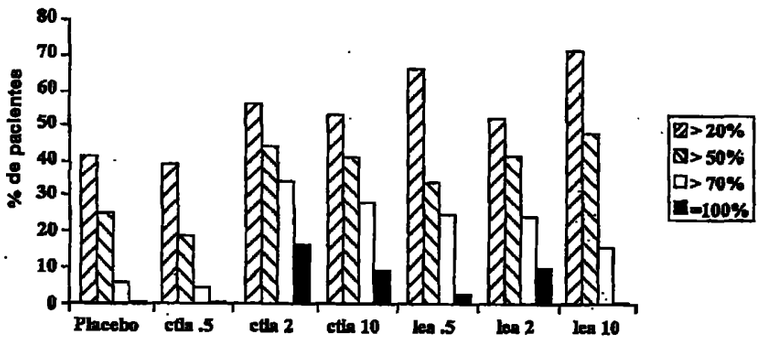

80
70
60
50
40
30
20
10
0
% de pacientes
Placebo
ctla .5
ctla 2
ctla 10
lea .5
lea 2
lea 10
>20%
>50%
>70%
=100%

FIG. 4B

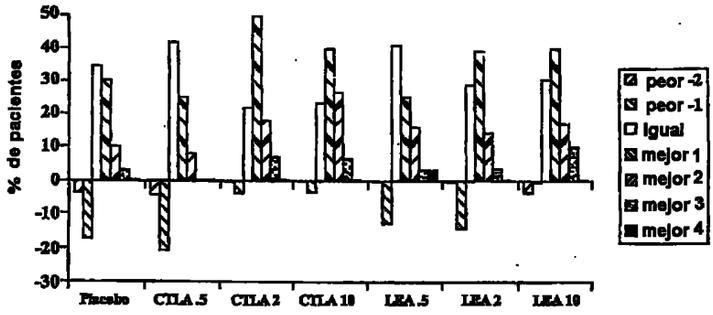

% de pacientes
50
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
Placebo
CTLA 5
CTLA 2
CTLA 10
LEA 5
LEA 2
LEA 10
peor -2
peor -1
igual
mejor 1
mejor 2
mejor 3
mejor 4

FIG. 5A

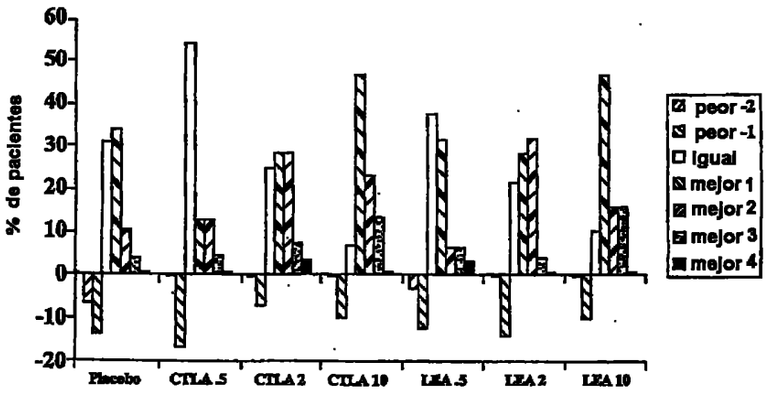

60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
% de pacientes
Placebo
CTLA 5
CTLA 2
CTLA 10
LEA 5
LEA 2
LEA 10
peor -2
peor -1
igual
mejor 1
mejor 2
mejor 3
mejor 4

FIG. 5B

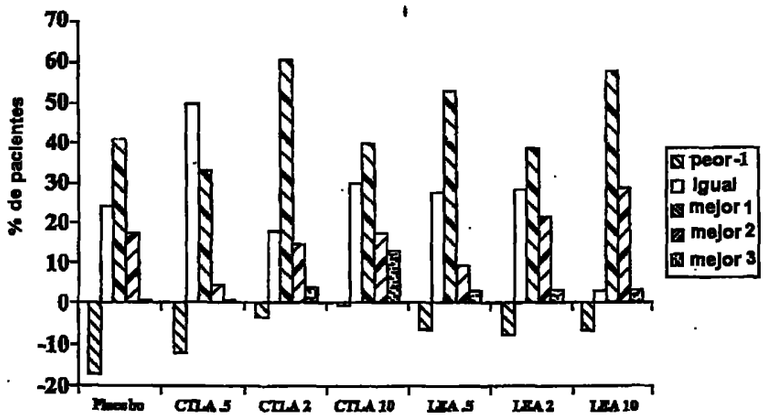

70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
% de pacientes
peor-1
igual
mejor 1
mejor 2
mejor 3
Placebo
CTLA 5
CTLA 2
CTLA 10
LEA 5
LEA 2
LEA 10

FIG. 5C

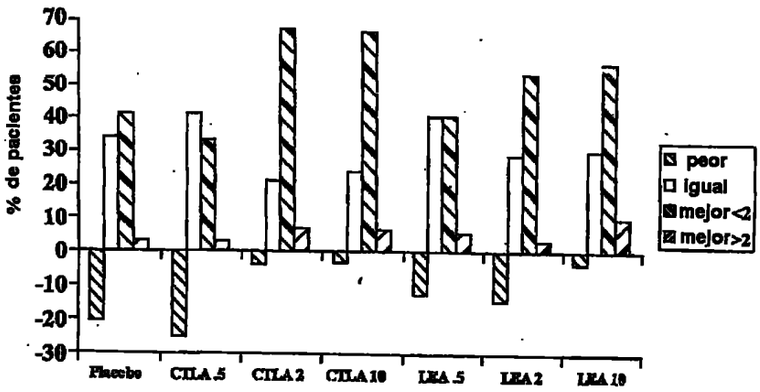

% de pacientes
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
Placebo
CILA.5
CILA 2
CILA 10
LEA.5
LEA 2
LEA 10
peor
igual
mejor<2
mejor>2

FIG. 5D

627

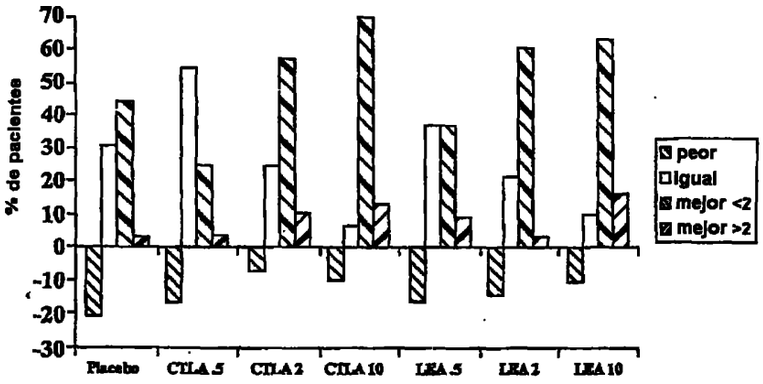

70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
% de pacientes
Placebo
CILA.5
CILA 2
CILA 10
LEA.5
LEA 2
LEA 10
peor
igual
mejor <2
mejor >2

FIG 6A

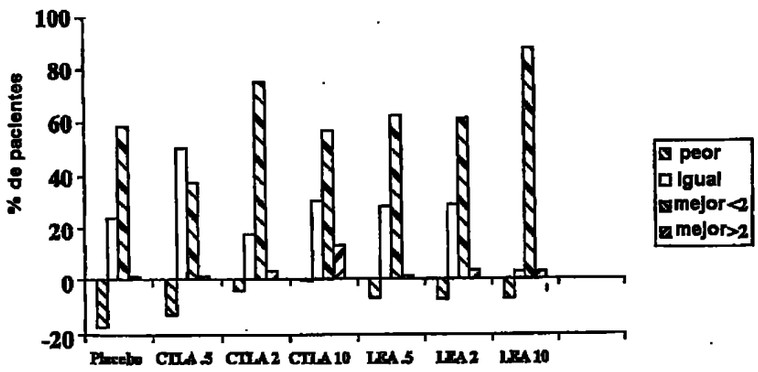

100
80
60
40
20
0
-20
% de pacientes
Placebo
CTLA 5
CTLA 2
CTLA 10
LEA 5
LEA 2
LEA 10
peor
igual
mejor<2
mejor>2

FIG. 6B

17/108

627

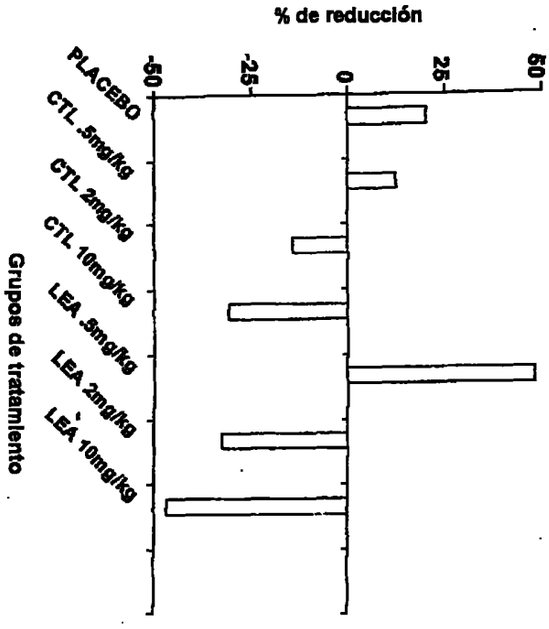

% de reducción
-50
-25
0
25
50
PLACEBO
CTL 5mg/kg
CTL 2mg/kg
CTL 10mg/kg
LEA 5mg/kg
LEA 2mg/kg
LEA 10mg/kg
Grupos de tratamiento

FIG. 7A

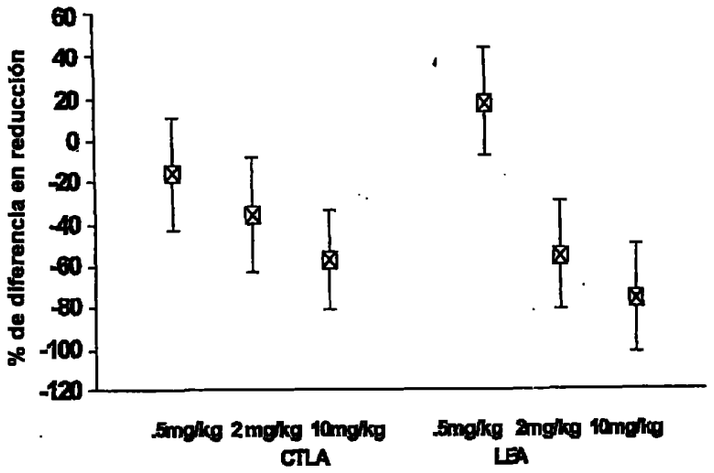

% de diferencia en reducción
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
-120
.5mg/kg
2mg/kg
10mg/kg
CTLA
.5mg/kg
2mg/kg
10mg/kg
LEA

FIG. 7B

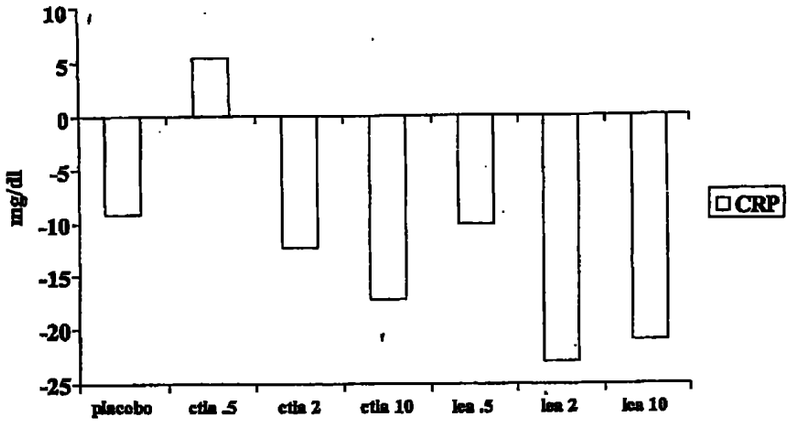

10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
mg/dl
placebo
ctla .5
ctla 2
ctla 10
lea .5
lea 2
lea 10
CRP

FIG. 7C

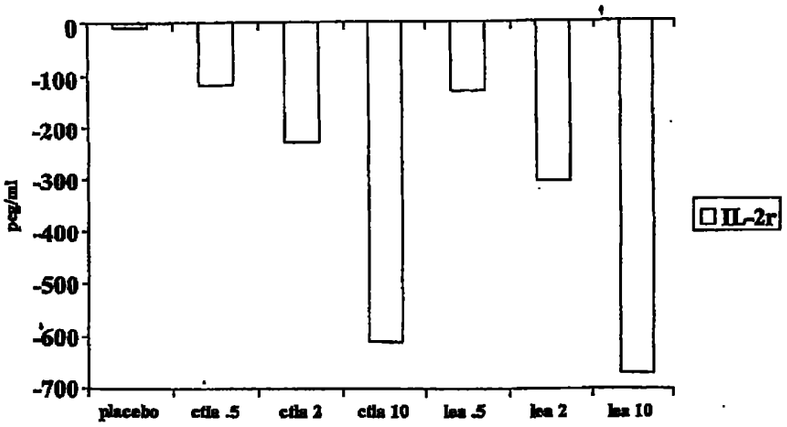

0
-100
-200
-300
-400
-500
-600
-700
pcg/ml
placebo
ctla .5
ctla 2
ctla 10
lea .5
lea 2
lea 10
IL-2r

FIG. 8

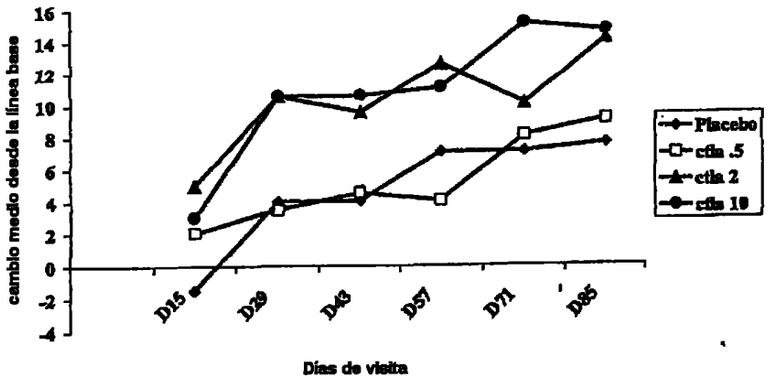

16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
cambio medio desde la línea base
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Días de visita
Placebo
cda .5
cda 2
cda 10

FIG. 9A

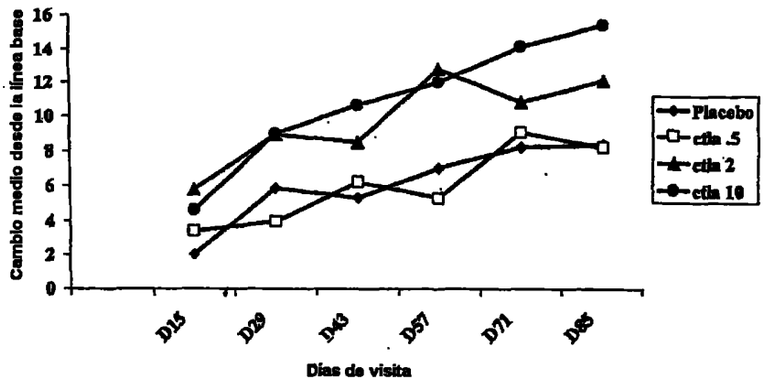

Cambio medio desde la línea base
16
14
12
10
8
6
4
2
0
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Días de visita
Placebo
ctla .5
ctla 2
ctla 10

FIG. 9B

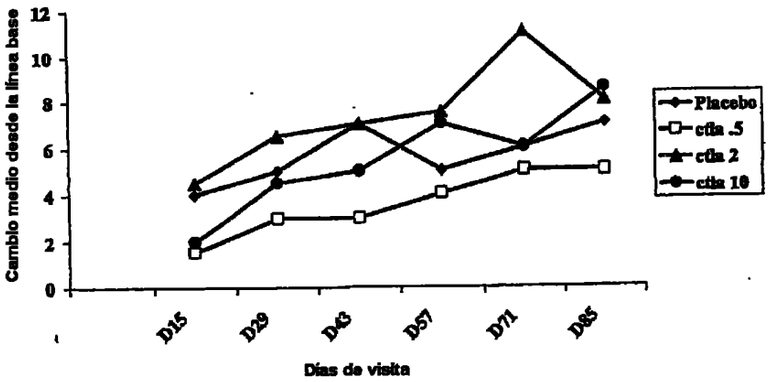

Cambio medio desde la línea base
12
10
8
6
4
2
0
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Días de visita
Placebo
ctla .5
ctla 2
ctla 10

FIG. 10A

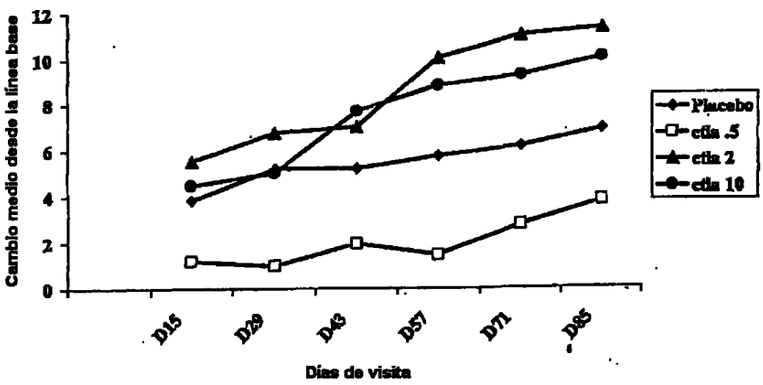

Cambio medio desde la línea base
12
10
8
6
4
2
0
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Días de visita
Placebo
cdia .5
cdia 2
cdia 10

FIG. 10B

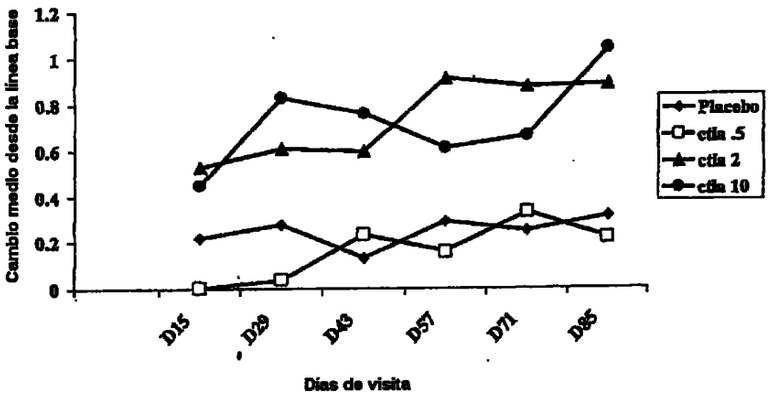

Cambio medio desde la línea base
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Días de visita
Placebo
ctla .5
ctla 2
ctla 10

FIG. 11

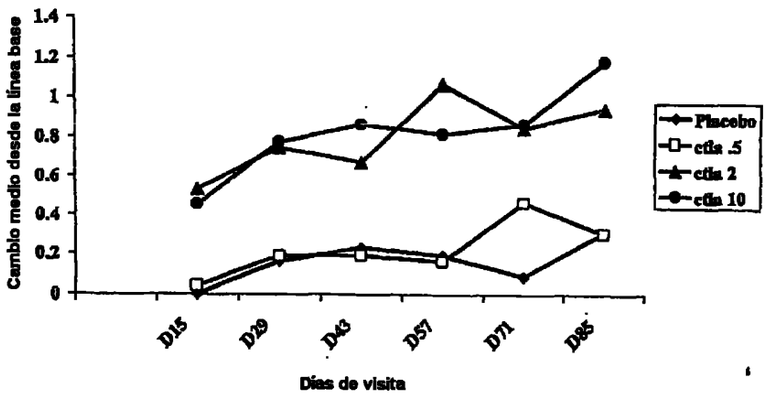

Cambio medio desde la línea base
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Días de visita
Placebo
cdia .5
cdia 2
cdia 10

FIG. 12A

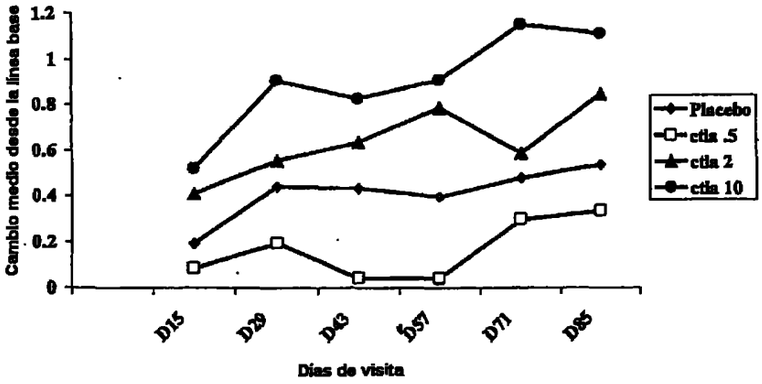

Cambio medio desde la línea base
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Días de visita
Placebo
ctla .5
ctla 2
ctla 10

FIG. 12B

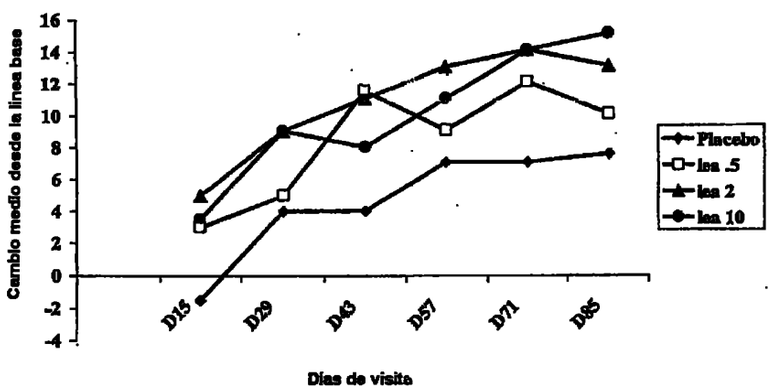

Cambio medio desde la linea base
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Dias de visita
Placebo
lea .5
lea 2
lea 10

FIG. 13A

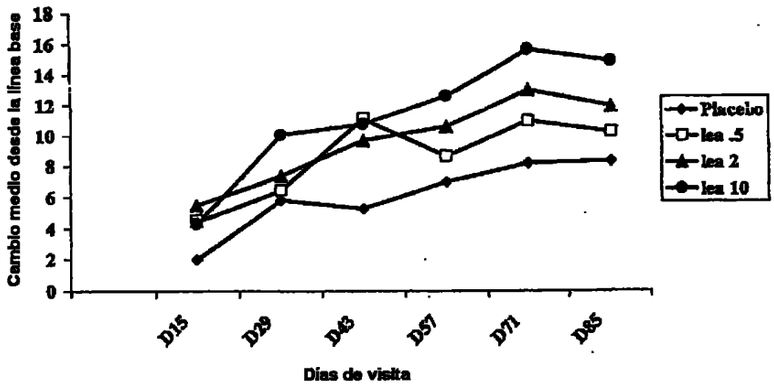

Cambio medio desde la línea base
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Días de visita
Placebo
lea .5
lea 2
lea 10

FIG. 13B

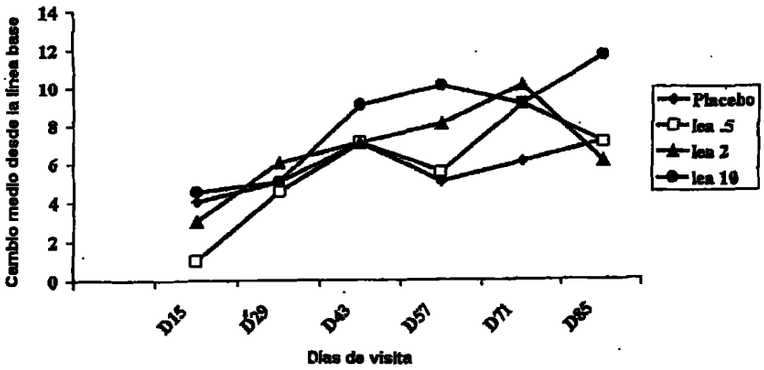

Cambio medio desde la línea base
14
12
10
8
6
4
2
0
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Días de visita
Placebo
lea .5
lea 2
lea 10

FIG. 14A

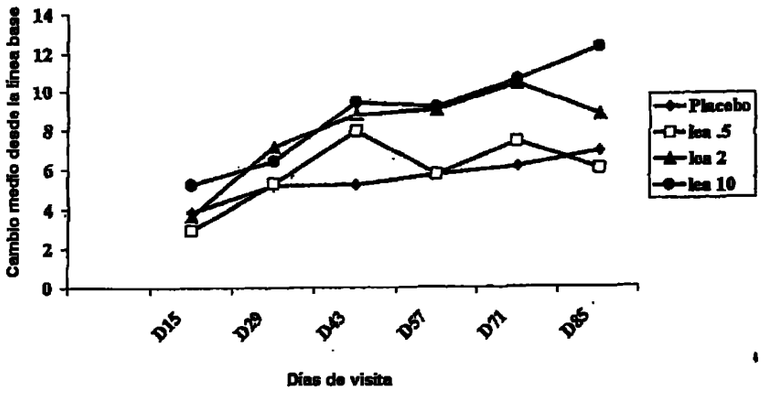

Cambio medio desde la línea base
14
12
10
8
6
4
2
0
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Días de visita
Placebo
los .5
los 2
los 10

FIG. 14B

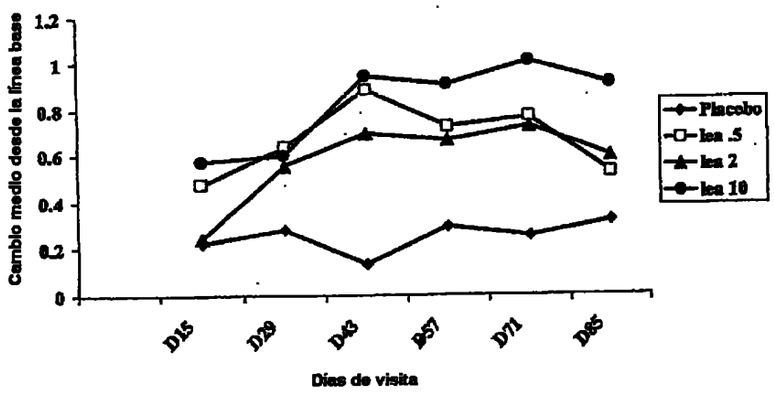

Cambio medio desde la línea base
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Días de visita
Placebo
Iea .5
Iea 2
Iea 10

FIG. 15

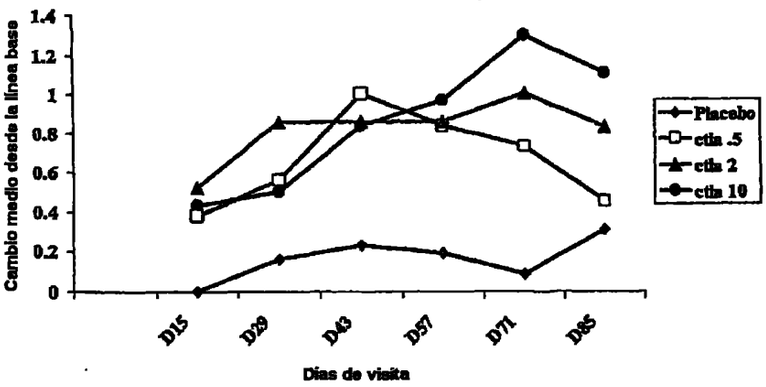

Cambio medio desde la línea base
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Días de visita
Placebo
ctla .5
ctla 2
ctla 10

FIG. 16A

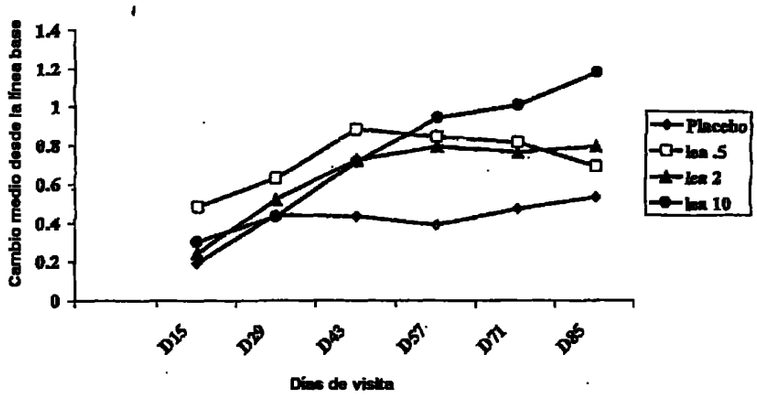

Cambio medio desde la línea base
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
D15
D29
D43
D57
D71
D85
Días de visita
Placebo
les .5
les 2
les 10

FIG. 16B

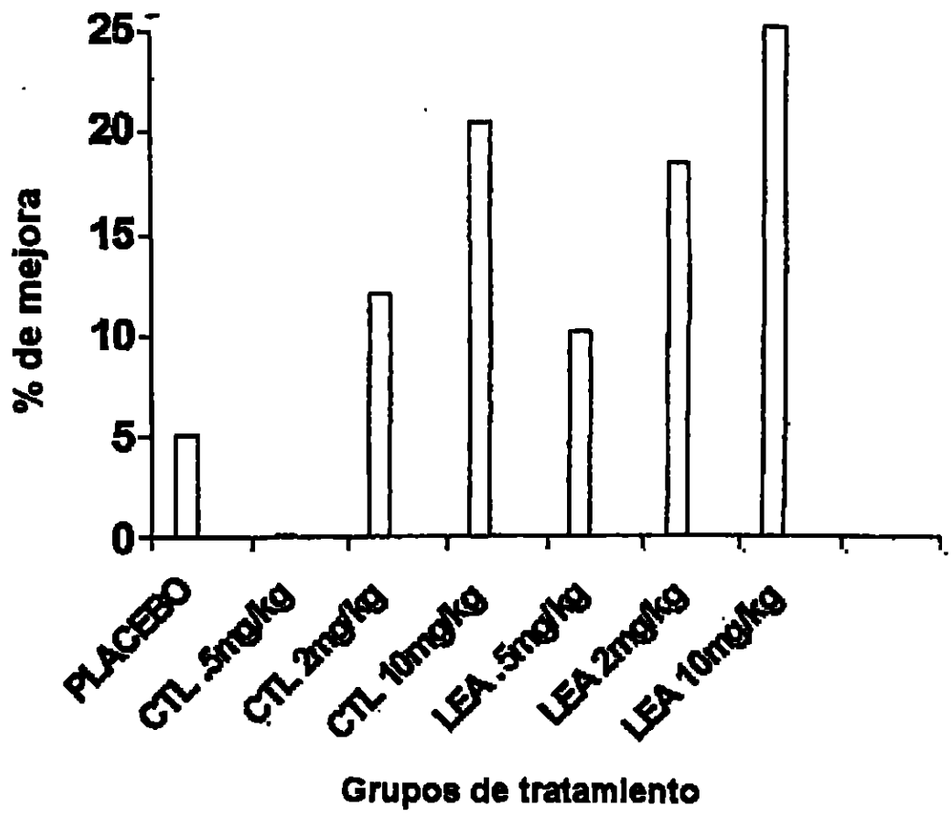

25
20
15
10
5
0
% de mejora
PLACEBO
CTL 5mg/kg
CTL 2mg/kg
CTL 10mg/kg
LEA 5mg/kg
LEA 2mg/kg
LEA 10mg/kg
Grupos de tratamiento

FIG. 17

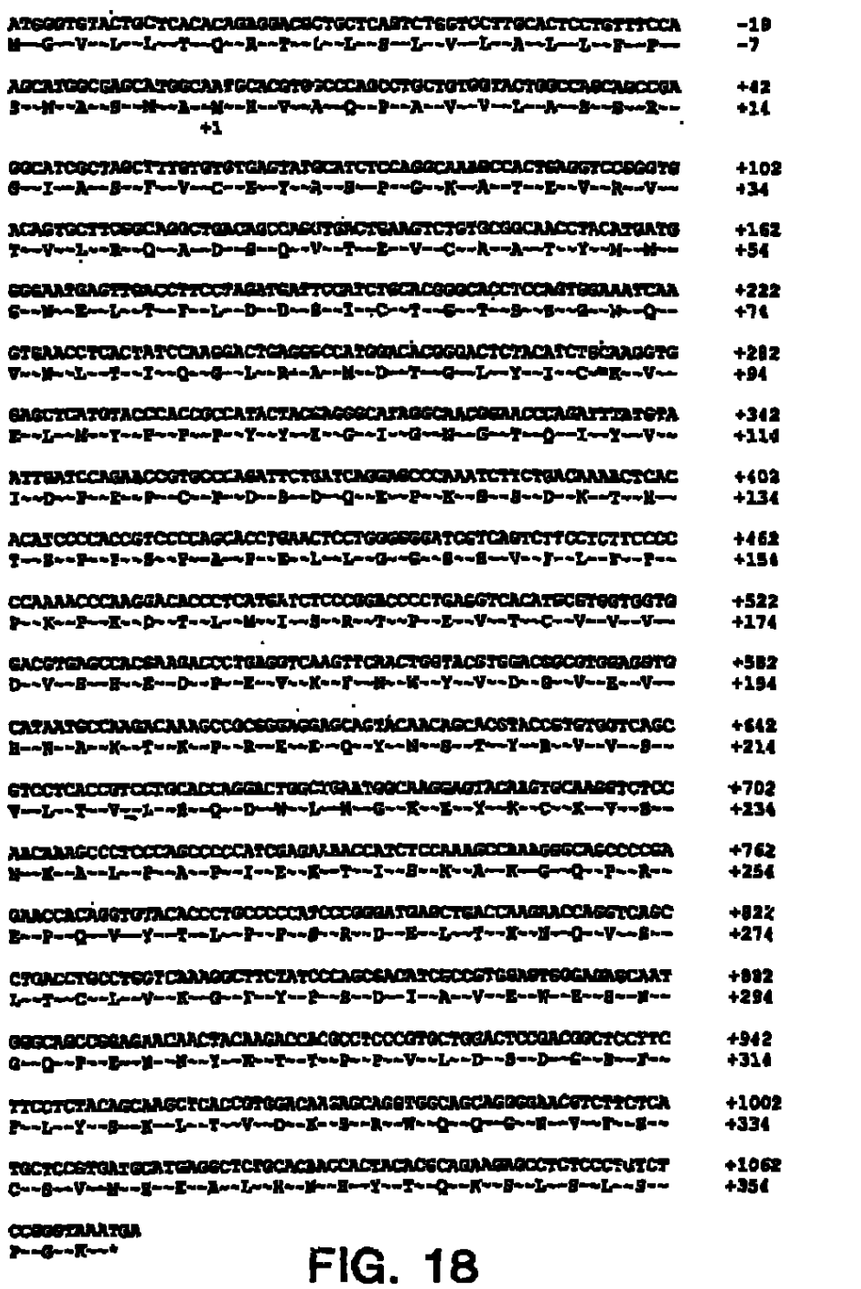


FIG. 18

```
ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA     -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--     -7

AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA     +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--     +14
                  +1

GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTGCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG     +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V--     +34

ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG     +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--     +54

GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA     +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--     +74

GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG     +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--     +94

GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA     +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--     +114

ATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGATCAGGGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC     +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--     +134

ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC     +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--     +154

CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG     +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--     +174

GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG     +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--     +194

CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC     +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--     +214

GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC     +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--     +234

AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA     +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--     +254

GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC     +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--     +274

CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT     +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--     +294

GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC     +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--     +314

TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA     +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--     +334

TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT     +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--     +354

CCGGGTAAATGA
P--G--K--*
```

FIG. 19

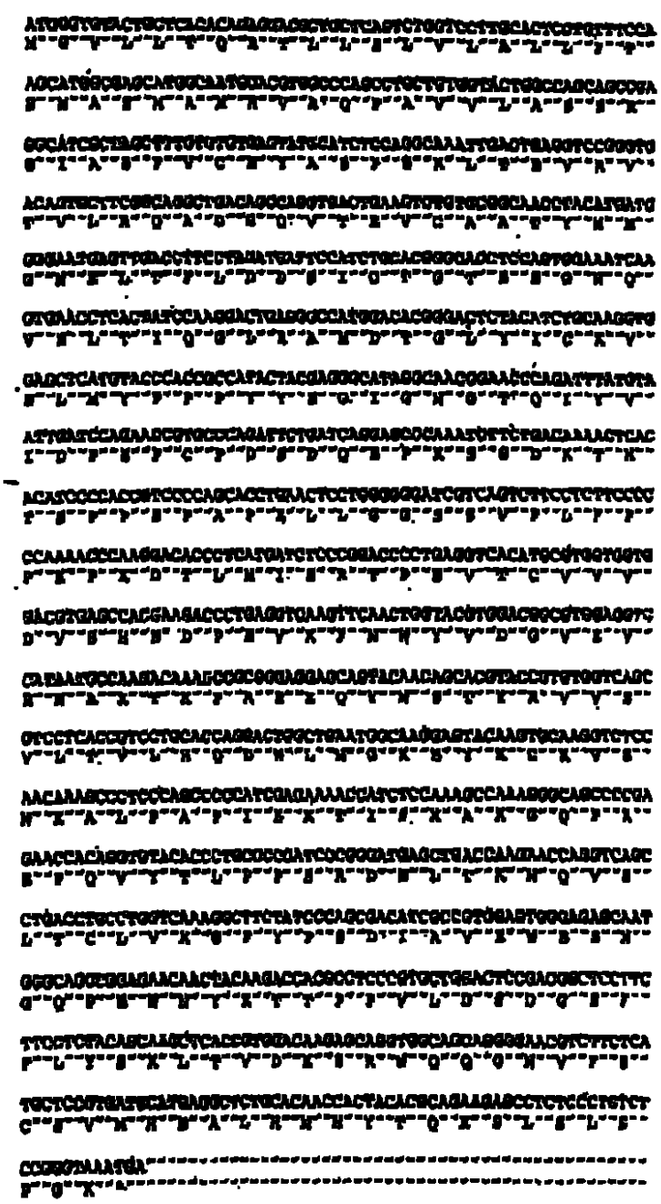


FIG. 20

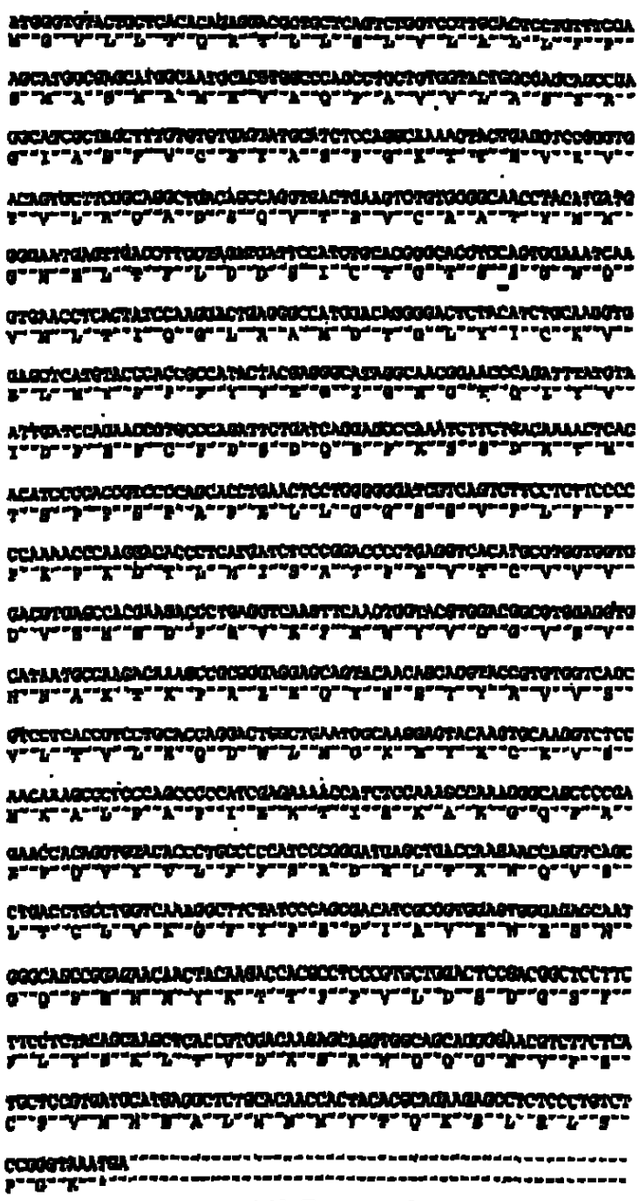


FIG. 21

650

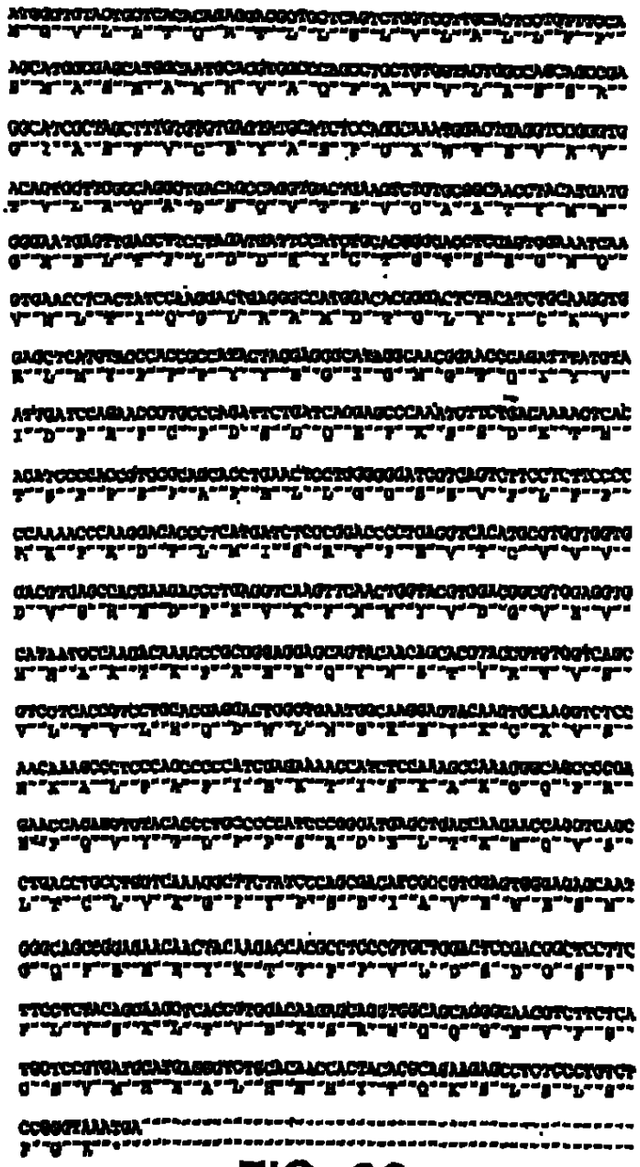


FIG. 22

Péptido de señal M de oncoestatina

```
M  G  V  L  L  T  Q  R  T  L  L  S  L  V  L
ATG GGT-GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG CTC AGT CTG GTC CTT    45

                          -1 +1
A  L  L  F  F  S  K  A  H  K  A  N  K  V  A
GCA CTG CTG TTT TCA AGC ATG GCG AGG AAG GCA AAC AAG GTG GCG    90

Q  F  A  V  V  L  A  S  S  R  G  I  A  S  F
CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCG AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT   135

V  C  E  Y  A  S  P  G  K  A  T  E  V  R  V
GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGG AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG   180

T  V  L  R  Q  A  D  S  Q  V  T  E  V  C  A
ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG   225

A  T  Y  M  M  G  N  E  L  T  F  L  D  D  S
GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC   270

I  C  T  G  T  S  S  G  N  Q  V  N  L  T  I
ATC TGC ACG GGC ACG TCG AGT GGA AAT CAA GTG AAC CTG ACT ATC   315

Q  G  L  R  A  M  D  T  G  L  Y  I  C  K  V
CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTG TAC ATC TGC AAG GTG   360
                                    Sitio de glicosilación
E  L  M  Y  P  P  P  Y  Y  L  G  I  G  N  G
GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA   405

T  Q  I  Y  V  I  D  P  E  P  C  P  D  S  D
ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC   450

F  L  L  W  I  L  A  A  V  S  S  G  L  F  F
TTC CTC CTG TGG ATC CTT GCA GCA GTT AGT TCG GGG TTG TTT TTT   495

Y  S  F  L  L  T  A  V  S  L  S  K  M  L  K
TAT AGC TTT CTG CTG ACA GCT GTT TCT TTG AGC AAA ATG CTA AAG   540

K  R  S  P  L  T  T  G  V  Y  V  K  M  P  P
AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT GTG AAA ATG CCC CCA   585

T  E  P  E  C  E  K  Q  F  Q  P  Y  F  I  P
ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCG   630

I  N
ATC AAT                                                      636
```

FIG. 23

```
ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA   -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--   -7

AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA   +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--   +14
                +1

GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG   +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--   +34

ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG   +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--   +54

GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA   +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--   +74

GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGCAGACAGGGACTCTACATCTGCAAGGTG   +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--   +94

GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA   +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--L--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--   +114

ATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC   +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--   +134

ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGTGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC   +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--   +154

CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG   +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--   +174

GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG   +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--   +194

CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC   +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--   +214

GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC   +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--   +234

AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA   +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--   +254

GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC   +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--   +274

CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT   +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--   +294

GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC   +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--   +314

TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA   +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--   +334

TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT   +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--   +354

CCGGGTAAATGA
P--G--K--*
```

FIG. 24

FIG. 25A

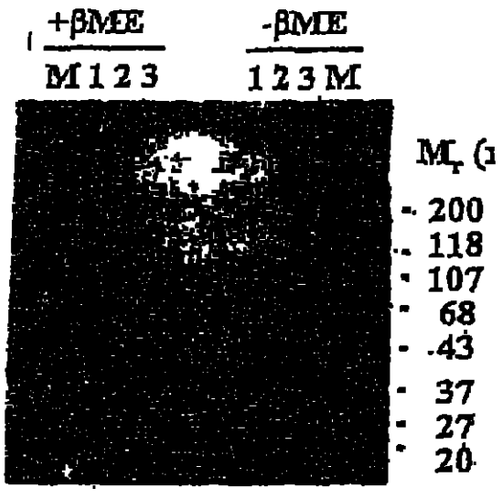


FIG. 25B

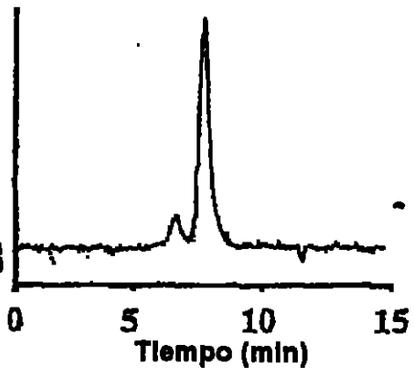
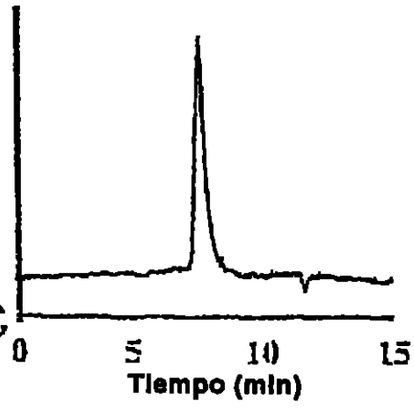


FIG. 25C



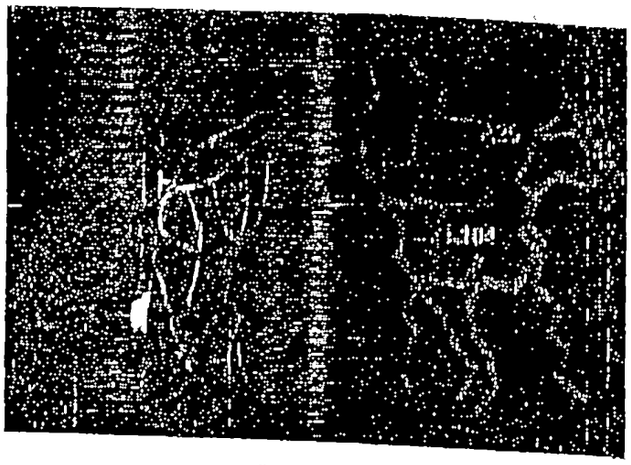


FIG. 26

655

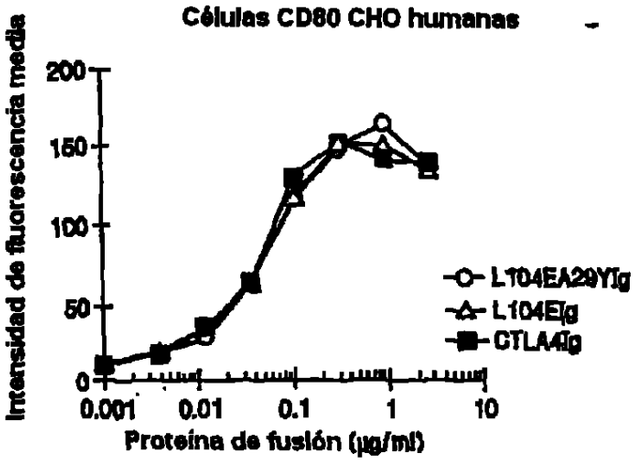


FIG. 27A

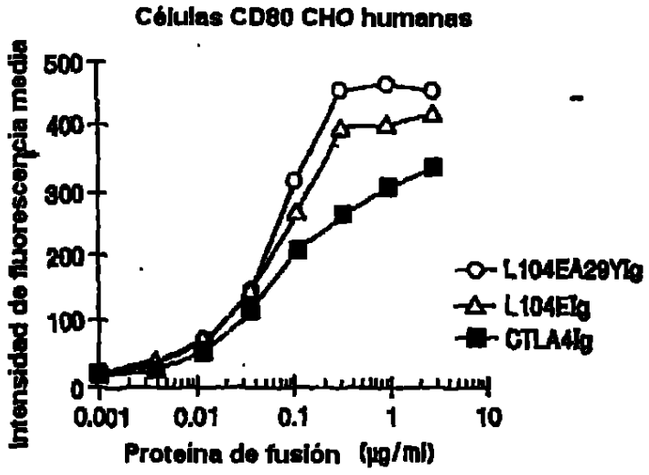


FIG. 27B

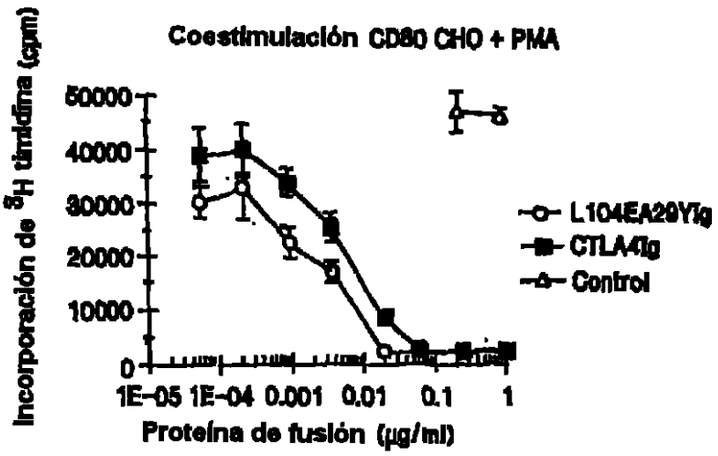


FIG. 28A

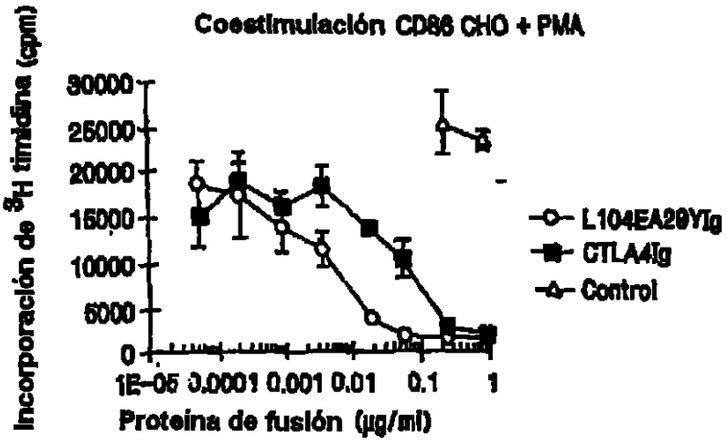


FIG. 28B

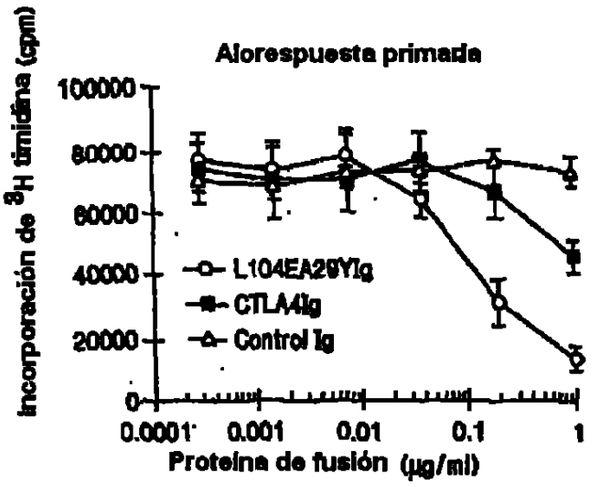


FIG. 29A

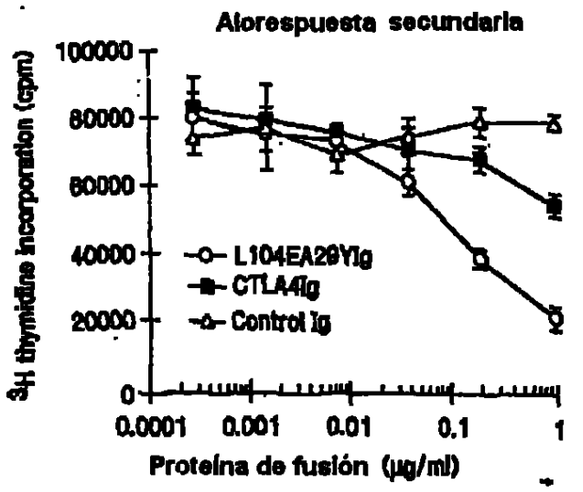


FIG. 29B

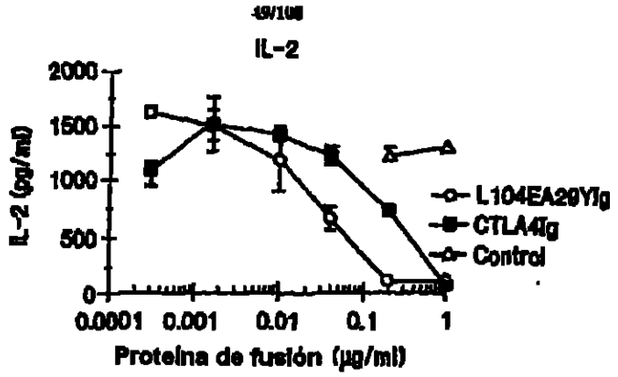


FIG. 30A

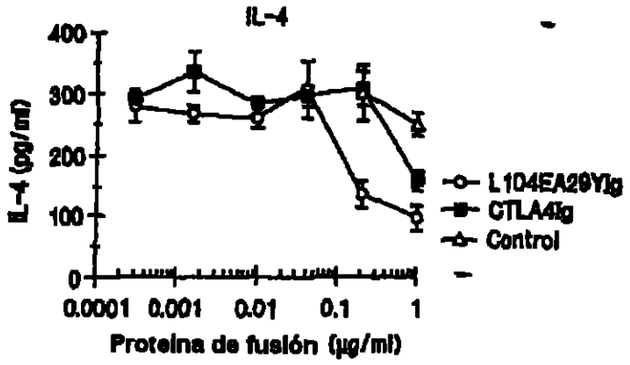


FIG. 30B

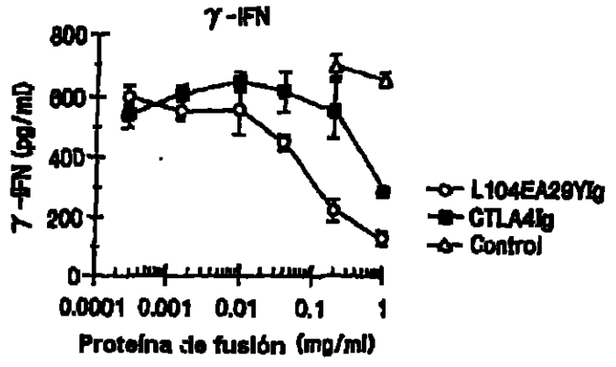


FIG. 30C

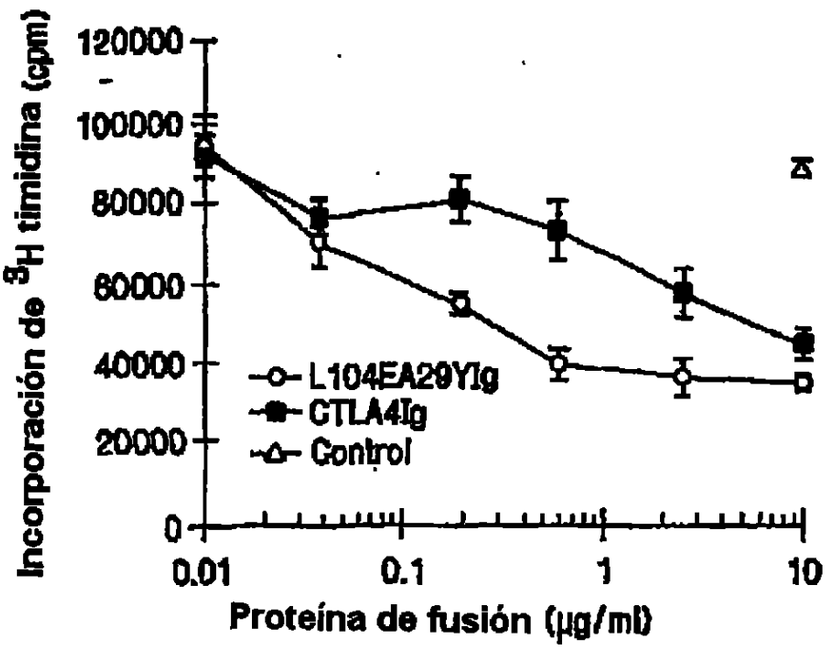

Incorporación de ^{3}H timidina (cpm)
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
Proteína de fusión (µg/ml)
L104EA29YIg
CTLA4Ig
Control

FIG. 31

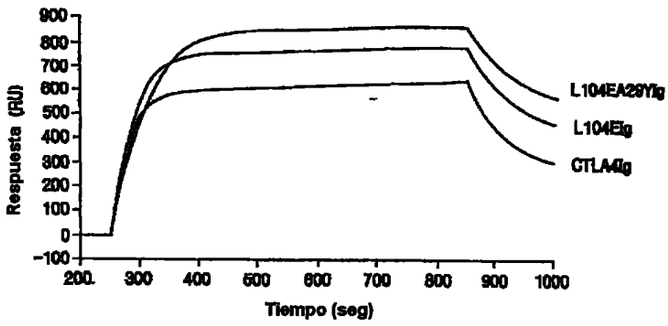

900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
Respuesta (RU)
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
Tiempo (seg)
L104EA29Yig
L104EIg
CTLA4Ig

FIG. 32

Figura 33B

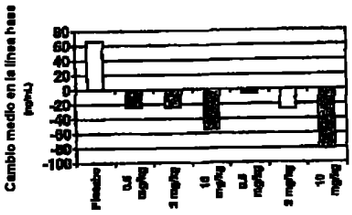


Figura 33A

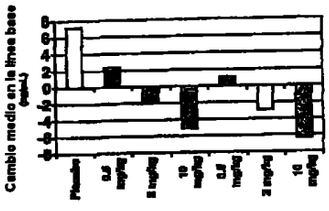


Figura 34

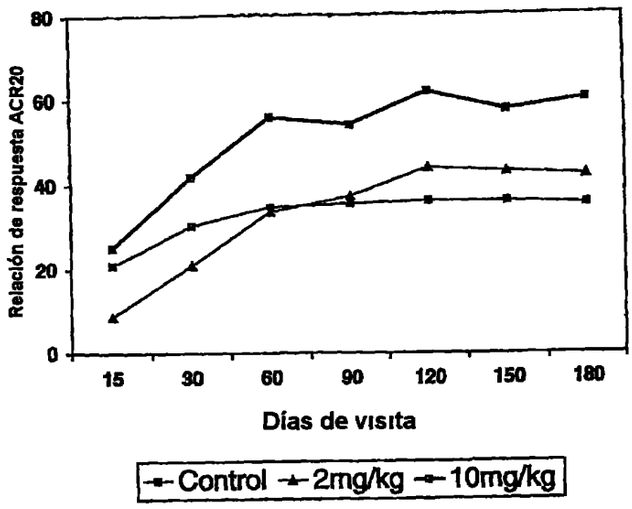

80
60
40
20
0
Relación de respuesta ACR20
15
30
60
90
120
150
180
Días de visita
Control
2mg/kg
10mg/kg

Figura 35

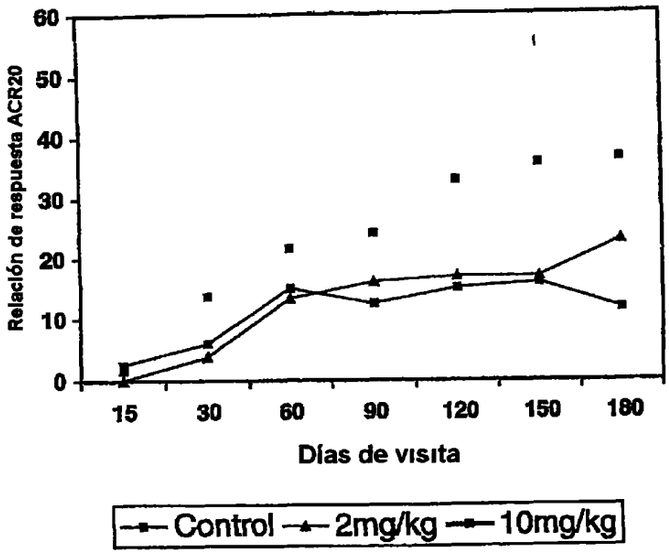

Relación de respuesta ACR20
60
50
40
30
20
10
0
15
30
60
90
120
150
180
Días de visita
Control
2mg/kg
10mg/kg

Figura 36

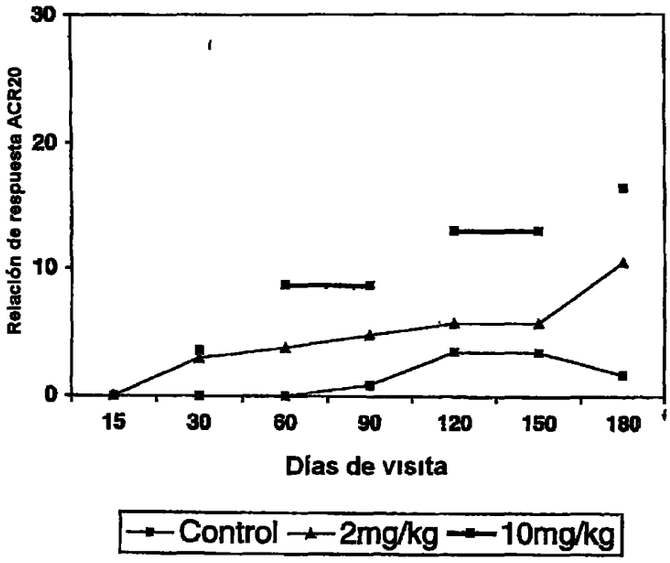
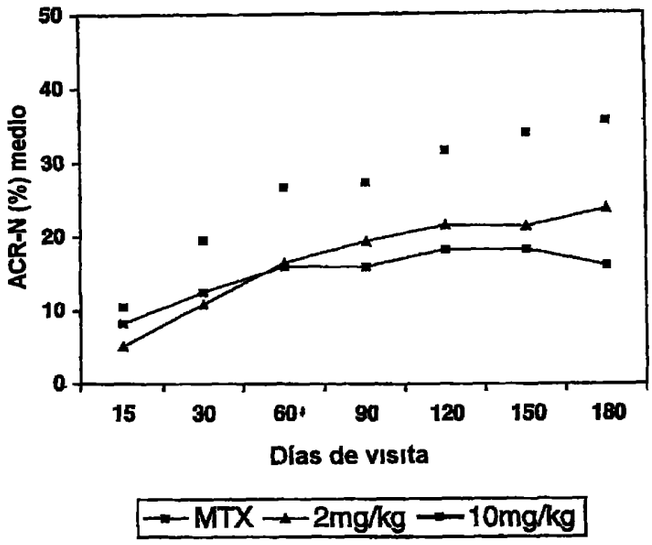

30
20
10
0
Relación de respuesta ACR20
15
30
60
90
120
150
180
Días de visita
Control
2mg/kg
10mg/kg

Figura 37


50
40
30
20
10
0
ACR-N (%) medio
15
30
60
90
120
150
180
Días de visita
MTX
2mg/kg
10mg/kg

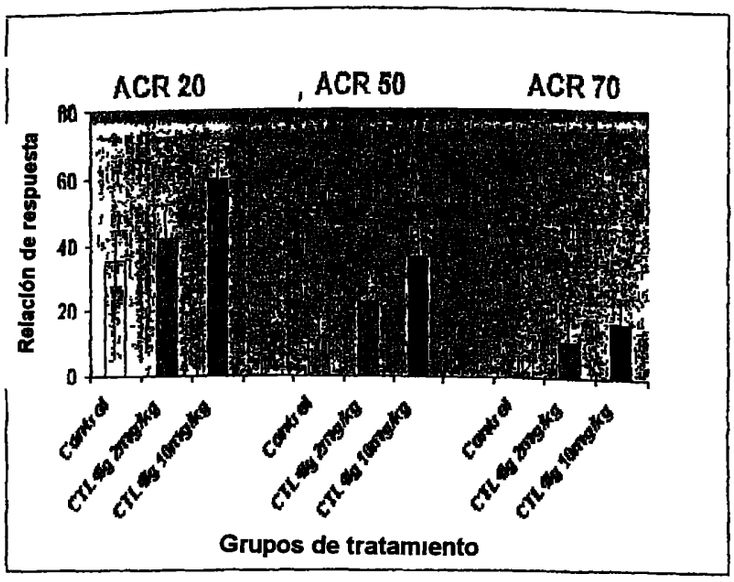

ACR 20
ACR 50
ACR 70
Relación de respuesta
80
60
40
20
0
Control
CTL 4g 2mg/kg
CTL 4g 10mg/kg
Grupos de tratamiento

Figura 38

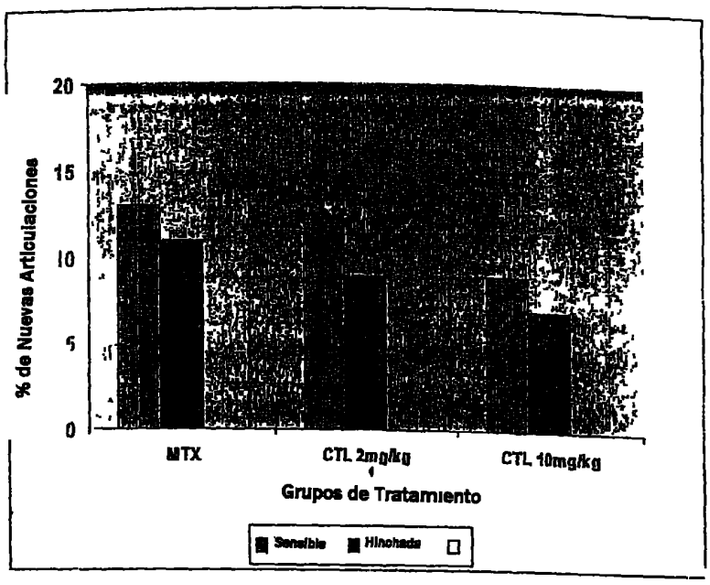

20
15
10
5
0
% de Nuevas Articulaciones
MTX
CTL 2mg/kg
CTL 10mg/kg
Grupos de Tratamiento
Sensible
Hinchada

Fig. 39

Figura 40.

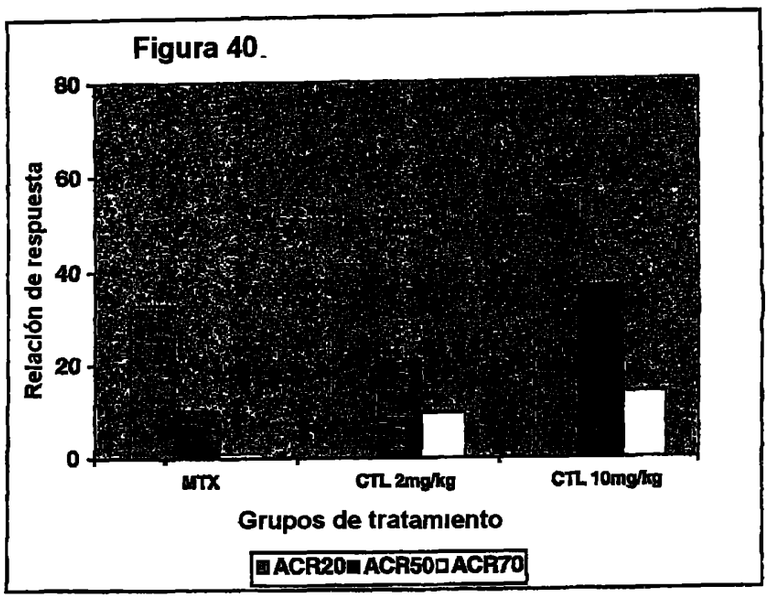

80
60
40
20
0
Relación de respuesta
MTX
CTL 2mg/kg
CTL 10mg/kg
Grupos de tratamiento
ACR20 ACR50 ACR70

Figura 41

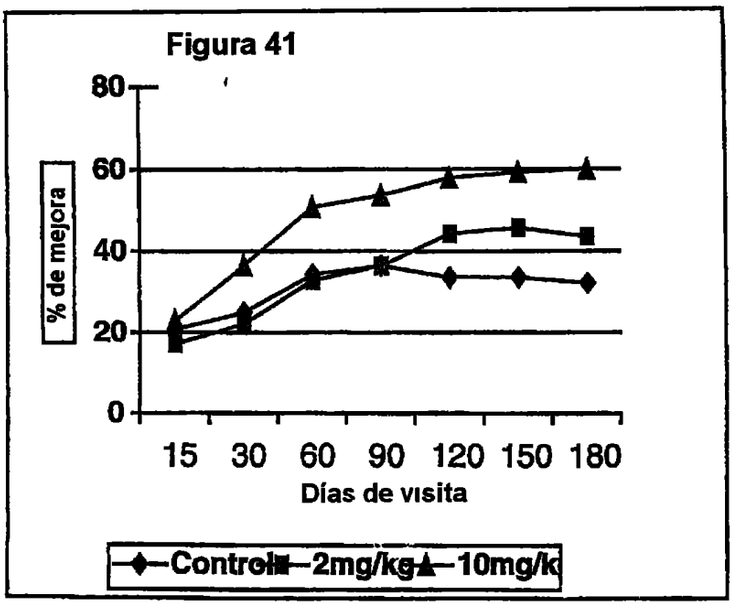

80
60
40
20
0
% de mejora
15 30 60 90 120 150 180
Días de visita
Control
2mg/kg
10mg/k

Figura 42

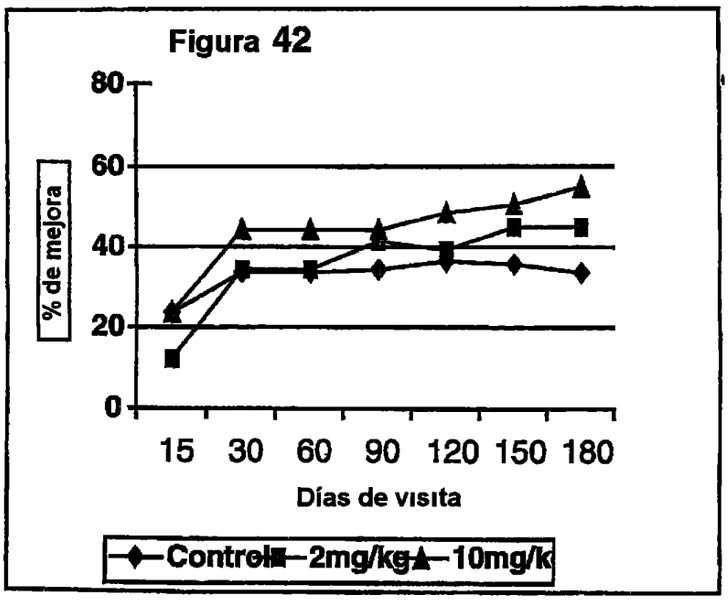

80
60
40
20
0
% de mejora
15 30 60 90 120 150 180
Días de visita
Control
2mg/kg
10mg/k

Figura 43

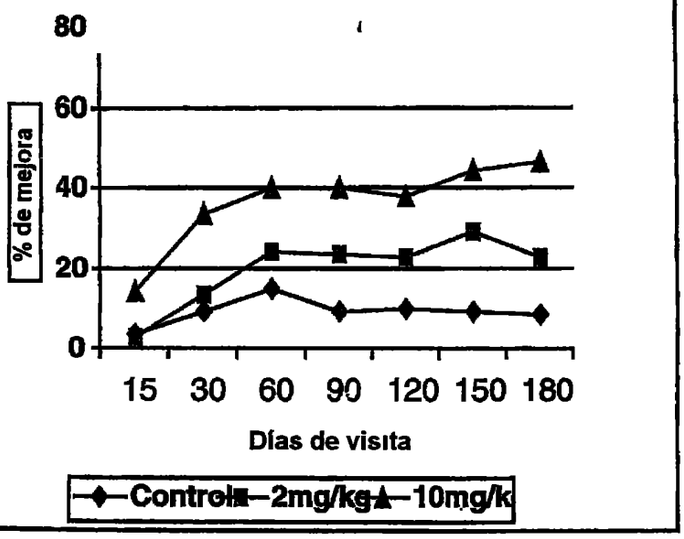

80
60
40
20
0
% de mejora
15 30 60 90 120 150 180
Días de visita
Control 2mg/kg 10mg/k

Figura 44

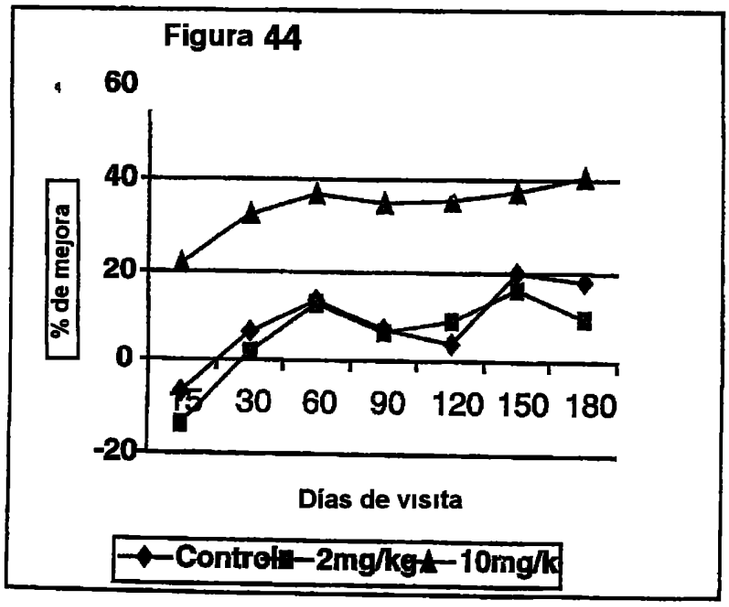

60
40
20
0
-20
% de mejora
15
30
60
90
120
150
180
Días de visita
Control
2mg/kg
10mg/k

Figura 45

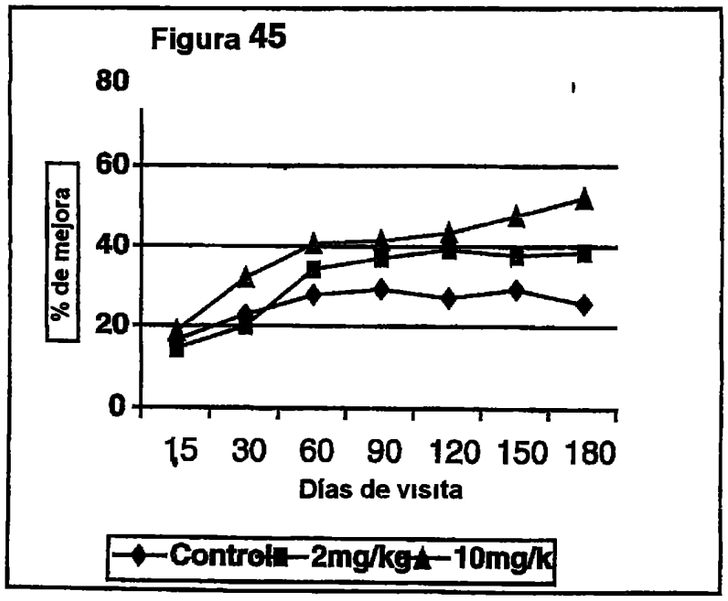

80
60
40
20
0
% de mejora
15 30 60 90 120 150 180
Días de visita
Control
2mg/kg
10mg/k

Figura 46

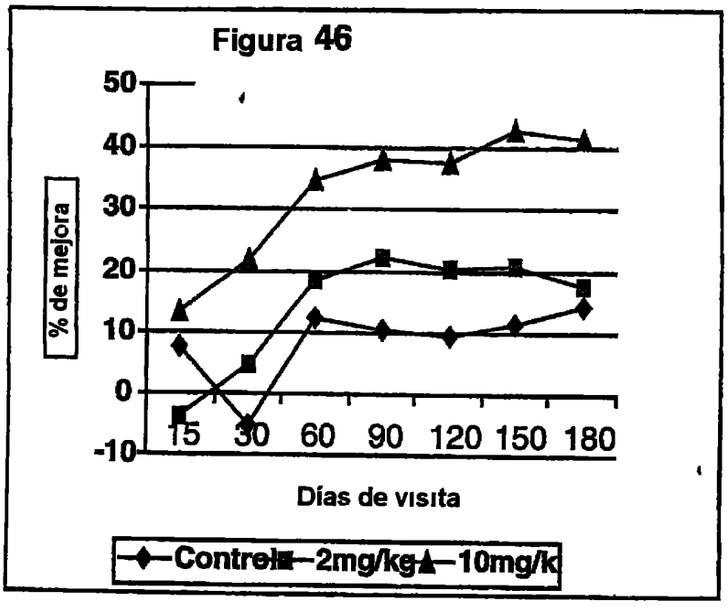

50
40
30
20
10
0
-10
% de mejora
15
30
60
90
120
150
180
Días de visita
Control
2mg/kg
10mg/k

Figura 47

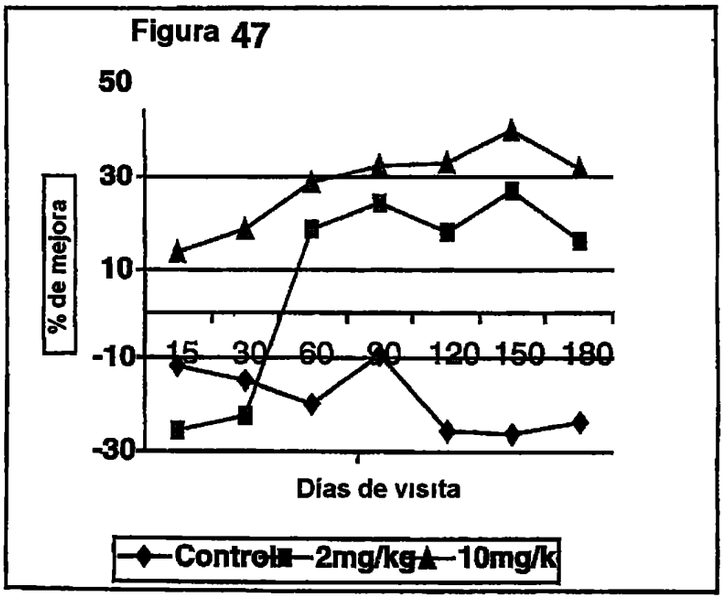

50
30
10
-10
-30
% de mejora
15
30
60
90
120
150
180
Días de visita
Control
2mg/kg
10mg/k

Figura 48

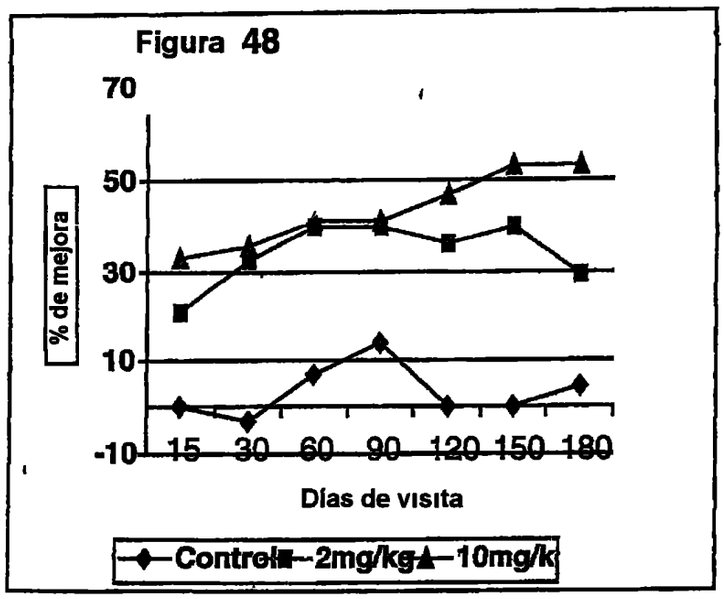

70
50
30
10
-10
% de mejora
15 30 60 90 120 150 180
Días de visita
Control 2mg/kg 10mg/k

Figura 49

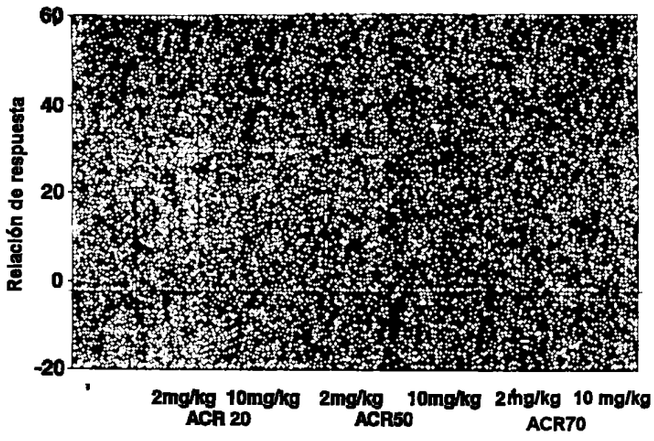

60
40
20
0
-20
Relación de respuesta
2mg/kg
10mg/kg
ACR 20
2mg/kg
10mg/kg
ACR50
2mg/kg
10 mg/kg
ACR70

Figura 50

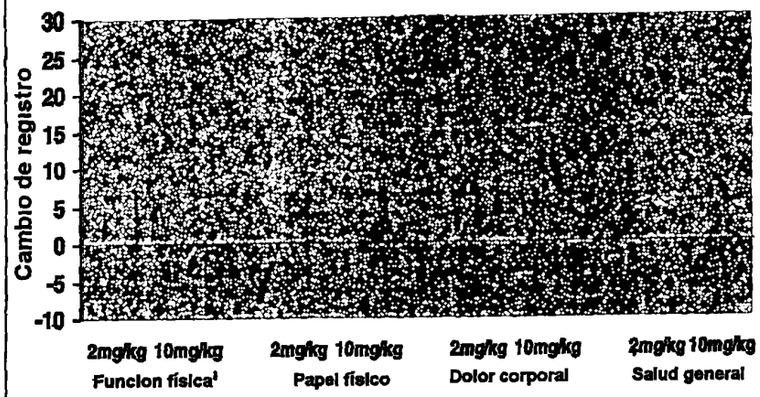

Cambio de registro
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
2mg/kg 10mg/kg
Funcion física¹
2mg/kg 10mg/kg
Papel físico
2mg/kg 10mg/kg
Dolor corporal
2mg/kg 10mg/kg
Salud general

Figura 51

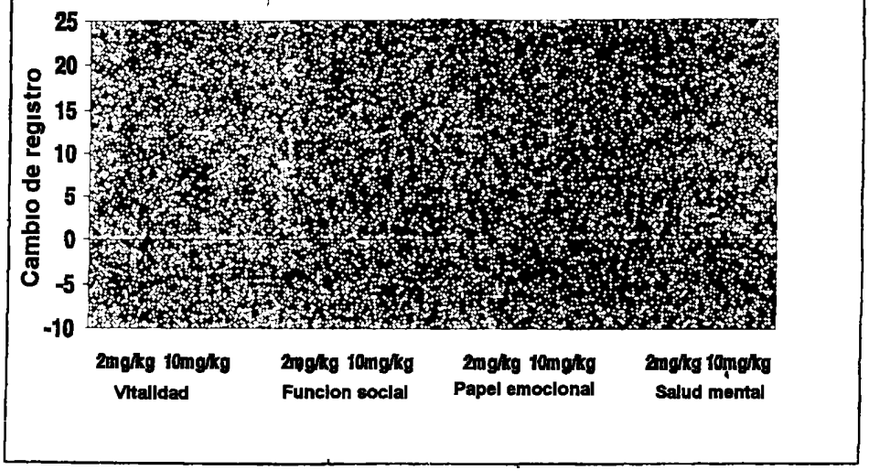

Cambio de registro
25
20
15
10
5
0
-5
-10
2mg/kg 10mg/kg
Vitalidad
2mg/kg 10mg/kg
Funcion social
2mg/kg 10mg/kg
Papel emocional
2mg/kg 10mg/kg
Salud mental

Figura 52

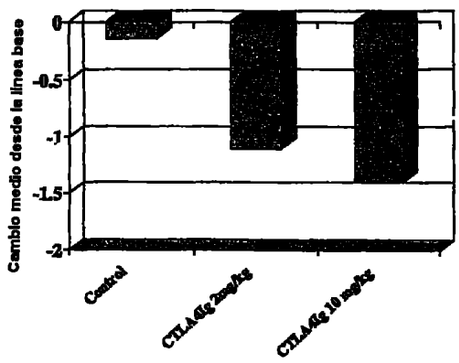

Cambio medio desde la línea base
0
-0.5
-1
-1.5
-2
Control
CTLA4Ig 2mg/kg
CTLA4Ig 10 mg/kg

Figura 53

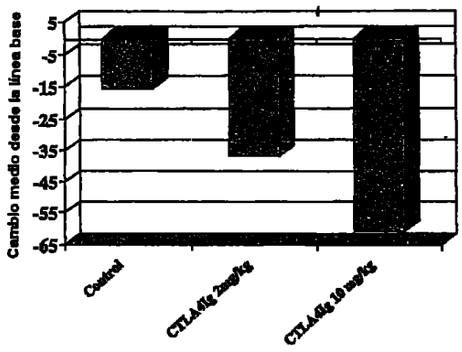
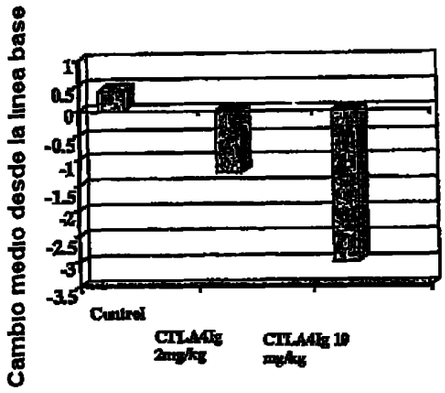

Cambio medio desde la línea base
5
-5
-15
-25
-35
-45
-55
-65
Control
CTLA4Ig 2mg/kg
CTLA4Ig 10 mg/kg

Figura 54



7/31/98

Figura 55

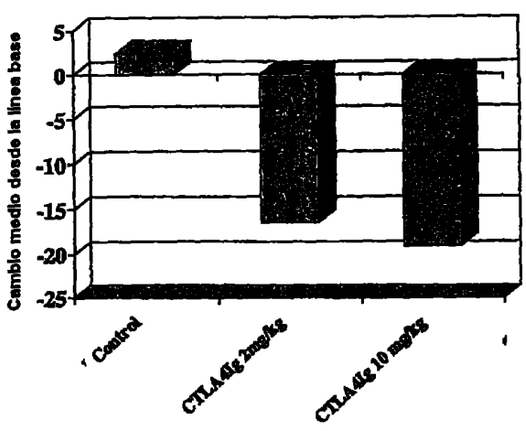
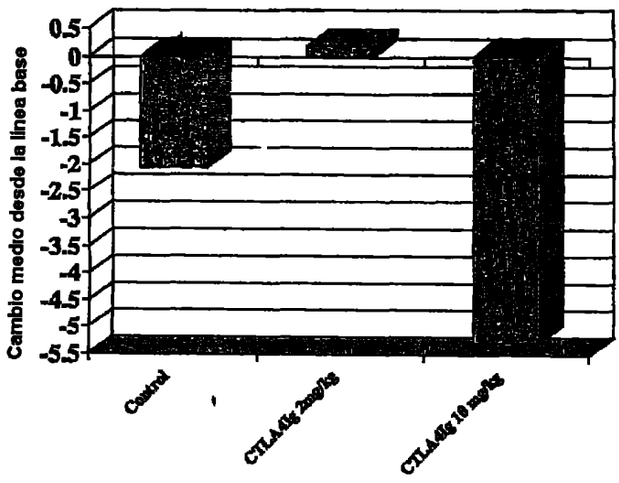

Cambio medio desde la línea base
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
Control
CTLA4Ig 2mg/kg
CTLA4Ig 10 mg/kg

Figura 56.


Cambio medio desde la línea base
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
-2
-2.5
-3
-3.5
-4
-4.5
-5
-5.5
Control
CTLA4Ig 2mg/kg
CTLA4Ig 10 mg/kg

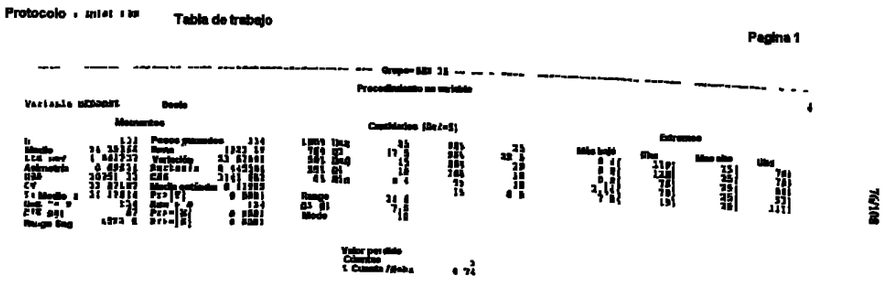

Protocolo
Tabla de trabajo
Pagina 1
Procedimiento en variable
Variable
Desde
Momentos
Cuantiles (Def=5)
Extremos

Figura 57

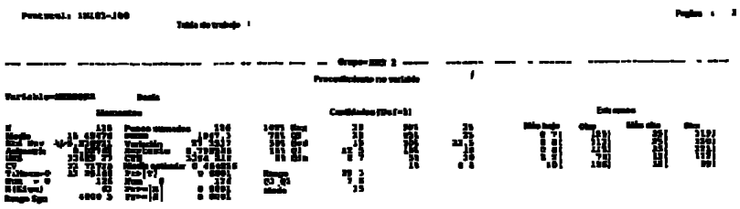


Figura 58

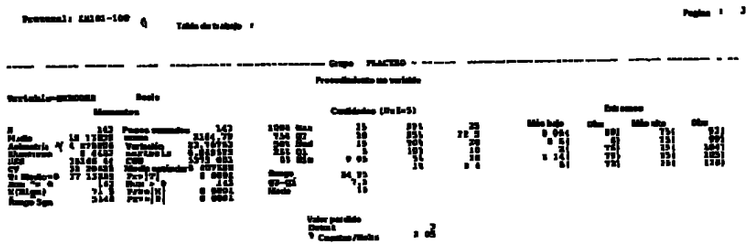


Figura 59

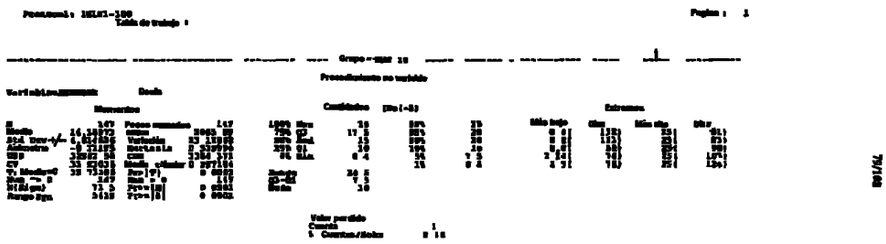
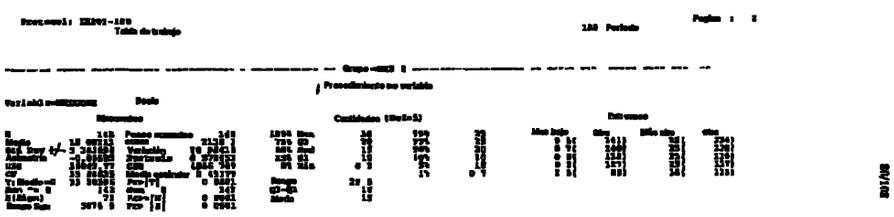


Figura 60



RG 61

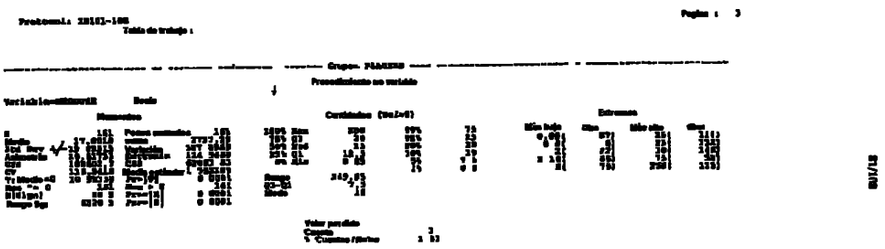
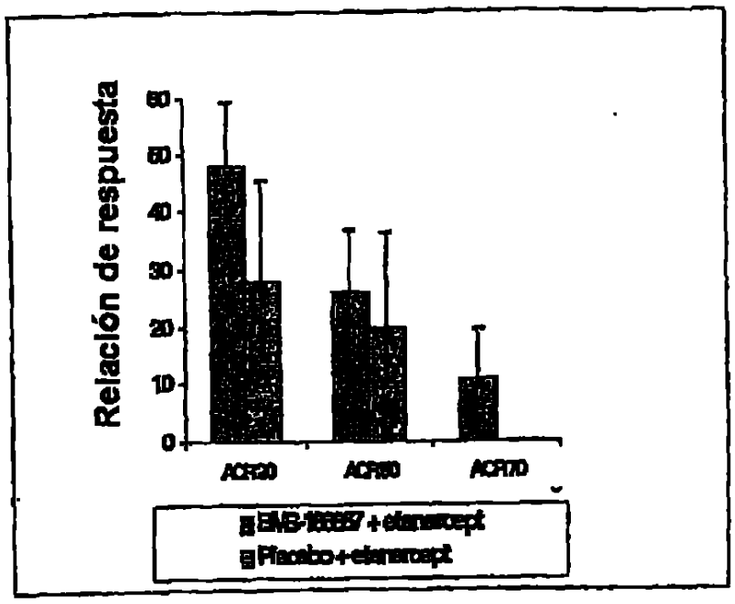


Figura 62

Figura 63:



*** Ver criterios para evaluación**

Fig. 64a

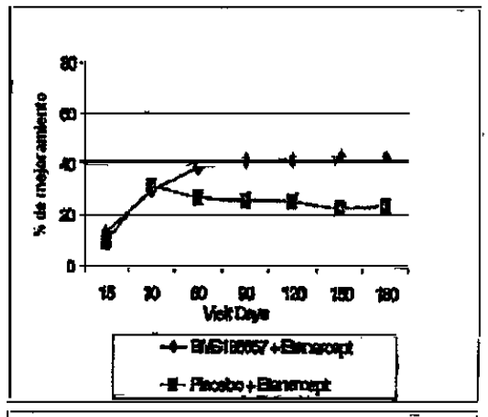


Fig 64b

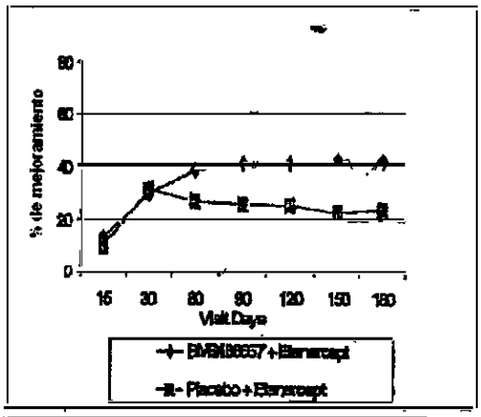


Fig 64c

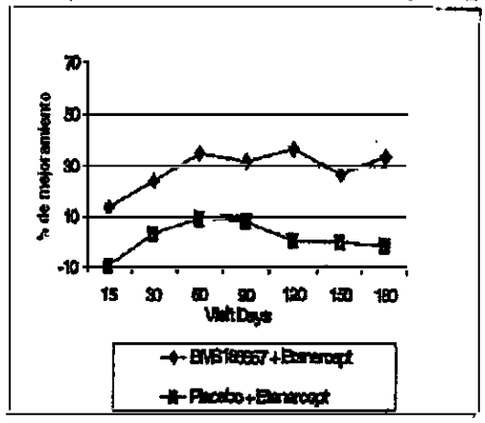


FIG. 65A

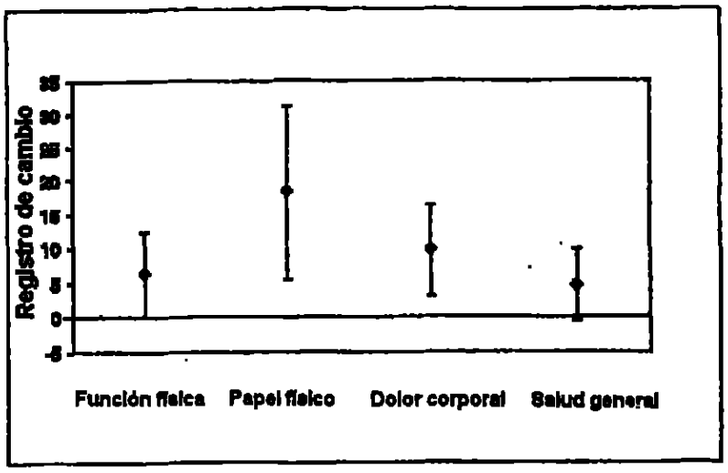
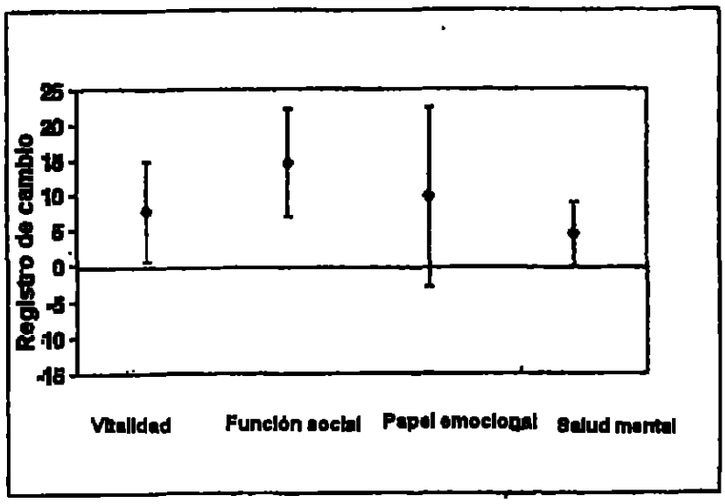


FIG. 65B



694



Fig 66

```
MGVLLTQRTL LSIVLALLFS SQASWAMEVA QPAVVLASSR GIASFVCEYA   50
SPGKATEVRV TVLRQADSQV TEVCAATYMM GNELTFLDDS ICTGTSSGNQ  100
VNLTIQGLRA MDTGLYICKV ELMYPPPYYL GIGNGTQIYV IDPEPCPDSD  150
QEPKSSDKTH TSPPSPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV  200
DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL  250
NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS  300
LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK  350
SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
```

Fig 67

Figura 68:

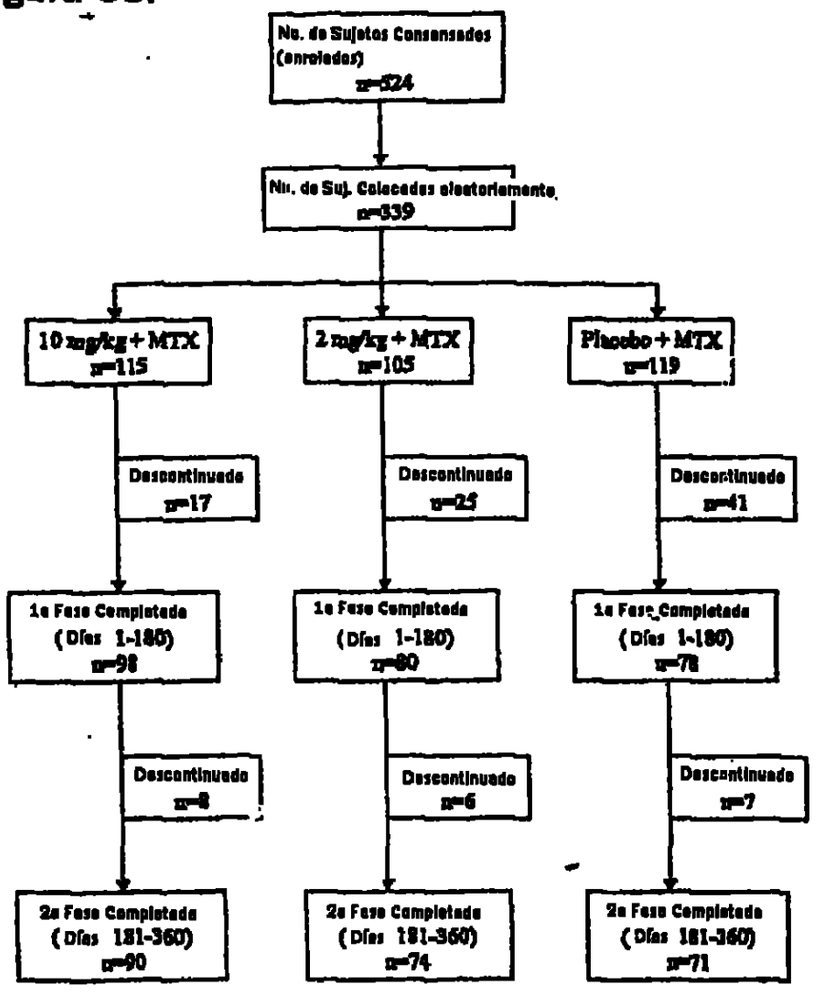

No. de Sujetos Consensados (enrolados) n=524
No. de Suj. Colocados aleatoriamente n=339
10 mg/kg + MTX n=115
2 mg/kg + MTX n=105
Placebo + MTX n=119
Descontinuado n=17
Descontinuado n=25
Descontinuado n=41
1a Fase Completada (Días 1-180) n=98
1a Fase Completada (Días 1-180) n=80
1a Fase Completada (Días 1-180) n=78
Descontinuado n=8
Descontinuado n=6
Descontinuado n=7
2a Fase Completada (Días 181-360) n=90
2a Fase Completada (Días 181-360) n=74
2a Fase Completada (Días 181-360) n=71

Figura 69

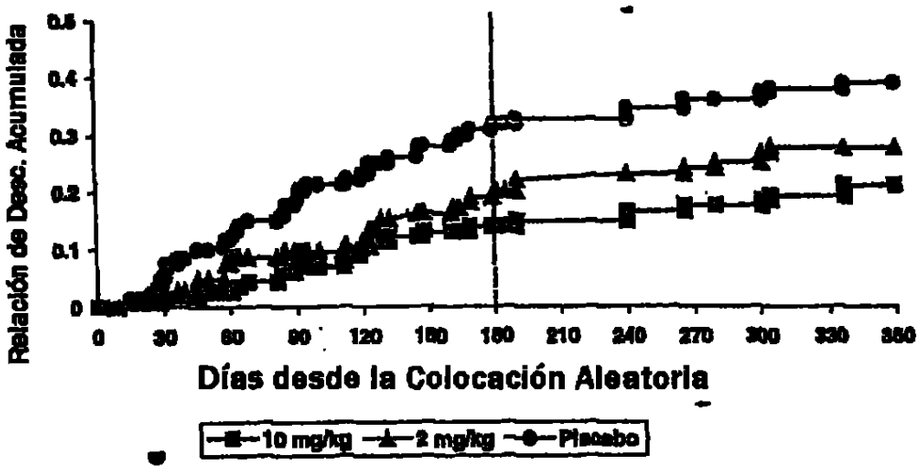

Relación de Desc. Acumulada
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
330
360
Días desde la Colocación Aleatoria
10 mg/kg
2 mg/kg
Placebo

Figura 70

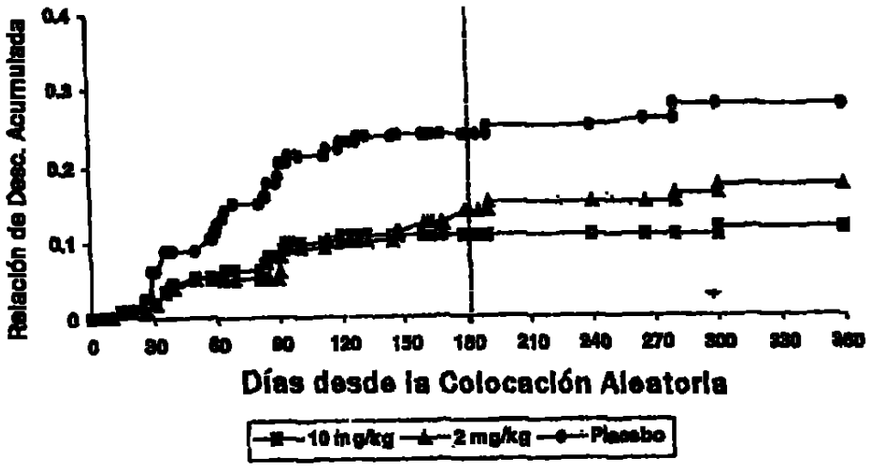
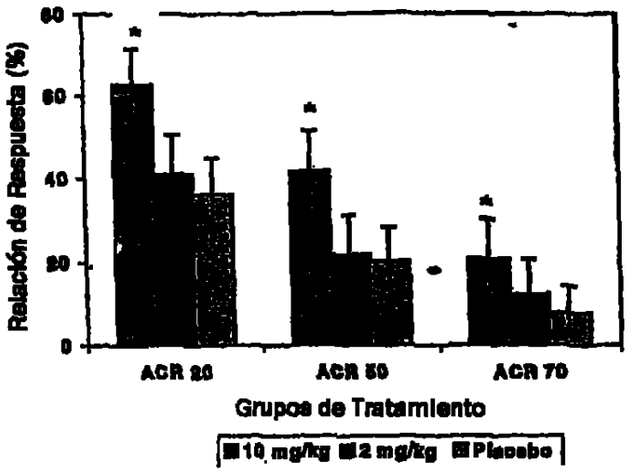

Relación de Desc. Acumulada
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
330
360
Días desde la Colocación Aleatoria
10 mg/kg
2 mg/kg
Placebo

Figura 72A



* Indica un resultado significativamente importante para comparar 10mg/kg vs placebo

Figura 72B

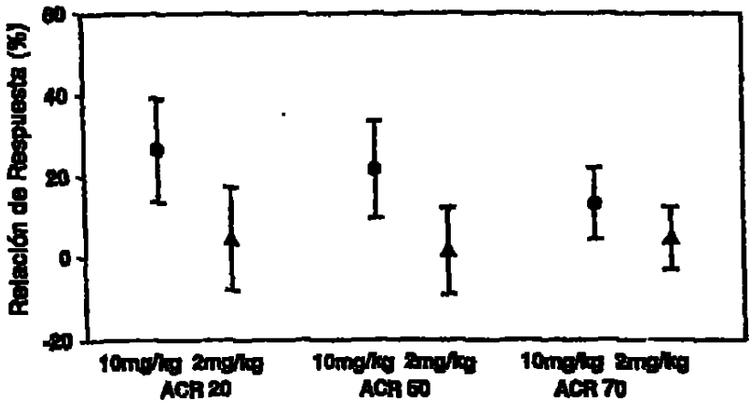


Figura 73A

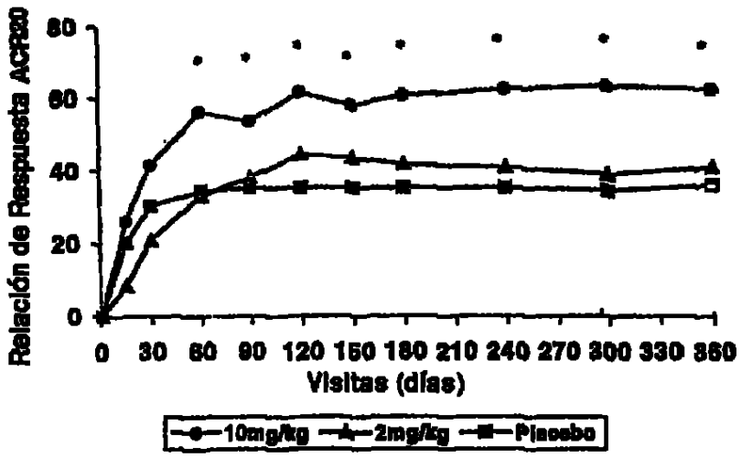


Figura 73B

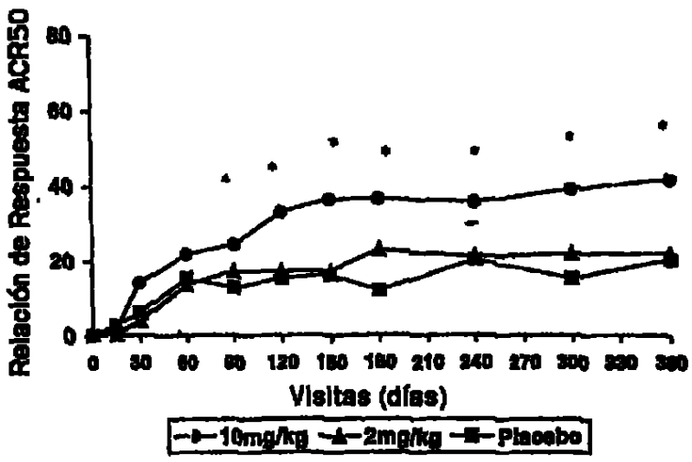
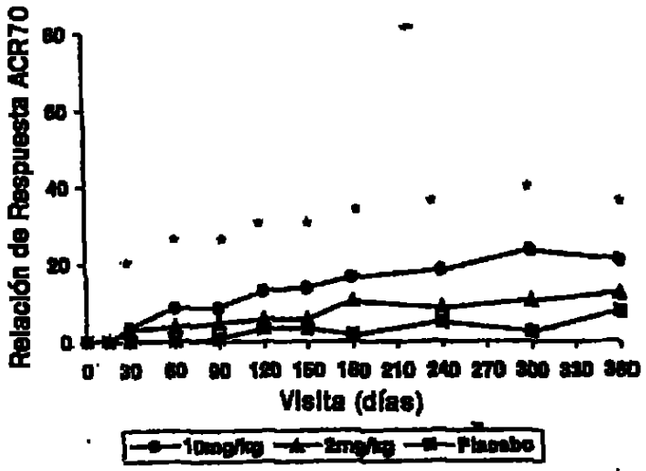
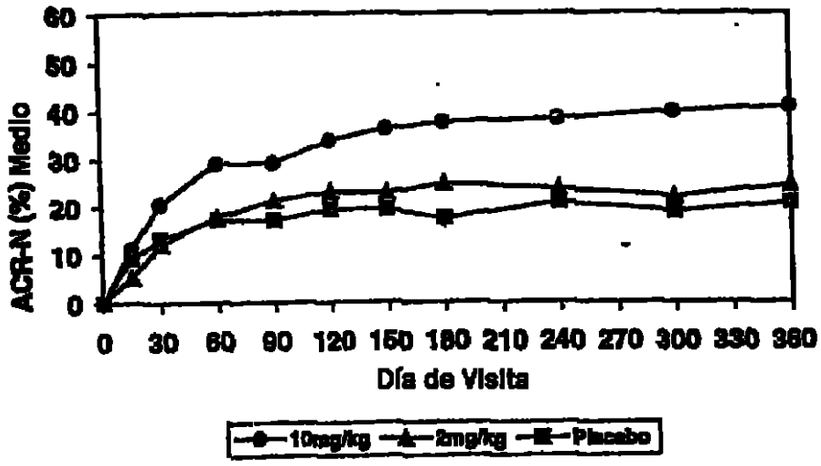


Figura 73C



*Indica una diferencia estadísticamente importante para la comparación de 10 mg/kg vs placebo

Figura 74



*Indica una diferencia estadísticamente importante para la comparación de 10 mg/kg vs placebo

Figura 75

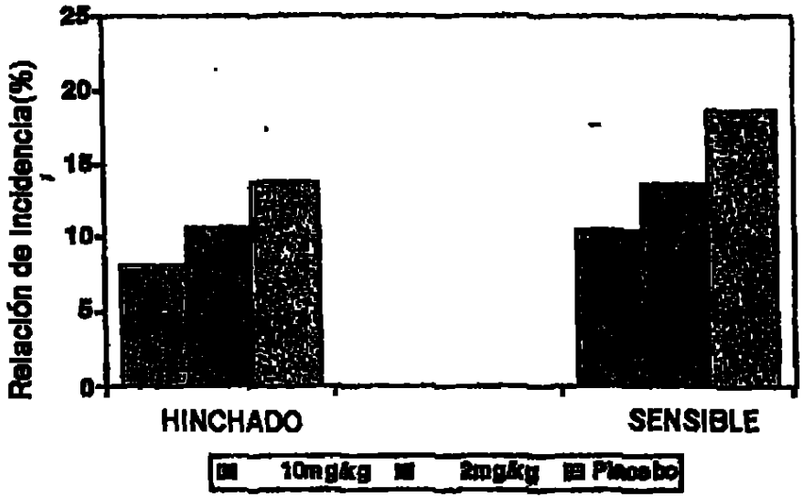

Relación de Incidencia(%)
25
20
15
10
5
0
HINCHADO
SENSIBLE
10mg/kg
2mg/kg
Placebo

Figura 76A

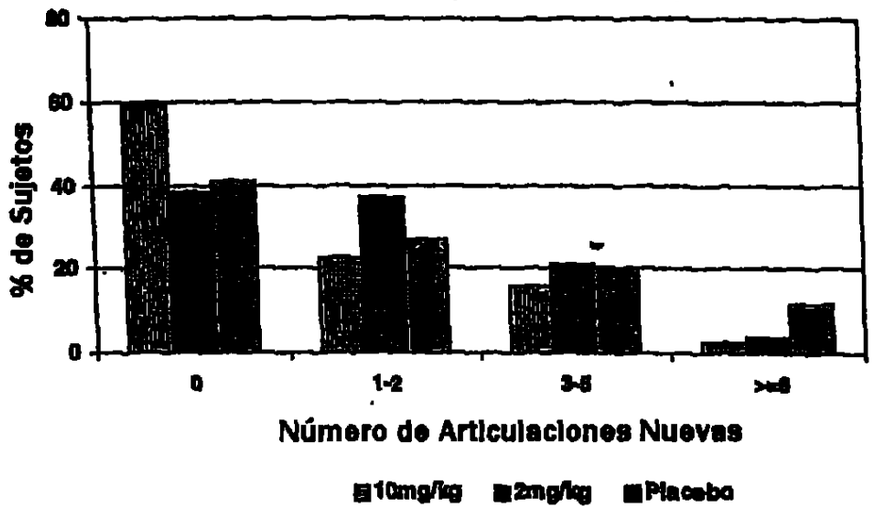


Figura 76B

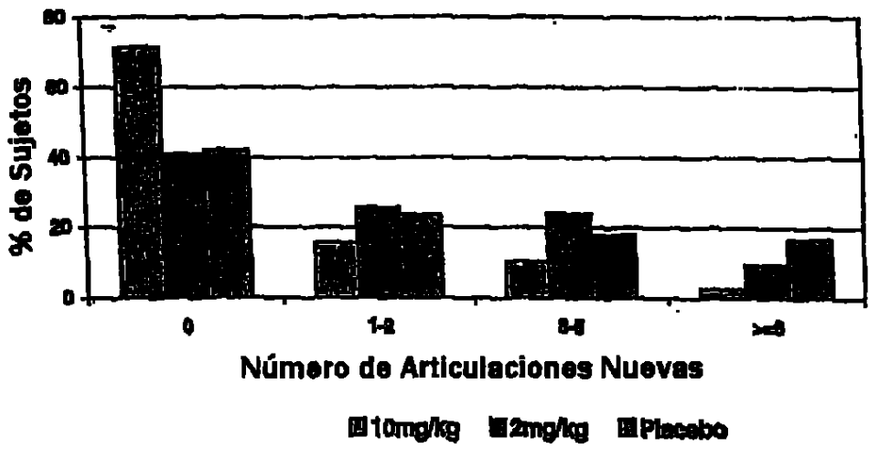


Figura 77A

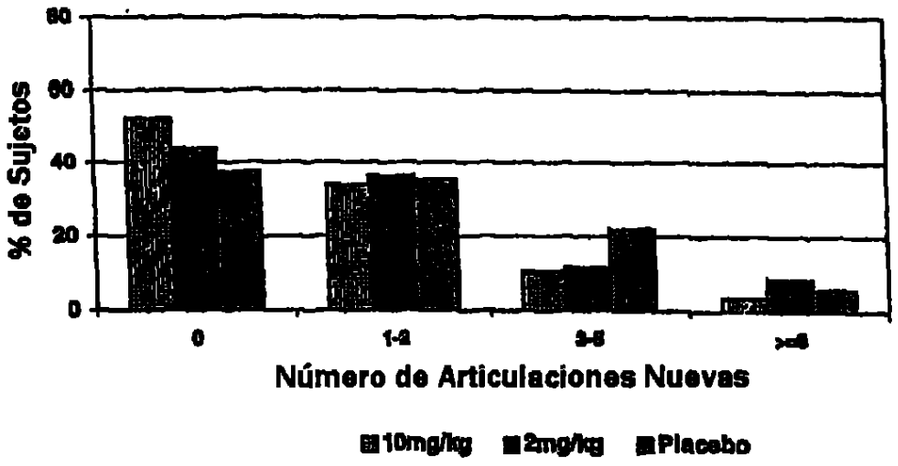


Figura 77B

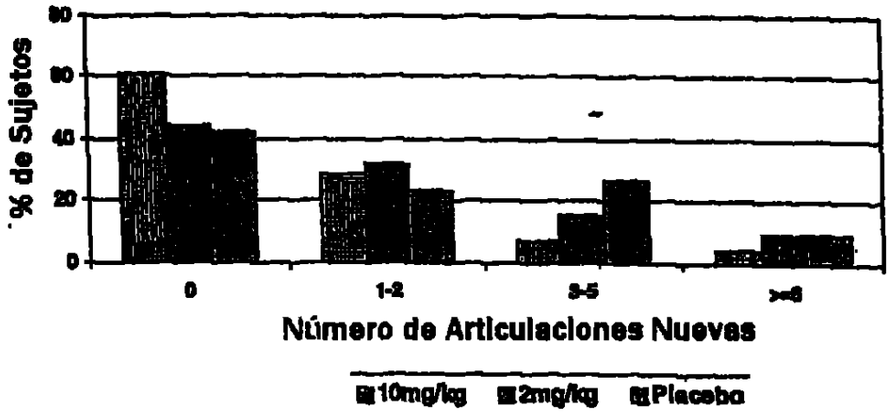


Figura 79

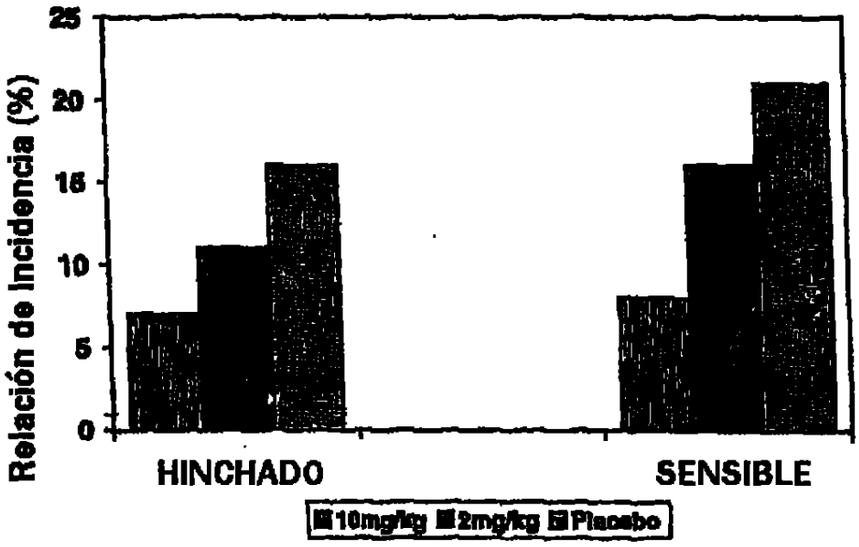

25
20
15
10
5
0
Relación de incidencia (%)
HINCHADO
SENSIBLE
10mg/kg
2mg/kg
Placebo

Figura 79A

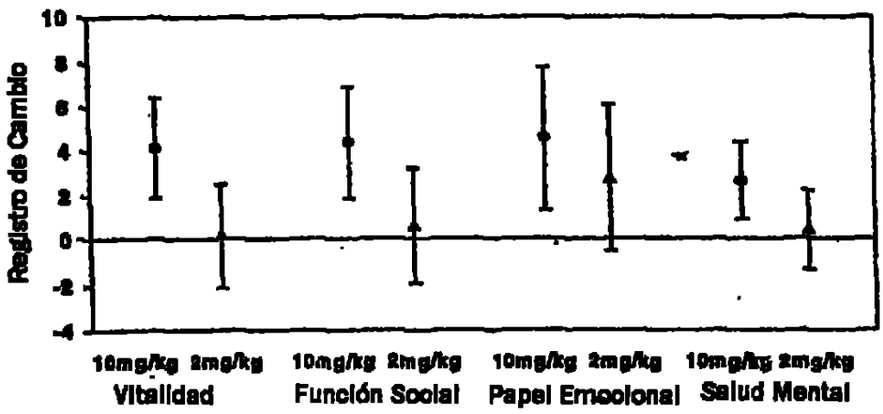


Figura 79B

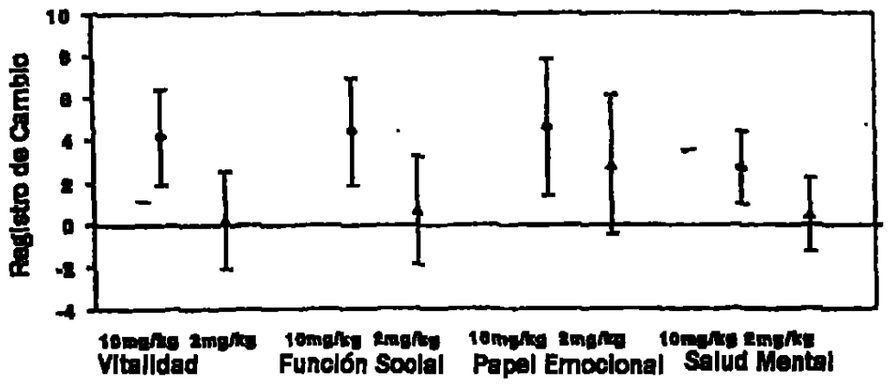


Figura 80A

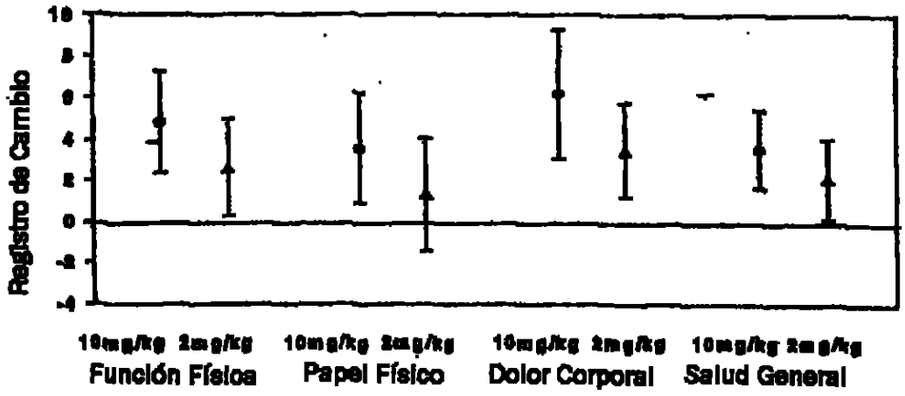


Figura 80B

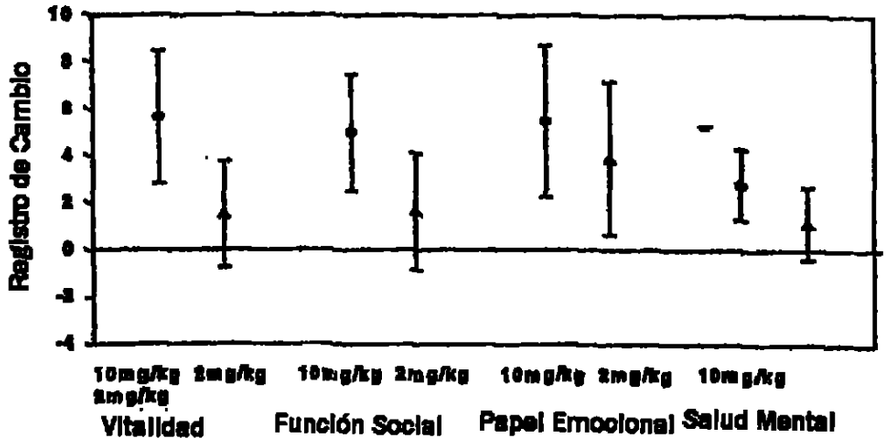


Figura 81

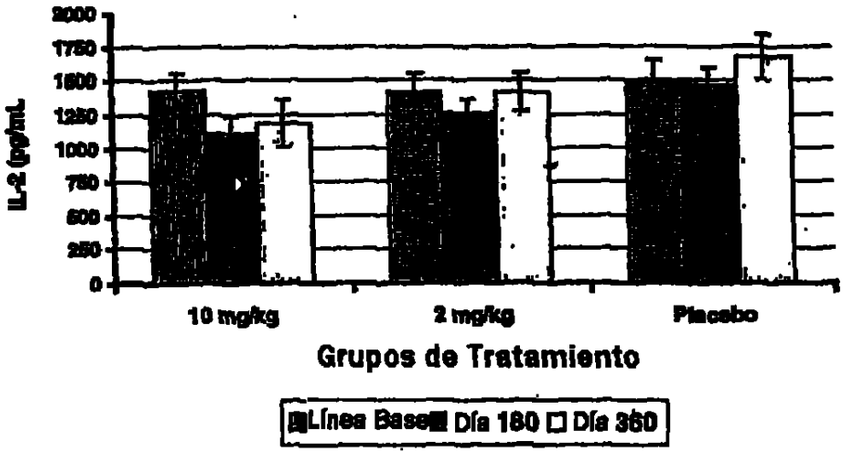

2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
IL-2 (pg/mL
10 mg/kg
2 mg/kg
Placebo
Grupos de Tratamiento
Línea Base
Día 180
Día 360

Figura 82

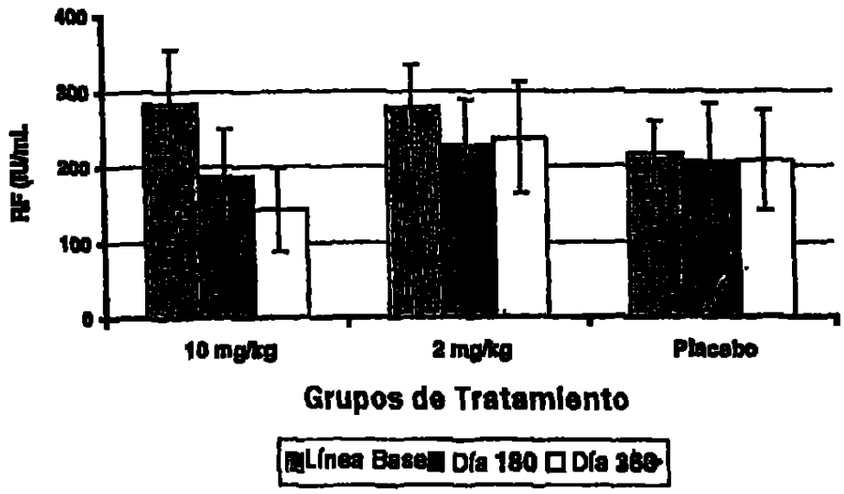

400
300
200
100
0
RF (UI/mL
10 mg/kg
2 mg/kg
Placebo
Grupos de Tratamiento
Línea Base
Día 180
Día 360

Figura 83

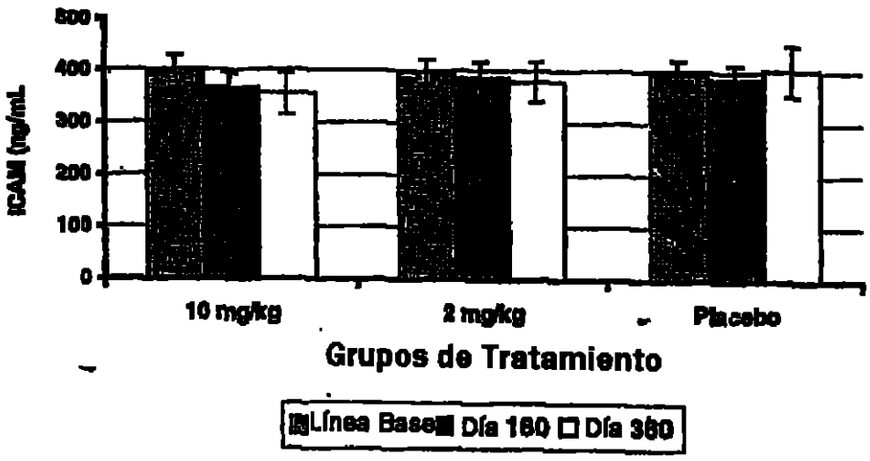

ICAM (ng/mL
800
400
300
200
100
0
10 mg/kg
2 mg/kg
Placebo
Grupos de Tratamiento
Línea Base
Día 180
Día 360

Figura 84

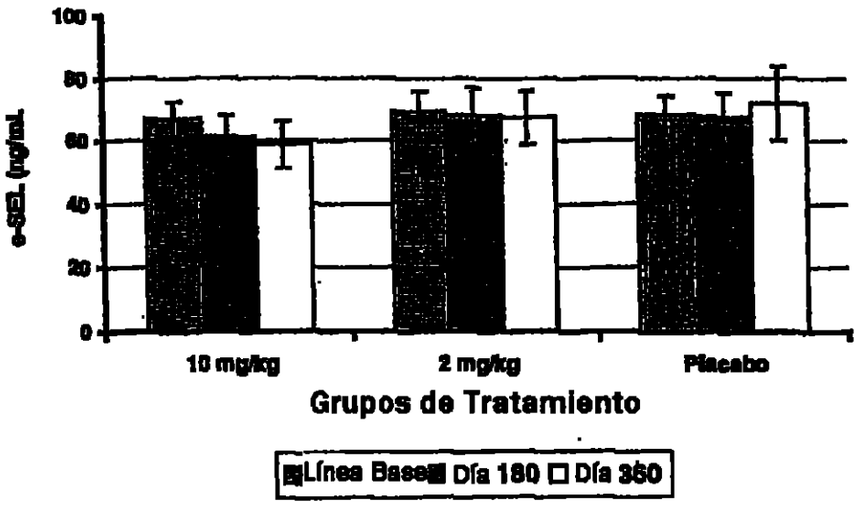

100
80
60
40
20
0
e-SEL (ng/mL
10 mg/kg
2 mg/kg
Placebo
Grupos de Tratamiento
Línea Base
Día 180
Día 360

Figura 85

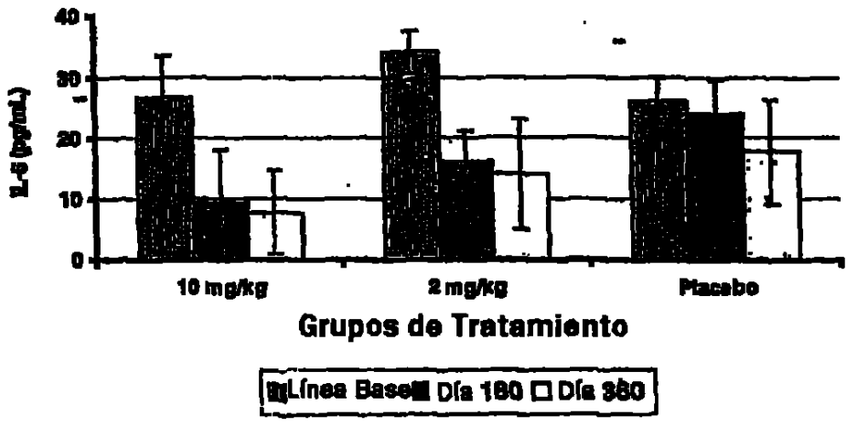

40
30
20
10
0
IL-6 (pg/mL)
10 mg/kg
2 mg/kg
Placebo
Grupos de Tratamiento
Línea Base
Día 180
Día 360

Figura 86A:

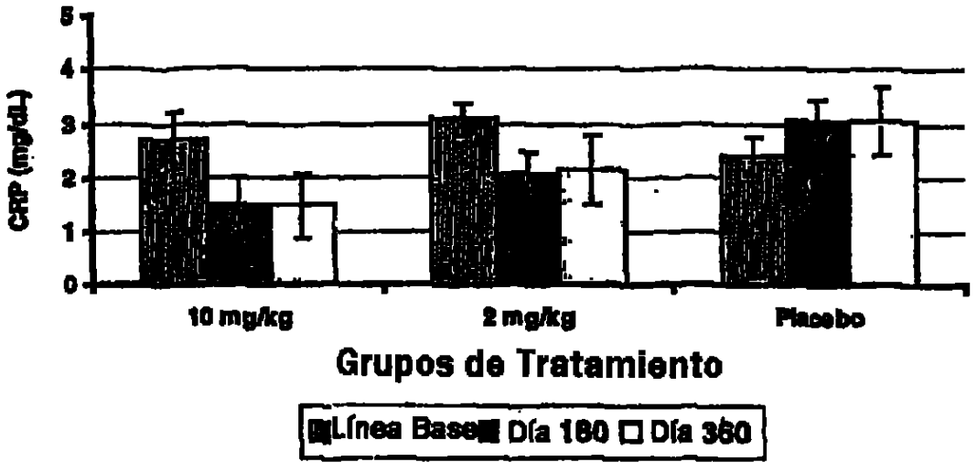
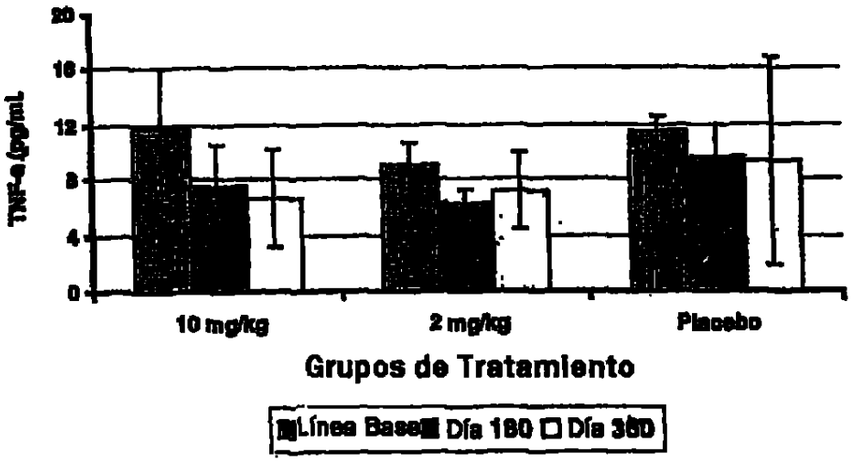

CRP (mg/dL)
0
1
2
3
4
5
10 mg/kg
2 mg/kg
Placebo
Grupos de Tratamiento
Línea Base
Día 180
Día 360

Figura 86B


20
16
12
8
4
0
TNF-α (pg/mL)
10 mg/kg
2 mg/kg
Placebo
Grupos de Tratamiento
Línea Base
Día 180
Día 360

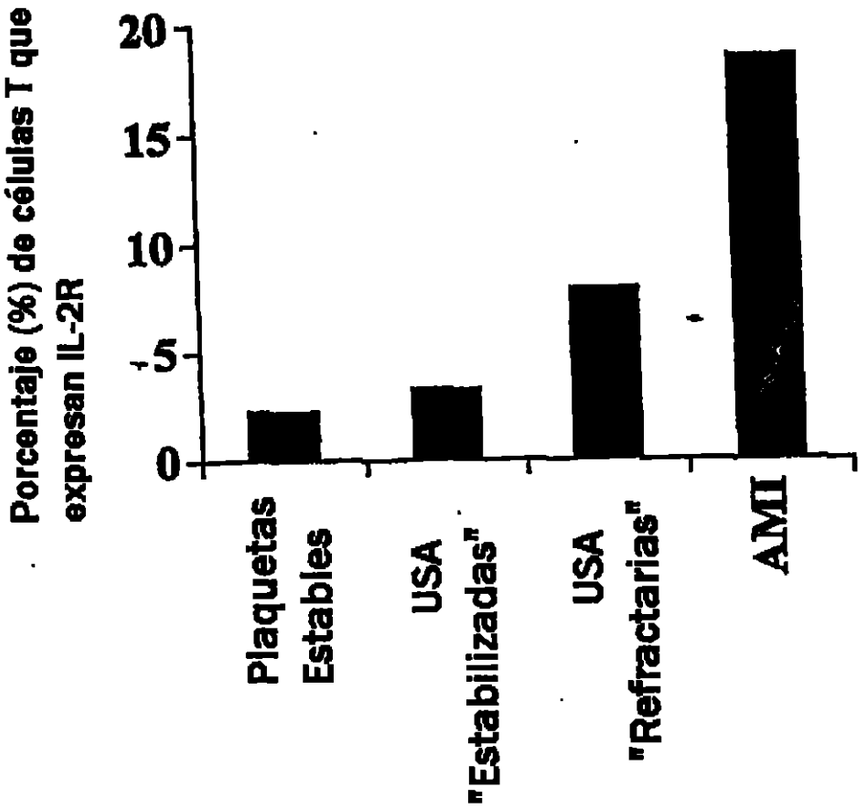

Porcentaje (%) de células T que expresan IL-2R
20
15
10
5
0
Plaquetas Estables
USA "Estabilizadas"
USA "Refractarias"
AMI

FIG. 87

TRATADO DE C OPERACION EN MATERIA DE PATENTES

PCT

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
(Artículo 18 y Reglas 43 y 44 del PCT)

Referencia al expediente del solicitante o del mandatario D0340 PCT	PARA ACCION ADICIONAL	ver Notificación de la Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, en donde aplique el inciso 5 posterior
No. de solicitud internacional PCT/US04/24840	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 03 de Agosto 2004 (03.08.2004)	(Fecha de Prioridad) (La más cercana) (día/mes/año) 04 de Agosto 2003 (04.08.2003)
Solicitante BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY		

Este reporte de búsqueda internacional ha sido preparado por esta Autoridad de la Búsqueda Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 18. Se transmite una copia a la Oficina Internacional.

Este reporte de búsqueda internacional consiste de un total de 2 hojas

☒. También está acompañado de una copia de cada documento de la técnica anterior citado en este reporte.

1. **Bases del reporte.**
   a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional se ha llevado a cabo en base a la solicitud internacional en el lenguage en el que se presentó, salvo que se indique lo contrario bajo este punto.

   ☐ La búsqueda internacional se ha llevado a cabo en base a la traducción de la solicitud internacional presentada a esta autoridad (Regla 23.1(b)).

   b. ☐ Con respecto a cualquier secuencia de aminoácido y/o nucleótido descrito en la solicitud internacional, ver Cuadro No. I

2. ☐ **Ciertas reivindicaciones no son localizables** (ver el Cuadro I).

3. ☐ **La unidad de la invención es deficiente** (ver el Cuadro II).

4. Con respecto al título,

   ☒ el texto se aprueba tal como lo presentó el solicitante,

   ☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto sea como sigue:

5. Con respecto al resumen,

   ☒ el texto se aprueba tal como lo presentó el solicitante.

   ☐ esta Autoridad ha establecido el texto, de acuerdo con la Regla 38.2(b), tal como aparece en el Cuadro IV. El solicitante puede, dentro de un mes a partir de la fecha de envío por correo de este reporte de búsqueda internacional, proporcionar comentarios a esta autoridad.

6. Con respecto a los dibujos
   a. La figura de los dibujos que se va a publicar con el resumen es la Figura No . _____ .

   ☐ como lo sugirió el solicitante.

   como se selecciona por esta Autoridad, porque al solicitante le faltó sugerir una figura.

   como se selecciona por esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor la invención.

   b. ☒ Ninguna de las figuras se pueden publicar con el resumen.

719

A. CLASIFICACION DEL ASUNTO RELACIONADO
IPC (7) : A61K 38/17, 38/385.
US CL. : 514/21; 424/134.J.
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o tanto la clasificación nacional como la IPC.

B. CAMPOS BUSCADOS
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por los símbolos de clasificación)
U.S. : 514/21; 424/1634.I.
Documentación buscada diferente de la documentación mínima, al grado que estos documentos se incluyen en los campos buscados.

Base de datos, electrónica, consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, donde se puede practicar, términos de búsqueda usados).
WEST, Dialog, PALM.

C. DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERAN PERTINENTES

Categoría*	Citación del documento, con indicación, donde es apropiado, de los pasajes pertinentes	Pertinente para la reivindicación No
X	US 5,916,560 (LARSEN et al.,) 29 Junio 1999, ver documento completo; en particular, por ejemplo columna 9 líneas 6 – 27 y Ejemplo 6 a columnas 15 – 19.	1-16, 19, 21-23
Y		17-18, 20, 24-29
Y	US2002/0182211 (PEACH et al) 05 Diciembre 2002, ver documento completo, en particular, por ejemplo párrafos 0016-0017).	17-18, 20, 24-29

☐ Documentos adicionales se listan en la continuación del cuadro C.

☐ Los miembros de la familia de patentes se listan en el anexo

* Categoría especial de los documentos citados:

"A" Documento que define el estado general de la técnica, que no se considera que es de pertinencia particular

"E" Documento anterior, pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

"L" Documento que puede crear dudas de la reivindicación(es) de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra situación u otra razón especial (como se especifique)

"O" Documento que se refiere a una descripción oral, uso, exhibición u otro medio

"P" Documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero después de la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o la fecha de prioridad, y que no provoca conflicto con la solicitud, pero se cita para entender el principio o teoría que trata la invención

"X" documento de pertinencia particular; la invención reivindicada no se puede considerar nueva o no se puede considerar que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

"Y" documento de pertinencia particular; la invención reivindicada no se puede considerar que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más de estos documentos, estas combinaciones son obvias para una persona experta en la técnica

"&" documento miembro de la familia de patentes

Fecha de la actual terminación de la búsqueda internacional	Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional
14 Abril 2005 (14.04.2005)	13 Mayo 2005

Nombre y dirección de envío ISA	Funcionario autorizado
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimil No. 571-273-8300	Ilia Ouspenski Teléfono No. 571-272-1600

Forma PCT/ISA/210 (hoja 2) (Julio 1992)

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

De la AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para:

AUDREY F. SHER
P.O. BOX 4000
PRINCETON, NJ 08543-4000

PCT

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (Regla 43 bis.1)

Fecha de envío *(día/mes/año)* Ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)	
Referencia de archivo del solicitante o mandatario: D0340 PCT	PARA ACCION ADICIONAL Ver párrafo 2 abajo
No. de solicitud internacional: PCT/US04/24840	Fecha de presentación internacional *(día/mes/año)*: 03 de Agosto 2004 (03.08.2004)
Fecha de Prioridad *(día/mes/año)*: 04 Agosto 2003 (04.08.2003)	
Clasificación de Patente Internacional (IPC) o tanto Clasificación nacional como IPC: IPC(7) : A61K 38/17, 39/395 y US Cl: 514/21; 424/134.1	
Solicitante: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY	

1. Esta opinión contiene indicaciones con relación a los siguientes puntos

- [X] Recuadro No. I — Base de la opinión
- [ ] Recuadro No. II — Prioridad
- [ ] Recuadro No. III — Ningún establecimiento del reporte con respecto a la novedad, etapa inventiva, o aplicabilidad industrial
- [ ] Recuadro No. IV — Carencia de unidad de la invención
- [X] Recuadro No. V — Establecimiento razonado conforme a la Regla 43 bis.(f) con respecto a la novedad, etapa inventiva o aplicación industrial; citas y explicaciones que soportan tal establecimiento.
- [ ] Recuadro No. VI — Ciertos documentos citados
- [ ] Recuadro No. VII — Ciertos defectos en la solicitud internacional
- [ ] Recuadro No. VIII — Ciertas observaciones en la solicitud internacional.

2. ACCION ADICIONAL

Si se hace una solicitud de examen preliminar internacional, esta opinión usualmente se considerará que es la opinión escrita de la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica donde el solicitante elige una Autoridad diferente a este para ser la IPEA y la IPEA elegida tiene notificación de la Oficina Internacional bajo la Regla 66.1bis(b) que las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional no serán consideradas.

Si esta opinión es, como se proporciona arriba, considerada para ser una opinión escrita de la IPEA, se le invita al solicitante a exponer a la IPEA una respuesta escrita junto, donde sea apropiado, con enmiendas, antes de que expire los tres meses a partir de la fecha de envío de la Forma PCT/ISA/220 o antes de que expiren los 22 meses a partir de la fecha de prioridad, lo que sea más tarde.

Para opciones adicionales, ver Forma PCT/ISA/220

3. Para detalles adicionales, ver notas para la Forma PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de envío de la IPEA/	Oficial autorizado
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Comisionado para Patentes P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsímil: 571-273-8300	Ilia Ouspenski Teléfono No. 571-272-1600

721

I. Bases del Reporte

1. Con respecto al idioma, esta opinión se ha establecido con base en la solicitud internacional en el idioma en la cual se presentó, salvo que se indique bajo este punto.

☐ Esta opinión se basa en la traducción del idioma original en el siguiente idioma, que es el idioma de la traducción publicada para propósitos de búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3 y 23.1(b))

2. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos descrita en la solicitud internacional y necesaria para reivindicar la invención, esta opinión se ha establecido con la base de:

a. tipo de material:

[ ] un listado de secuencias
[ ] tablas que se refieren al listado de secuencias

b. formato del material:

[ ] en formato escrito
[ ] en forma legible en computadora

c. tiempo de presentación/publicación

[ ] contenido en la solicitud internacional como se presentó
[ ] presentado junto con la solicitud internacional en forma legible en computadora
[ ] publicado posteriormente antes esta Autoridad para los propósitos de búsqueda

3. [ ] Además, en caso que más de una versión o copia del listado de secuencias y/o tabla con relación a esto se hallan presentado o publicado, se publicarán declaraciones requeridas de que la información en las copias posteriores o adicionales es idéntica a la que está en la solicitud como se presentó o no va más allá de la solicitud como se presentó, como sea apropiado.

4. Comentarios adicionales

722

V. Declaración razonada bajo la regla 43 bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, etapa inventiva o la aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que soportan tal declaración

1. DECLARACION.

Novedad (N)	SI	Reivindicaciones	17-18, 20, 24-29
	NO	Reivindicaciones	1-16, 19, 21-23
Etapa Inventiva (EI)	SI	Reivindicaciones	NINGUNA
	NO	Reivindicaciones	1-29
Aplicación industrial (AI)	SI	Reivindicaciones	1-29
	NO	Reivindicaciones	NINGUNA

2. CITAS Y EXPLICACIONES

Las reivindicaciones 1-16, 19 y 21-23 carecen de novedad bajo el Artículo PCT 33(2) ya que se anticipan por Larsen et al. (Patente de EUA 5,916,560; ver el documento completo).

Larsen et al. enseña un método para inhibir el rechazo de transplantes que comprende administrar un proteína de fusión de CTLA4-Ig (ver el documento completo en particular por ejemplo columna 9, líneas 6-27 y el Ejemplo 6 en las columnas 15-19). Larsen et al. enseña que el método se puede usar en un transplante cardiaco, esto es, para el tratamiento de enfermedad cardiovascular (por ejemplo columna 16 líneas 20-35).

Por lo tanto las enseñanzas de Larsen et al. anticipan la invención actual reivindicada bajo el Artículo 33(2) del PCT.

Las reivindicaciones 17-18, 20 y 24-29 carecen de etapa inventiva bajo el Artículo 33(3) del PCT por ser obvia sobre Larsen et al. (Patente de EUA 5,916,560; ver el documento completo) en vista de Peach et al. (Publicación de Patente de EUA 2002/0182211; ver el documento completo).

Larsen et al. han discutido supra, y enseñan un método para inhibir el rechazo de transplantes cardiacos (esto es, enfermedad cardiovascular), que comprende administrar una proteína de fusión CTLA-4Ig (ver el documento completo, en particular columna 9, líneas 6-27 y el Ejemplo 6 en las columnas 15-19).

Larsen et. No enseña métodos para el tratamiento de enfermedad cardiovascular en donde se ha mutado la molécula de fusión de CTLA4-IG.

Peach et al. enseña una molécula mutante soluble de CTLA4, L104EA29Yig, la cual enlaza sus ligandos con una mayor afinidad que la molécula de tipo silvestre (ver el documento completo, en particular por ejemplo los párrafos 0016-0017). Además, la mutación de la porción de inmunoglobulina de las proteínas de fusión para reducir la función efectora o para reemplazar los residuos de cisteína dentro de la región de unión articulada fueron de rutina en el arte al momento de que se hizo la invención.

Por lo tanto, habría sido obvio para alguien experto ordinario al momento de que se hizo la invención mutar el CTLA4 o la parte de Ig de la molécula de fusión y usar la molécula en los métodos de tratamiento de la enfermedad cardiovascular como se enseña por Larsen et al. y así la invención carece de una etapa inventiva bajo Artículo 33(3) PCT.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
AUDREY F. SHER
P.O. BOX 4000
PRINCETON, NJ 08543-4000

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

	Date of mailing (*day/month/year*) 13 MAY 2005
Applicant's or agent's file reference D0340 PCT	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US04/24840	International filing date (*day/month/year*) 03 August 2004 (03.08.2004)
Applicant BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

   Filing of amendments and statement under Article 19:
   The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

   When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

   Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 740 14 35

   For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

   ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

   ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

   Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90*bis*.1 and 90*bis*.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

   The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

   Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

   In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

   See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the IB/US Mail Stop PCT, Attn: IB/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300.	Authorized officer Ilia Ouspenski Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/IB/220 (January 2004) *(See notes on accompanying sheet)*

22
724

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference D0340 PCT	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US04/24840	International filing date (*day/month/year*) 03 August 2004 (03.08.2004)	(Earliest) Priority Date (*day/month/year*) 04 August 2003 (04.08.2003)
Applicant BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 2 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the Report**
   a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
      ☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).
   b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.
2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)
3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box No. III)
4. With regard to the title,
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,
   a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. ____
      ☐ as suggested by the applicant.
      ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
      ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
   b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/24840

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61K 38/17, 39/395.
US CL : 514/21; 424/134.1.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 514/21; 424/134.1.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST, Dialog, PALM.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 5,916,560 (LARSEN et al) 29 June 1999, see entire document; in particular, e.g. column 9 lines 6 - 27 and Example 6 at columns 15 - 19.	1-16, 19, 21-23 — 17-18, 20, 24-29
Y	US2002/0182211 (PEACH et al) 05 Dec 2002, see entire document, in particular, e.g. paragraphs 0016-0017).	17-18, 20, 24-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 April 2005 (14.04.2005)	13 MAY 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300.	Authorized officer Ilia Ouspenski Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
AUDREY F. SHER
P.O. BOX 4000
PRINCETON, NJ 08543-4000

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Applicant's or agent's file reference D0340 PCT	Date of mailing (*day/month/year*) 13 MAY 2005 FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below

International application No.	International filing date (*day/month/year*)	Priority date (*day/month/year*)
PCT/US04/24840	03 August 2004 (03.08.2004)	04 August 2003 (04.08.2003)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(7): A61K 38/17, 39/395. and US Cl.: 514/21; 424/134.1.

Applicant

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I — Basis of the opinion
- ☐ Box No. II — Priority
- ☐ Box No. III — Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV — Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V — Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI — Certain documents cited
- ☐ Box No. VII — Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII — Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/ US *Mail Stop PCT, Attn: ISA/US* Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Ilia Ouspenski Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (January 2004)

727

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US04/24840

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material

☐ a sequence listing

☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐ in written format

☐ in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐ contained in international application as filed.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US04/24840

Box No. V Reasoned statement under Rule 43 *bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims 17-18, 20, 24-29.	YES
	Claims 1-16, 19, 21-23.	NO
Inventive step (IS)	Claims NONE	YES
	Claims 1-29.	NO
Industrial applicability (IA)	Claims 1-29.	YES
	Claims NONE	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-16, 19, and 21-23 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by Larsen et al. (US Patent 5,916,560; see entire document).

Larsen et al. teach a method for inhibiting transplant rejection comprising administering a CTLA4-Ig fusion protein (see entire document, in particular, e.g. column 9 lines 6 - 27 and Example 6 at columns 15 - 19). Larsen et al. teach that the method can be used in cardiac transplantation, i.e. for treating cardiovascular disease (e.g. column 16 lines 20 - 35).

Therefore, the teachings of Larsen et al. anticipate the instant claimed invention under PCT Article 33(2).

Claims 17-18, 20, and 24-29 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Larsen et al. (US Patent 5,916,560; see entire document) in view of Peach et al. (US Pat. Pub. 2002/0182211; see entire document).

Larsen et al. have been discussed supra, and teach a method for inhibiting cardiac transplant rejection (i.e. cardiovascular disease) comprising administering a CTLA4-Ig fusion protein (see entire document, in particular, e.g. column 9 lines 6 - 27 and Example 6 at columns 15 - 19).

Larsen et al. do not teach methods for treating cardiovascular disease wherein the CTLA4-Ig fusion molecule has been mutated.

Peach et al. teach a soluble CTLA4 mutant molecule, L104EA29YIg, which binds its ligands with a higher affinity than the wild-type molecule (see entire document, in particular, e.g. paragraphs 0016 - 0017). Furthermore, mutating the immunoglobulin moiety of fusion proteins to reduce effector function, or to replace cysteine residues within the hinge region were routine in the art at the time the invention was made.

Therefore it would have been obvious to an ordinary artisan at the time the invention was made to mutate either the CTLA4 or the Ig part of the fusion molecule and use the molecule in the methods of treating cardiovascular disease as taught by Larsen et al., and thus the invention lacks an inventive step under PCT Article 33(3).

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article," "Rule" and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended ?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When ? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments ?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How ? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments ?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US04/024840

D0340-WO-PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

RECEIVED
BMS PATENT LAW
OCT 20 2004
Docketed Item
Due Date

SHER, Audrey, F.
P.O. Box 4000
Princeton, NJ 08543-4000
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 08 October 2004 (08.10.2004)	
Applicant's or agent's file reference D0340 PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US04/024840	International filing date *(day/month/year)* 03 August 2004 (03.08.2004)
International publication date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)* 04 August 2003 (04.08.2003)
Applicant BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letter "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. *(If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. *(If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
04 August 2003 (04.08.2003)	60/492,430	US	16 September 2004 (16.09.2004)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Vannier James
Facsimile No. +41 22 740 14 35	Facsimile No. +41 22 338 89 65 Telephone No. +41 22 338 8454

Form PCT/IB/304 (January 2004)

731

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA

2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MAURA O KNOBL

3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY

4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MAURA O KNOBL, NOTARY

CERTIFIED

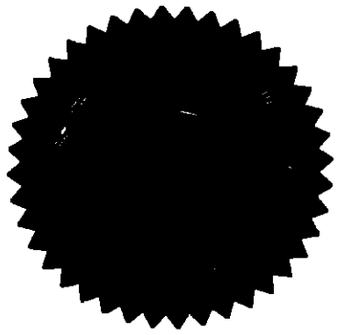
5. AT TRENTON, NEW JERSEY

6. THE 13TH DAY OF JANUARY 2006

7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER

8. NO. A248886

9. SEAL/STAMP: 10. SIGNATURE





Brigard & Castro
BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales, lemas comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

domiciled in Princeton, New Jersey, USA

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names, slogans and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

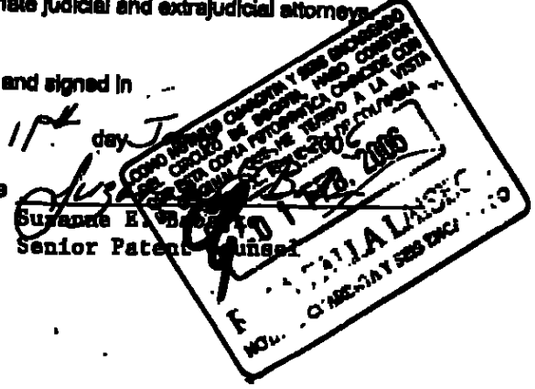
This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**, and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in

this 11th day J

Signature

Name Suzanne E. [illegible]
Title Senior Patent Counsel



733

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy de de
personalmente compareció ante mí

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él (ella) es

de

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del objeto social de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad.

Estado de
con fecha

y que quien confiere el presente poder es su representante.

Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL PERSONA NATURAL

Hoy de de , compareció(eron) ante mí

a quien (es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

Notario Público (sello)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 11 day of January of 2006 personally appeared before me SUZANNE E. BABAJKO

to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the
SENIOR PATENT COUNSEL

of BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney: that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

State of
under date of

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.

Public Notary (Seal)

NOTARIAL CERTIFICATE NATURAL PERSON

On this 11th day of January of 2006
personally appeared before me
Suzanne E. Babajko
who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed.

Maura O. Knobl
Notary Public
MAURA O. KNOBL
NOTARY PUBLIC OF NEW
My Commission

01 FEB. 2006
ROSA FALLA LAISECA

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

733 734

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** domiciliada en **Princeton, New Jersey, Estados Unidos de América.**

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

2. ESTE DOCUMENTO PUBLICO HA SIDO FIRMADO POR:
MAURA O KNOBL

3. ACTUANDO EN CAPACIDAD DE:
NOTARIO PUBLICO DE NEW JERSEY

4. LLEVA EL SELLO/TIMBRE DE:
MAURA O KNOBL, NOTARIO

CERTIFICADO

5. EN TRENTON, NEW JERSEY

6. EL 13 DE ENERO DE 2006

7. POR: John E. McCormac, CPA, TESORERO DE NEW JERSEY

8. NO. A248886

9. SELLO/TIMBRE: 10. FIRMA

(Firma)

COMO NOTARIO CUARENTA Y SEIS ENCARGADO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FOTOSTATICA CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA. REPUBLICA DE COLOMBIA

01 FEB. 2006

ROSA PALLA LAISECA

NOTARIO CUARENTA Y SEIS ENCARGADO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 06010049 00000000 Folios: 722
Fecha (AMD): 2006-02-02 16:13:34
Tramite : 411 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

733
735

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN (✓) MODELO DE UTILIDAD ( )	(✓)	( )
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	(✓)	( )
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	(✓)	( )
-Descripción de la invención.	(✓)	( )
-Dibujos de ser estos pertinentes.	(✓)	( )
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	(✓)	( )
COMPLETA (✓) INCOMPLETA ( )	( )	( )
DISEÑO INDUSTRIAL ( )		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	( )	( )
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	( )	( )
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora al diseño.	( )	( )
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )	( )	( )
ESQUEMA DE TRAZADO ( )		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	( )	( )
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	( )	( )
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	( )	( )
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )	( )	( )

Firma Responsable: _____

Fecha: 2 Feb /06

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

235
236

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY

REFERENCIA	Radicación No.	6 10049
	Solicitud internacional	US2004/024840
	Fecha inicio fase nacional	04/03/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	3899

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Las figuras adjuntas 26 (Folio 652) y 58 - 62 (Folios 684-688) no son legibles o copiables para trámites posteriores de publicación y título.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 31 MAR. 2006
jramos