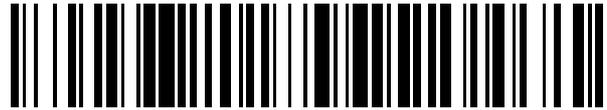


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 840**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2009 E 09743410 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2279206**

54 Título: **Procedimiento para prevenir el desarrollo de artritis reumatoide en sujetos con artritis indiferenciada**

30 Prioridad:

05.05.2008 US 50336 P
01.05.2009 US 387359

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2015

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

VRATSANOS, GEORGE;
BECKER, JEAN-CLAUDE y
CORBO, MICHAEL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 539 840 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para prevenir el desarrollo de artritis reumatoide en sujetos con artritis indiferenciada

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente al campo de las enfermedades del sistema inmunitario, por ejemplo, artritis indiferenciada (AI).

10 **Antecedentes de la Invención**

La artritis reumatoide (AR) es la artritis inflamatoria más habitual, que afecta aproximadamente al 1 % de la población mundial (Wolfe, F., "The epidemiology of drug treatment failure in rheumatoid arthritis", *Baillieres Clin. Rheumatol.*, 9(4):619-632 (Nov. 1995)). Las mujeres presentan una probabilidad 2-3 veces superior de desarrollar la enfermedad que los hombres, con una incidencia máxima entre las décadas cuarta y sexta de la vida (Hochberg, M.C. y cols., "Epidemiology of rheumatoid arthritis: update", *Epidemiol. Rev.*, 12:247-252 (1990); Markenson, J.A., "Worldwide trends in the socioeconomic impact and long-term prognosis of rheumatoid arthritis", *Semin. Arthritis Rheum.*, 21 (2 Supl. 1):4-12 (Oct. 1991); Spector, T.D., "Rheumatoid arthritis", *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 16(3):513-537 (Agosto de 1990); and Zvaifler, N.J., "Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis", en *Arthritis and Allied Conditions*, McCarty, D.J., Koopman, W.J., editores. Philadelphia: Lea & Febiger, 723-736 (1993)). Aunque la AR se reconoce clínicamente por la grave inflamación que afecta a las articulaciones sinoviales, también es una enfermedad sistémica con frecuentes manifestaciones extraarticulares. La historia natural de la AR se caracteriza desafortunadamente por destrucción de las articulaciones, disfunción física mermada y mala calidad de vida relacionada con la salud.

Existen indicios científicos cada vez mayores de que la destrucción de las articulaciones se produce de forma temprana en la AR. Más del 90 % de los sujetos tienen indicios de lesiones articulares mediante radiografía convencional en los dos años posteriores al diagnóstico de AR (Emery, P., "The Optimal Management of Early Rheumatoid Disease: The Key to Preventing Disability", *Br. J. Rheum.*, 33:765-768 (1994)). Las lesiones articulares pueden detectarse a las semanas del inicio de los síntomas usando técnicas más sensibles tales como RM o ecografía (McGonagle, D. y cols., "The relationship between synovitis and bone changes in early untreated rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum.*, 42:1706-1711 (1999) y Wakefield, R.J. y cols., "The value of sonography in the detection of bone erosion in patients with rheumatoid arthritis: A comparative study with conventional radiography", *Arthritis Rheum.*, 43:2761-2770 (2000)). Estos hallazgos han creado una creciente necesidad de tratamientos que puedan inhibir de forma eficaz los procesos inflamatorios que provocan la pérdida temprana de hueso y cartílago en la AR y han puesto un énfasis mayor en el diagnóstico y tratamiento más temprano de la AR.

Sin embargo, los criterios de 1987 de la American Rheumatism Association (ARA) para la AR son menos sensibles y específicos cuando se aplican a sujetos con artritis inflamatoria temprana que en sujetos con una enfermedad más establecida. Los sujetos con artritis inflamatoria temprana pueden tener oligoartritis en lugar de poliartritis, pueden tener síntomas de artritis durante menos de seis semanas o pueden carecer inicialmente del factor reumatoide, de nódulos o erosiones reumatoides en las radiografías convencionales (Van Gaalen, F.A. y cols., "Autoantibodies to Cyclic Citrullinated Peptides Predict Progression to Rheumatoid Arthritis in Patients with Undifferentiated Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 50(3):709-715 (2004)). Como resultado, estos sujetos a menudo no cumplen los criterios de diagnóstico de 1987 para la AR (o cualquier otra enfermedad reumática) al principio del proceso de la enfermedad. A estos sujetos se les diagnostica entonces de artritis indiferenciada (AI) por el procedimiento de exclusión. Aproximadamente el 40 % de los sujetos derivados a centros de atención terciaria especializados diseñados para el diagnóstico y manejo de la artritis inflamatoria temprana no cumplen los criterios de diagnóstico de AR o de ninguna otra enfermedad reumática (Van Gaalen, F.A. y cols., "Autoantibodies to Cyclic Citrullinated Peptides Predict Progression to Rheumatoid Arthritis in Patients with Undifferentiated Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 50(3):709-715 (2004)). Por lo tanto, la artritis indiferenciada es una entidad clínica habitual.

La membrana sinovial normal es un tejido que rodea y separa los espacios articulares. La capa tapizante de células, compuesta por sinoviocitos de tipo macrófago y de tipo fibroblasto, cubre un estroma de tejido conjuntivo fino que contiene un número escaso de células dendríticas fibroblastos, mastocitos y estructuras vasculares (Konttinen, Y.T. y cols., "Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates", *Arthritis Rheum.*, 24(1):71-79 (Enero de 1981)).

En la AR, el tejido sinovial se engrosa e inflama notablemente. Al progresar la enfermedad, se produce una gradual proliferación y reclutamiento de sinoviocitos, así como reclutamiento de células inflamatorias a la membrana sinovial (Konttinen, Y.T. y cols., "Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates", *Arthritis Rheum.*, 24(1):71-79 (Enero de 1981)). Hasta el 50 % de los leucocitos que se infiltran en la membrana sinovial son linfocitos T, principalmente linfocitos T CD4+ con un fenotipo activado o con memoria (Konttinen, Y.T. y cols., "Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates", *Arthritis Rheum.*, 24(1):71-79 (Enero de 1981); Forre, O. y cols., "Augmented numbers of HLA-DR-positive T lymphocytes in the synovial fluid and synovial tissue of subjects with rheumatoid arthritis and juvenile

rheumatoid arthritis: *in vivo*-activated T lymphocytes are potent stimulators in the mixed lymphocyte reaction", *Scand. J. Immunol.*, 15(2):227-231 (Feb. 1982); Van-Boxel, J.A. y cols., "Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes", *N. Engl. J. Med.*, 293(11):517-520 (Sept. 1975); Kidd, B.L. y cols., "Immunohistological features of synovitis in ankylosing spondylitis: a comparison with rheumatoid arthritis", *Ann. Rheum. Dis.*, 48(2):92-98 (Feb. 1989); Cush, J.J. y cols., "Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from subjects with rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum.*, 31(10):230-238 (Oct. 1988); Laffon, A. y cols., "Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis", *J. Clin. Invest.*, 88(2):546-552 (Agosto de 1991); y Klareskog, L. y cols., "Relationship between HLA DR expressing cells and T lymphocytes of different subsets in rheumatoid synovial tissue", *Scand. J. Immunol.*, 15(5):501-507 (mayo de 1981)). Las células de origen monocitario/macrofágico también se destacan en la membrana sinovial reumatoide y supone hasta el 20 % de las células, y también ellas muestran un fenotipo activado (Firestein, G.S. y cols., "How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?" *Arthritis Rheum.*, 33(6):768-773 (Jun. 1990) y Firestein, G.S. y cols., "Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid", *J. Immunol.*, 144(9):3347-3353 (1 de mayo de 1990)). Las células de tipo monocito/macrófago de la membrana sinovial reumatoide producen un conjunto de moléculas proinflamatorias, que incluyen las citocinas IL-1, TNF- α , IL-6, GM-CSF así como enzimas proteolíticas que incluyen colagenasas y metaloproteinasas de la matriz. Los linfocitos B, las células plasmáticas y los neutrófilos suponen menos del 5 % de las células de la membrana sinovial reumatoide, aunque los neutrófilos destacan en el líquido sinovial (Kontinen, Y.T. y cols., "Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates", *Arthritis Rheum.*, 24(1):71-79 (Enero de 1981); Forre, O. y cols., "Augmented numbers of HLA-DR-positive T lymphocytes in the synovial fluid and synovial tissue of subjects with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis: *in vivo*-activated T lymphocytes are potent stimulators in the mixed lymphocyte reaction", *Scand. J. Immunol.*, 15(2):227-231 (Feb. 1982); y Firestein, G.S. y cols., "Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid", *J. Immunol.*, 144(9):3347-3353 (1 de mayo de 1990)).

Al ir avanzando la proliferación e inflamación sinoviales, la creciente masa de tejido sinovial vascular, inflamatorio se denomina paño. El paño es el responsable de la invasión del cartílago articular y de la destrucción del hueso. Se estima que los productos de los linfocitos T activados son los factores motores de la formación y la expansión del paño sinovial (Zvaifler, N.J. y cols., "Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum.*, 37(6):783-789 (Jun. 1994)).

Las células de tipo monocito/macrófago y la células dendríticas de la membrana sinovial reumatoide expresan ambas el MHC de clase II así como moléculas tales como CD80 (B7-1) /CD86 (B7-2), y presumiblemente actúan como células presentadoras de antígeno (Balsa, A. y cols., "Differential expression of the costimulatory molecules B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) in rheumatoid synovial tissue", *Br. J. Rheumatol.*, 35(1):33-37 (Enero de 1996); Liu, M.F. y cols., "The presence of costimulatory molecules CD86 and CD28 in rheumatoid arthritis synovium", *Arthritis Rheum.*, 39(1):110-114 (Enero de 1996); Ranheim, E.A. y cols., "Elevated expression of CD80 (B7/BB1) and other accessory molecules on synovial fluid mononuclear cell subsets in rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum.*, 37(11):1637-1646 (Nov. 1994); Sfrikakis, P.P. y cols., "Expression of CD28, CTLA4, CD80, and CD86 molecules in subjects with autoimmune rheumatic diseases: implications for immunotherapy", *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 83(3):195-198 (Jun. 1997); y Thomas, R. y cols., "Functional differentiation of dendritic cells in rheumatoid arthritis: role of CD86 in the synovium", *J. Immunol.*, 156(8):3074-3086 (15 de abril de 1996)). Los linfocitos T CD4+ que expresan CD28 son tipos celulares infiltrantes destacados de la membrana sinovial reumatoide y habitualmente se encuentran adyacentes a las células que expresan MHC de clase II y moléculas coestimuladoras. Esto sugiere un papel importante de la activación/coestimulación de los linfocitos T en la patogénesis de la inflamación sinovial. Esto es coherente con la observación experimental de que los linfocitos T activados, ya sea a través del contacto intercelular con los sinoviocitos y osteoclastos o por la elaboración de citocinas segregadas, son factores importantes para promover la sinovitis y la destrucción ósea en la AR. Tomadas en conjunto, estas observaciones sugieren que los linfocitos T activados y las señales coestimuladoras que porta CD28 desempeñan un papel fundamental para promover la inmunopatología de la AR.

La estrategia de tratamiento de la AR ha evolucionado hacia comenzar el tratamiento con Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) más pronto tras el diagnóstico con optimización posterior del tratamiento con fármacos para tener un mayor impacto beneficioso sobre el resultado de la enfermedad (Redlich, K. y cols., "Rheumatoid Arthritis Therapy After Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Blockade", *Arthritis Rheum.*, 40(12):3308-3319 (2003)). Sin embargo, no existe un tratamiento estándar de asistencia para el tratamiento de pacientes con AI (Harrison, B.J. y cols., "Natural remission in inflammatory polyarthritis: issues of definition and prediction," *Br. J. Rheumatol.*, 35:1096-1100 (1996)). Esto se debe en gran medida a la incapacidad del clínico de determinar con exactitud el pronóstico de estos sujetos y su riesgo de desarrollar AR basándose en las características clínicas que se usan habitualmente cuando acuden a consulta. La artritis indiferenciada puede remitir de forma espontánea, progresar a una enfermedad reumática indiferenciada tal como AR o permanecer indiferenciada (Quinn, M.A. y cols., "Evaluation and management of early inflammatory polyarthritis", *Rheumatology*, Tercera Edición, MOSBY (Elsevier Limited), 885-891 (2003)). Los DMARD habitualmente no se comienzan al inicio en los sujetos con AI debido a la incertidumbre sobre el pronóstico. En lugar de ellos, habitualmente los AINE son los primeros fármacos que se emplean seguidos de corticosteroides orales. Los DMARD se usan habitualmente cuando los síntomas y signos de la artritis no responden a los primeros dos tipos de intervención. Por lo tanto, tradicionalmente se ha empleado una estrategia "piramidal" (Harrison, B.J. y cols., "Natural remission in inflammatory

polyarthritis: issues of definition and prediction," *Br. J. Rheumatol.*, 35:1096-1100 (1996)). Desafortunadamente, sin embargo, esta estrategia puede permitir que el paciente desarrolle lesiones y destrucción articulares antes de iniciar el tratamiento potencialmente modificador de la enfermedad.

5 No se ha demostrado que ningún tratamiento antirreumático autorizado altere de forma fundamental el transcurso de la artritis indiferenciada y prevenga el desarrollo de AR. Se ha estudiado un agente dirigido contra TNF alfa, infliximab, en un ensayo clínico dirigido a la prevención/remisión de la AR temprana después de un ciclo corto de tratamiento con antagonistas de TNF. Sin embargo, los datos publicados demuestran que un ciclo de 6 meses de tratamiento con antagonistas de TNF no previene la progresión de AI a AR (Saleem, B. y cols., *Rheumatology*, Academic Unit of Musculoskeletal Disease, Leeds, Reino Unido, *Ann. Rheum. Dis.*, 66 (Supl. II):186 (2007)).

Claramente, existe la necesidad de un tratamiento que pueda ofrecer a los sujetos con artritis indiferenciada con riesgo de desarrollar AR la oportunidad de alterar de forma fundamental el curso de su enfermedad dirigiéndose de forma selectiva contra la activación de los linfocitos T y previniendo el desarrollo de AR.

15 Los documentos US 2005/196402 y US 2004/0022787 describen el uso de moléculas CTLA4 en el tratamiento de la artritis (incluyendo la artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis sorriática).

20 Sumario de la Invención

La presente invención se refiere a moléculas CTLA4, en la que las moléculas CTLA4 se unen a CD80 y/o CD86 y comprenden un dominio extracelular de CTLA4 como se muestra en la SEC ID N.º 2, que comienza con alanina en la posición 26 o metionina en la posición 27, y finaliza con ácido aspártico en la posición 150, para su uso en el tratamiento de la artritis indiferenciada.

25 Breve Descripción de las Figuras

La FIG. 1 presenta la secuencia de nucleótidos (SEC ID N.º: 1) de una porción de un casete de expresión de una molécula de CTLA4-Ig. También se muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º: 2) codificada por el ácido nucleico. Las moléculas de CTLA4-Ig que pueden producirse a partir de este casete de expresión incluyen moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de los grupos: (i) 26-383 de la SEC ID N.º: 2, (ii) 26-382 de la SEC ID N.º: 2, (iii) 27-383 de la SEC ID N.º: 2, o (iv) 26-382 de la SEC ID N.º: 2, u opcionalmente (v) 25-382 de la SEC ID N.º: 2, o (vi) 25-383 de la SEC ID N.º: 2. El casete de expresión comprende las siguientes regiones: (a) una secuencia de señal M de oncostatina (nucleótidos 11-88 de la SEC ID N.º: 1; aminoácidos 1-26 de la SEC ID N.º: 2); (b) un dominio extracelular de CTLA4 humana (nucleótidos 89-463 de la SEC ID N.º: 1; aminoácidos 27-151 de SEC ID N.º: 2); (c) una porción modificada de la región constante de IgG1 humana (nucleótidos 464-1159 de la SEC ID N.º: 1; aminoácidos 152-383 de la SEC ID N.º: 2), que incluye una región bisagra modificada (nucleótidos 464-508 de la SEC ID N.º: 1; aminoácidos 152-166 de la SEC ID N.º: 2), un dominio CH2 de IgG1 humana modificado (nucleótidos 509-838 de la SEC ID N.º: 1; aminoácidos 167-276 de la SEC ID N.º: 2), y un dominio CH3 de IgG1 humana (nucleótidos 839-1159 de la SEC ID N.º: 1; aminoácidos 277-383 de SEC ID N.º: 2).

La FIG 2 representa el tiempo hasta la suspensión del tratamiento debido al desarrollo de AR evaluada en el estudio clínico que se describe en el Ejemplo III.

45 Descripción Detallada de la Invención

Tal como se utiliza en el presente documento:

50 Los términos "CTLA4-Ig" o "molécula de CTLA4-Ig" o "molécula de CTLA4Ig" se usan de forma intercambiable, y se refieren a una molécula proteínica que comprende al menos un polipéptido que tiene un dominio extracelular de CTLA4 o porción del mismo y una región constante de inmunoglobulina o porción de la misma. El dominio extracelular y la región constante de la inmunoglobulina pueden ser naturales o mutantes o modificados, y de mamífero, que incluye humana o murina. El polipéptido puede comprender además dominios proteínicos adicionales. Una molécula de CTLA4-Ig puede referirse también a formas multímeras del polipéptido, tal como dímeros, tetrámeros, y hexámeros. Una molécula de CTLA4-Ig también tiene capacidad de unirse a CD80 y/o CD86.

55 El término "B7-1" se refiere a CD80; el término "B7-2" se refiere a CD86; y el término "B7" se refiere tanto a B7-1 como a B7-2 (CD80 y CD86). El término "B7-1-Ig" o "B7-1Ig" se refiere a CD80-Ig; el término "B7-2-Ig" or "B7-2Ig" se refiere a CD86-Ig.

60 En una modalidad, "CTLA4Ig" se refiere a una molécula proteínica que tiene la secuencia de aminoácidos de los grupos: (i) 26-383 de la SEC ID N.º: 2, (ii) 26-382 de la SEC ID N.º: 2, (iii) 27-383 de la SEC ID N.º: 2, o (iv) 27-382 de la SEC ID N.º: 2, u opcionalmente (v) 25-382 de la SEC ID N.º: 2, o (vi) 25-383 de la SEC ID N.º: 2. En forma monomérica estas proteínas pueden denominarse en el presente documento "monómeros de la SEC ID N.º: 2," o monómeros "que tienen una secuencia de la SEC ID N.º: 2". Estos monómeros de la SEC ID N.º: 2 pueden dimerizarse, de tal forma que las combinaciones de dímero pueden incluir, por ejemplo: (i) y (i); (i) y (ii); (i) y (iii); (i) y

(iv); (i) y (v); (i) y (vi); (ii) y (ii); (ii) y (iii); (ii) y (iv); (ii) y (v); (ii) y (vi); (iii) y (iii); (iii) y (iv); (iii) y (v); (iii) y (vi); (iv) y (iv); (iv) y (v); (iv) y (vi); (v) y (v); (v) y (vi); y, (vi) y (vi). Estas diferentes combinaciones de dímero también pueden asociarse entre sí formando una molécula tetrámera de CTLA4lg. Estos monómeros, dímeros, tetrámeros y otros multímeros pueden denominarse en el presente documento "proteínas de la SEC ID N.º: 2" o proteínas "que tienen una secuencia de la SEC ID N.º: 2". (El ADN que codifica CTLA4lg tal como se muestra en la SEC ID N.º: 2 se depositó el 31 de mayo de 1991 en la American Type Culture Collection (ATCC®), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 según las disposiciones del Tratado de Budapest, y se le ha asignado el número de acceso de la ATCC® ATCC® 68629; una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) que expresa CTLA4lg tal como se muestra en la SEC ID N.º: 2 se depositó el 31 de mayo de 1991 con el número de identificación de ATCC® CRL-10762).

Una "sustancia farmacéutica" se refiere al material inicial que se utiliza en la formulación del producto farmacéutico final. La composición habitual de la sustancia farmacéutica de CTLA4lg comprende una concentración de proteína de 20 mg/ml a 60 mg/ml, pH de 6 a 8 y % de especies de APM < 5 %.

Una "solución a granel formulada" se refiere a la formulación final antes de llenar el envase tal como la solución formulada antes de cargar los viales para su liofilización, o la solución formulada antes de cargar la jeringuilla para su inyección.

Un "producto farmacéutico" se refiere a la formulación final envasada en un envase que puede reconstituirse antes de usar, tal como con un producto farmacéutico liofilizado; diluido adicionalmente antes de usar, tal como con un producto farmacéutico líquido; o que se utiliza tal cual, tal como con un producto farmacéutico en solución SC.

"Evaluaciones de cuestionarios de salud (HAQ)" se refiere a un conjunto de preguntas que se usan para evaluar a los pacientes para determinar los síntomas de la actividad de la enfermedad. Estos síntomas incluían: hinchazón de las articulaciones, dolor con la exploración en las articulaciones, inflamación, rigidez matinal, actividad y discapacidad de la enfermedad evaluada por cada paciente en un cuestionario relleno por el paciente sobre su bienestar y función física, actividad y discapacidad de la enfermedad evaluadas por un médico, y dolor (Fries, J.F. y cols., *J. Rheumatology*, 9:789-793 (1982)).

"Medical Outcomes Study Short Form-36 (SF-36)" refers to forms used to evaluate the impact of therapy on health-related quality of life (HRQOL). El SF-36 está formado por 36 preguntas que abarcan cuatro dominios físicos y cuatro mentales (función física, rol físico, dolor corporal, estado de salud general, vitalidad, función social, rol emocional, y salud mental). Estos dominios individuales se usan para derivar las puntuaciones que resumen los componentes físico y mental que varían en el intervalo de 0 a 100, donde las puntuaciones más elevadas indican una mejor calidad de vida.

Los "Criterios para la clasificación de la artritis reumatoide (AR) revisados en 1987 de la American Rheumatism Association (ARA)" se refiere a un conjunto de criterios que se describen en la Tabla 1 más adelante. Con fines de clasificación, se dice que un sujeto tiene AR si cumple al menos cuatro de los cuatro criterios. Los criterios 1 a 4 deben estar presentes durante al menos 6 semanas.

TABLA 1

Criterios de la ARA revisados en 1987 para la clasificación de AR	
Criterio	Definición
1. Rigidez matinal	Rigidez matinal en y alrededor de las articulaciones que dura al menos 1 hora antes de la mejoría máxima
2. Artritis en tres o más áreas de articulación	Al menos tres áreas de articulación presentan de forma simultánea hinchazón o fluido (no únicamente excrecencia ósea) observados por un médico (las 14 áreas de articulación posibles son PIP, MCP, muñeca, codo, rodilla, tobillo y articulaciones MTP [derecha o izquierda])
3. Artritis de las articulaciones de la mano	Al menos una área de articulación hinchada como anteriormente en la articulación de la muñeca, MCP, o PIP
4. Artritis simétrica	Afectación simultánea de las mismas áreas de articulación (como en el criterio 2) de ambos lados del cuerpo (la afectación bilateral de articulaciones PIP, MCP, o MTP es aceptable sin simetría absoluta)
5. Nódulos reumatoides	Nódulos subcutáneos sobre las prominencias óseas o superficies extensoras, o en regiones yuxtaarticulares, observados por un médico
6. Factor reumatoide en suero	Demostración de cantidades anormales de "factor reumatoide" en suero mediante cualquier procedimiento que haya sido positivo en menos del 5 por ciento de los sujetos normales de control
7. Cambios radiográficos	Los cambios típicos de AR en radiografías de mano y muñeca PA, que deben incluir erosiones o descalcificación ósea inequívoca localizados en o de forma muy marcada adyacente a las articulaciones afectadas (los cambios por artrosis no cuentan)

Criterios de la ARA revisados en 1987 para la clasificación de AR	
Criterio	Definición
Abreviaturas: ARA, American Rheumatism Association; PIP, interfalángica proximal; MCP, metacarpofalángica; MTP, metatarsfalángica; AR, artritis reumatoide; PA, posteroanterior*.	

El término "ACR" se refiere a estudios de respuesta clínica basados en criterios establecidos por el American College of Rheumatology. El Conjunto de datos nuclear y las Definiciones de las respuestas de los ACR se describen en la Tabla 2 más adelante. Un sujeto cumple el criterio "ACR20" si tiene una mejora del 20 por ciento de los recuentos de dolor por palpación y articulación hinchada y una mejora del 20 por ciento en tres de los otros cinco síntomas restantes medidos, tales como cambios globales en la enfermedad según el paciente y el doctor, dolor, discapacidad física, y un reactivo de fase aguda tal como proteína reactiva C (CRP) o Informe de seguridad acelerado (ESR) (Felson, D.T. y cols., Arthritis Rheum., 36:729-740 (1993); Felson, D.T. y cols., Arthritis Rheum., 38:1-9 (1995)). De forma similar, un sujeto cumple el criterio "ACR50" o "ACR70" si se produjo una mejora del 50 o 70 por ciento, respectivamente, en los recuentos de dolor por palpación y articulación hinchada y una mejora del 50 o 70 por ciento, respectivamente, en tres de los cinco síntomas restantes medidos, tales como cambios globales en la enfermedad según el paciente y el doctor, dolor, discapacidad física, y un reactivo de fase aguda tal como CRP o ESR.

TABLA 2

Conjunto de datos nuclear y las Definiciones de las respuestas de los ACR	
Componente del conjunto de datos nuclear de los ACR	Herramienta de medición validada
1. Recuento de articulaciones con dolor por palpación	Recuento de articulaciones 68 estandarizado
2. Recuento de articulaciones hinchadas	Recuento de articulaciones 66 estandarizado
3. Evaluación global por el sujeto del dolor	Escala analógica visual de 0-100 mm
4. Evaluación global por el sujeto de la actividad de la enfermedad	Escala analógica visual de 0-100 mm
5. Evaluación global por el doctor de la actividad de la enfermedad	Escala analógica visual de 0-100 mm
6. Evaluación global por el sujeto de la actividad física	Cuestionario de evaluación de la salud (HAQ)
7. Valor de reactivo en fase aguda	ESR (Westergren) y proteína reactiva C

El diagnóstico de artritis indiferenciada (AI) se hace cuando la persona tiene sinovitis clínica sintomática de dos o más articulaciones y presenta al menos uno y no más de tres de los criterios de clasificación de AR de la American Rheumatism Association (1987) que se describen en la Tabla 1.

Tal como se usa en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" de AI quiere decir manejar la AI mediante tratamiento medicinal u otro. El tratamiento de la AI puede suprimir eventos mediados por el sistema inmunitario asociados a la enfermedad, mejorar los síntomas de la enfermedad o trastorno, reducir la gravedad de la enfermedad, alterar el transcurso de la progresión de la enfermedad y/o mejorar o curar la enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento de la AI puede lograrse regulando una respuesta inmunitaria por ejemplo, regulando las interacciones entre las células positivas para CTLA4 y/o CD28 funcionales con las células positivas para B7. De forma alternativa, el tratamiento de la AI puede lograrse previniendo o inhibiendo el progreso de la enfermedad a AR mediante el uso de las composiciones que se describen en el presente documento. Por ejemplo, el tratamiento de AI incluye la inhibición de la erosión de las articulaciones medida por RM.

Las muestras de suero pueden analizarse para determinar CTLA4lg mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Monómeros y multímeros de CTLA4-Ig

Las moléculas de CTLA4-Ig pueden incluir, por ejemplo, proteínas CTLA4-Ig en formas de monómero, dímero, trímero, tetrámero, pentámero, hexámero, u otros multímeros. Las moléculas de CTLA4-Ig pueden comprender una fusión de proteínas con al menos un dominio extracelular de CTLA4 y una región constante de inmunoglobulina. Las moléculas de CTLA4-Ig pueden tener secuencias naturales o mutantes, por ejemplo, con respecto a las secuencias de dominio extracelular de CTLA4 y región constante de inmunoglobulina. Los monómeros de CTLA4-Ig, solos, o en forma de dímero, tetrámero u otro multímero, pueden estar glicosilados.

En algunas modalidades, la invención proporciona poblaciones de moléculas de CTLA4-Ig que tienen al menos un cierto porcentaje de moléculas de dímero u otro multímero. Por ejemplo, la invención proporciona poblaciones de molécula de CTLA4-Ig que tienen más de 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % de dímeros de CTLA4-Ig. En una modalidad, la invención proporciona una población de moléculas de CTLA4-Ig que comprende de aproximadamente 95 % a aproximadamente 99,5 % de dímero de CTLA4-Ig y de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 5 % de tetrámero de CTLA4-Ig. En otra modalidad, la población de moléculas de CTLA4-Ig comprende aproximadamente 98 % de dímero de CTLA4-Ig, aproximadamente 1,5 % de tetrámero de CTLA4-Ig y aproximadamente 0,5 % de monómero de CTLA4-Ig.

En una modalidad, la invención proporciona una población de moléculas de CTLA4-Ig en la que la población está

sustancialmente libre de moléculas monoméricas de CTLA4-Ig. Sustancialmente libre de moléculas monoméricas de CTLA4-Ig puede referirse a una población de moléculas de CTLA4-Ig que tiene menos de 1 %, 0,5 %, o 0,1 % de monómeros.

5 En una modalidad, la invención proporciona una población de moléculas de CTLA4-Ig en la que la población está sustancialmente libre de multímeros de CTLA4-Ig que sean mayores que dímeros, tales como tetrámeros, hexámeros, etc. Sustancialmente libre de moléculas de multímero de CTLA4-Ig mayores que dímeros puede referirse a una población de moléculas de CTLA4-Ig que tengan menos de 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, o 0,1 % de multímeros de CTLA4-Ig mayores que la forma dimérica.

10 En una modalidad, una molécula de monómero de CTLA4-Ig puede tener, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de: (i) 26-383 de la SEC ID N.º: 2, (ii) 26-382 de la SEC ID N.º: 2 (iii) 27-383 de la SEC ID N.º: 2, o (iv) 27-382 de la SEC ID N.º: 2, u opcionalmente (v) 25-382 de la SEC ID N.º: 2, o (vi) 25-383 de la SEC ID N.º: 2. Cuando un casete de expresión que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID N.º: 1 se expresa en células CHO, la forma monomérica predominante que se expresa tiene el grupo aminoacídico del extremo N de metionina (grupo 27 de la SEC ID N.º: 2), que corresponde al grupo aminoacídico del extremo N de CTLA4 humana de tipo natural. Sin embargo, dado que la SEC ID N.º: 1 también incluye la secuencia codificante de una secuencia de señal M de oncostatina (nucleótidos 11-88 de la SEC ID N.º: 1), la proteína expresada de la SEC ID N.º: 1 contiene una secuencia de señal M de oncostatina. La secuencia de señal se escinde de la proteína expresada durante el procesamiento de exportar la proteína del citoplasma, o secreción al exterior de la célula. Pero la escisión puede producir variantes del extremo N, tales como escisión entre los grupos aminoacídicos 25 y 26 (que produce una variante del grupo 26 del extremo N, es decir, la "variante Ala"), o entre los grupos aminoacídicos 24 y 25 (que produce una variante del grupo 2 del extremo N, es decir, la "variante Met-Ala"), en vez de la escisión entre los grupos aminoacídicos 26 y 27 (que produce un extremo N del grupo 27). Por ejemplo, la variante Met-Ala can puede estar presente en una mezcla de moléculas de CTLA4-Ig a aproximadamente 1 %, y la variante Ala puede estar presente en una mezcla de moléculas de CTLA4-Ig a aproximadamente 8-10 %. Además, la proteína expresada de la SEC ID N.º: 1 puede tener variantes del extremo C debido a un procesamiento incompleto. El extremo C predominante es la glicina en el grupo 382 de la SEC ID N.º: 2. En una mezcla de moléculas de CTLA4-Ig, los monómeros que tienen lisina en el extremo C (grupo 383 de la SEC ID N.º: 2) pueden estar presentes, por ejemplo, a aproximadamente 4-5 %.

Una molécula de monómero de CTLA4-Ig puede comprender un dominio extracelular de CTLA4 humana. En una modalidad, el dominio extracelular puede comprender la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 89-463 de la SEC ID N.º: 1 que codifican los aminoácidos 27-151 de la SEC ID N.º: 2. En otra modalidad, el dominio extracelular puede comprender secuencias mutantes de CTLA4 humana. En otra modalidad, el dominio extracelular puede comprender cambios de nucleótidos en los nucleótidos 89-463 de la SEC ID N.º: 1 de tal forma que se produzcan cambios conservadores en los aminoácidos. En otra modalidad, el dominio extracelular puede comprender una secuencia de nucleótidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los nucleótidos 89-463 de la SEC ID N.º: 1.

Una molécula de monómero de CTLA4-Ig puede comprender una región constante de una inmunoglobulina humana. Esta región constante puede ser una porción de una región constante; esta región constante puede tener una secuencia de tipo natural o mutante. La región constante puede ser de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD o IgE humanas. La región constante puede ser de una cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina. Cuando la región constante es de una molécula de IgG, IgD, o IgA, la región constante puede comprender uno o más de los siguientes dominios de región constante: CL, CH1, bisagra, CH2, o CH3. Cuando la región constante es de IgM o IgE, la región constante puede comprender uno o más de los siguientes dominios de región constante: CL, CH1, CH2, CH3, o Ca4. En una modalidad, la región constante puede comprender una o más dominios de región constante de IgG, IgD, IgA, IgM o IgE.

En una modalidad, una molécula de monómero de CTLA4-Ig comprende una región bisagra de IgG1 humana modificada (nucleótidos 464-508 de la SEC ID N.º: 1; aminoácidos 152-166 de la SEC ID N.º: 2) en la que las serinas de los grupos aminoacídicos 156, 162, y 165 de la SEC ID N.º: 2 se han diseñado a partir de cisteínas presentes en la secuencia de tipo natural.

En una modalidad, una molécula de monómero de CTLA4-Ig comprende una región CH2 de IgG1 humana modificada y una región CH3 de tipo natural (el dominio CH2 de IgG1 humana modificada que tiene los nucleótidos 509-838 de la SEC ID N.º: 1 y los aminoácidos 167-276 de la SEC ID N.º: 2; el dominio CH3 de IgG1 humana que tiene los nucleótidos 839-1159 de la SEC ID N.º: 1 y los aminoácidos 277-383 de la SEC ID N.º: 2).

En una modalidad, una población de moléculas de CTLA4-Ig comprende monómeros que tienen una secuencia que se muestra en una o más de las Figuras 7, 8 o 9 de la patente de Estados Unidos n.º 7.094.874, expedida el 22 de agosto de 2006 y en las solicitudes de patentes de Estados Unidos publicadas n.º 2003/0083246 y 2004/0022787.

En una modalidad, una molécula de tetrámero de CTLA4-Ig comprende dos pares o dos dímeros de polipéptidos de CTLA4-Ig, en la que cada polipéptido tiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos: (i) 26-383 de la SEC

ID N.º: 2, (ii) 26-382 de la SEC ID N.º: 2, (iii) 27-383 de la SEC ID N.º: 2, o (iv) 27-382 de la SEC ID N.º: 2, u opcionalmente (v) 25-382 de la SEC ID N.º: 2, o (vi) 25-383 de la SEC ID N.º: 2. Cada eslabón del par de polipéptidos o dímero está ligado covalentemente al otro eslabón, y los dos pares de polipéptidos están asociados de forma no covalente entre sí formando un tetrámero. Las moléculas tetraméricas tienen capacidad de unirse a CD80 o CD86.

En otra modalidad, las moléculas tetraméricas pueden unirse a CD80 o CD86 con una avidéz que es al menos 2 veces mayor que la avidéz de unión de un dímero de CTLA4-Ig (cuyos monómeros tienen una de las secuencias de aminoácidos anteriores) a CD80 o CD86. En otra modalidad, las moléculas tetraméricas pueden unirse a CD80 o CD86 con una avidéz que es al menos 2 veces superior a la afinidad o avidéz de unión de CTLA4 de tipo natural a CD80 o CD86. La avidéz superior puede contribuir a una mayor eficacia en el tratamiento de trastornos inmunitarios y otras enfermedades como se describe más adelante. Además, la avidéz superior o mejorada puede producir el resultado de mayor potencia del fármaco. Por ejemplo, una composición terapéutica que comprende tetrámero de CTLA4-Ig tendría una mayor avidéz y por lo tanto una mayor potencia que la misma cantidad de una composición terapéutica que tiene monómero de CTLA4-Ig. En otra modalidad, las moléculas tetraméricas pueden tener una inhibición sobre la proliferación de los linfocitos T al menos a 2 veces superior a un dímero de CTLA4-Ig (cuyos monómeros tienen una de las secuencias de aminoácidos anteriores). En otra modalidad, las moléculas tetraméricas pueden tener una inhibición sobre la proliferación de los linfocitos T al menos a 2 veces superior a una molécula de CTLA4 de tipo natural.

La proliferación de los linfocitos T puede medirse usando ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, una de las formas más habituales de evaluar la proliferación de los linfocitos T es estimular los linfocitos T mediante antígenos o anticuerpos agonistas a TCR y medir, por ejemplo, la incorporación de timidina titulada (3H-TdR) a los linfocitos T en proliferación o la cantidad de citocinas liberadas por los linfocitos T proliferantes en cultivo. De ese modo puede medirse el efecto inhibitorio de las moléculas de CTLA4-Ig sobre la activación o proliferación de los linfocitos T.

La afinidad de una molécula de CTLA4-Ig es la fuerza de la unión de la molécula a un único ligando, que incluye CD80, CD86, o proteínas de fusión CD80Ig o CD86Ig. La afinidad de CTLA4-Ig a los ligandos puede medirse usando, por ejemplo, análisis de la interacción de unión (BIA) basado en una técnica de plasmón superficial. A parte de medir la fuerza de la unión, permite la determinación en tiempo real de la cinética de unión, tal como las constantes de velocidad de asociación y disociación. Un chip sensor, constituido por un porta de vidrio recubierto con una película de metal fina, a la que está unida covalentemente una matriz superficial, está recubierta con uno de los elementos que interactúan, es decir, CTLA4-Ig o uno de los ligandos. Una solución que contiene el otro elemento que interactúa se deja fluir sobre su superficie. Un haz de luz continuo se dirige contra el otro lado de la superficie y se mide su ángulo de reflexión. Al unirse CTLA4-Ig al ligando, el ángulo de resonancia del haz de luz cambia (ya que depende del índice de refracción del medio cercano al lado reactivo del sensor, que a su vez se correlaciona directamente con la concentración de material disuelto en el medio). Posteriormente se analiza con ayuda de un ordenador.

En una modalidad, los experimentos de unión de CTLA4-Ig pueden realizarse mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore (BIAcore AG, Uppsala, Suecia). CTLA4-Ig puede acoplarse covalentemente mediante grupos de amina primaria a una matriz de dextrano carboximetilado sobre un chip sensor BIAcore, inmovilizando así CTLA4-Ig sobre el chip sensor. De forma alternativa, puede usarse un anticuerpo contra la región constante para inmovilizar CTLA4-Ig indirectamente sobre la superficie del sensor mediante el fragmento de Ig. A partir de ahí, se añaden los ligandos al chip para medir la unión de CTLA4-Ig a los ligandos. Las mediciones de afinidad pueden realizarse, por ejemplo, como se describe en van der Merwe, P. y cols., *J. Exp. Med.*, 185(3):393-404 (1997).

También puede medirse la avidéz de las moléculas de CTLA4-Ig. La avidéz puede definirse como la suma total de la fuerza de la unión de dos moléculas o células entre sí en múltiples sitios. La avidéz se diferencia de la afinidad que es la fuerza de unión de un sitio de una molécula a su ligando. Sin comprometerse con la teoría, la mayor avidéz de las moléculas de CTLA4-Ig puede provocar una mayor potencia de inhibición por las moléculas de CTLA4-Ig sobre la proliferación y activación de los linfocitos T. La avidéz puede medirse, por ejemplo, mediante dos categorías de ensayos en fase sólida: a) ensayos de inhibición competitiva, y b) ensayos de elución. En ambos, el ligando está unido sobre un soporte sólido. En el ensayo de inhibición competitiva, las moléculas de CTLA4-Ig se añaden después en solución a una concentración fija, junto con el ligando libre en diferentes concentraciones, y se determina la cantidad de ligando que inhibe la unión en fase sólida en un 50 %. Cuando menos ligando se necesite, más fuerte es la avidéz. En los ensayos de elución, el ligando se añade en solución. Después de obtener un estado de equilibrio, se añade un caótrope o agente desnaturizante (por ejemplo, isotiocianato, urea, o dietilamina) en diferentes concentraciones para alterar las interacciones entre CTLA4-Ig y ligando. La cantidad de CTLA4-Ig que resiste la elución se determina después con un ELISA. Cuanto mayor la avidéz, más agente caotrópico se necesita para eluir una cierta cantidad de CTLA4-Ig. La avidéz relativa de una mezcla heterogénea de moléculas de CTLA4-Ig puede expresarse en términos del índice de avidéz (AI), igual a la concentración de agente eluyente necesario para eluir el 50 % de las moléculas de CTLA4-Ig unidas. El análisis refinado de los datos puede realizarse determinando los porcentajes de CTLA4-Ig eluido a diferentes concentraciones de agente de elución.

Procedimientos para producir las moléculas de CTLA4Ig de la invención

La expresión de las moléculas de CTLA4Ig puede ser en células procariotas. Los procariotas muy frecuentemente son representados por diversas cepas de bacterias. Las bacterias pueden ser gram positivas o a gram negativas. Habitualmente se prefieren bacterias gram negativas tales como *E. coli*. También pueden usarse otras cepas microbianas.

Las secuencias, que se describen anteriormente, que codifican moléculas de CTLA4Ig pueden insertarse en un vector diseñado para expresar secuencias exógenas en células procariotas tales como *E. coli*. Estos vectores pueden incluir secuencias de control procariotas de uso habitual que se definen en el presente documento como que incluyen promotores para iniciación de la transcripción, opcionalmente con un operador, junto con secuencias de sitio de unión de ribosomas, que incluyen promotores de uso habitual tales como los sistemas promotores de beta-lactamasa (penicilinas) y lactosa (*lac*) (Chang y cols., *Nature*, 198:1056 (1977)), el sistema promotor del triptófano (*trp*) (Goeddel y cols., *Nucleic Acid Res.*, 8:4057 (1980)) y el promotor P_L derivado de lambda y el sitio de unión ribosómico del gen N (Shimatake y cols., *Nature*, 292:128 (1981)).

Los vectores de expresión también incluyen orígenes de replicación y marcadores seleccionables, tales como un gen de beta-lactamasa o neomicin fosfotransferasa que confiere resistencia a antibióticos, de forma que los vectores puedan replicarse en las bacterias y las células que portan los plásmidos pueden seleccionarse cuando se cultivan en presencia de antibióticos, tales como ampicilina o kanamicina.

El plásmido de expresión puede introducirse en las células procariotas mediante varios procedimientos estándar, que incluyen pero sin limitación choque con CaCl₂ (Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2110 (1972), y Sambrook y cols., editores., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a Edición, Cold Spring Harbor Press (1989)) y electroporación.

De acuerdo con la práctica de la invención, las células eucariotas también son células hospederas adecuadas. Los ejemplos de células eucariotas incluyen cualquier célula animal, ya sea primaria o inmortalizada, levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Pichia pastoris*), y células vegetales. Las células de mieloma, COS y CHO son ejemplos de células animales que pueden usarse como huéspedes. Las células CHO particulares incluyen, pero sin limitación, DG44 (Chasin y cols., *Som. Cell. Molec. Genet.*, 12:555-556 (1986); Kolkekar, *Biochemistry*, 36:10901-10909 (1997)), CHO-K1 (ATCC® n.º CCL-61), CHO-K1 Tet-On cell line (Clontech), CHO denominada ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), CHO clon 13 (GEIMG, Genova, IT), CHO clon B (GEIMG, Génova, Italia), CHO-K1/SF denominada ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), y RR-CHOK1 denominada ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido). Las células vegetales ilustrativas incluyen células de tabaco (plantas enteras, cultivo celular o esquejes), maíz, soja y arroz. También son aceptables las semillas de maíz, soja y arroz.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las moléculas de CTLA4Ig que se describen anteriormente también pueden insertarse en un vector diseñado para expresar secuencias exógenas en un huésped eucariota. Los elementos reguladores del vector pueden variar de acuerdo con el huésped eucariota particular.

Las secuencias de control eucariotas que se usan habitualmente en los vectores de expresión incluyen promotores y secuencias de control compatibles con las células de mamífero tales como, por ejemplo, promotor de CMV (vector CDM8) y virus del sarcoma aviario (ASV) (vector πLN). Otros promotores que se usan habitualmente incluyen los promotores temprano y tardío del virus simio 40 (SV40) (Fiers y cols., *Nature*, 273:113 (1973)), u otros promotores víricos tales como los que se derivan de polioma, Adenovirus 2, y virus del papiloma bovino. También puede usarse un promotor inducible, tal como hMTII (Karin y cols., *Nature*, 299:797-802 (1982)).

Los vectores para expresar moléculas de CTLA4Ig en eucariotas también pueden portar secuencias denominadas regiones potenciadoras. Estas son importantes para optimizar la expresión génica y se encuentran o aguas arriba o aguas abajo de la región promotora.

Los ejemplos de vectores de expresión para las células hospederas eucariotas incluyen, pero sin limitación, vectores para células hospederas de mamífero (por ejemplo, BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); vectores pVPakc, vectores pCMV, vectores pSG5 (Stratagene)), vectores de retrovirus (por ejemplo, vectores pFB (Stratagene)), pCADN-3 (Invitrogen) o formas modificadas del mismo, vectores de adenovirus; vectores de virus adenoasociados, vectores de baculovirus, vectores de levaduras (por ejemplo, vectores pESC (Stratagene)).

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican moléculas de CTLA4Ig pueden integrarse en el genoma de las células hospederas eucariotas y replicarse al replicarse el genoma huésped. De forma alternativa, el vector que porta las moléculas de CTLA4Ig puede contener orígenes de replicación que permitan la replicación extracromosómica.

Para expresar las secuencias de ácidos nucleicos en *Saccharomyces cerevisiae*, puede usarse el origen de

replicación del plásmido de levadura endógeno, el círculo de 2 μ . (Broach, *Meth. Enzymol.*, 101:307 (1983)). De forma alternativa, pueden usarse secuencias del genoma de levadura que tienen capacidad de promover la replicación (véase, por ejemplo, Stinchcomb y cols., *Nature*, 282:39 (1979)); Tschemper y cols., *Gene*, 10:157 (1980); y Clarke y cols., *Meth. Enzymol.*, 101:300 (1983)).

5 Las secuencias de control de la transcripción para los vectores de levaduras incluyen promotores para la síntesis de enzimas glucolíticas (Hess y cols., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968) y Holland y cols., *Biochemistry*, 17:4900 (1978)). Los promotores adicionales conocidos en la técnica incluyen el promotor de CMV que se proporciona en el vector CDM8 (Toyama y cols., *FEBS*, 268:217-221 (1990)); el promotor de 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman y cols., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)), y los de otras enzimas glucolíticas.

10 Otros promotores son inducibles porque pueden regularse mediante estímulos ambientales o por el medio de cultivo de las células. Estos promotores inducibles incluyen los de los genes de las proteínas del choque térmico, alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas asociados al catabolismo del nitrógeno, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

15 También pueden introducirse secuencias reguladoras en el extremo 3' de las secuencias codificantes. Estas secuencias pueden actuar estabilizando el ARN mensajero. Los terminadores se encuentran en la región 3' sin traducir después de las secuencias codificantes en diversos genes derivados de levaduras y de mamíferos.

20 Los vectores ilustrativos de plantas y células vegetales incluyen, pero sin limitación, plásmidos de *Agrobacterium T₁*, virus del mosaico de la coliflor (CaMV), y virus del mosaico dorado del tomate (TGMV).

25 Las células de mamífero pueden transformarse mediante procedimientos que incluyen pero sin limitación, transfección en presencia de fosfato cálcico, microinyección, electroporación, o mediante transducción con vectores víricos.

30 Los procedimientos para introducir secuencias de ADN exógeno en genomas vegetales y de levaduras incluyen (1) procedimientos mecánicos, tales como microinyección de ADN en células o protoplastos aislados, agitación en vórtice de células con perlas de vidrio en presencia de ADN, o disparo de esferas de tungsteno u oro recubiertas de ADN a las células o protoplastos; (2) introducción del ADN haciendo las membranas celulares permeables a las macromoléculas mediante tratamiento con polietilenglicol o sometimiento a pulsos eléctricos a voltaje elevado (electroporación); o (3) uso de liposomas (que contienen ADNc) que se fusionan con las membranas celulares.

35 La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005/0019859 y la patente de Estados Unidos n.º 7.332.303 enseñan procedimientos para la producción de proteínas de la invención, específicamente de productos glucoproteínicos recombinantes, mediante cultivos de células animales o de mamífero.

40 Tras la fase de producción de proteínas del procedimiento de cultivo celular, las moléculas de CTLA4Ig se recuperan del medio de cultivo celular usando técnicas que entienda una persona experta en la técnica. En particular, la molécula de CTLA4Ig se recupera del medio de cultivo en forma de un polipéptido segregado.

45 El medio de cultivo se centrifuga inicialmente para eliminar los desechos celulares y las partículas. La proteína deseada posteriormente se purifica del ADN contaminante, las proteínas, y polipéptidos solubles, con los siguientes procedimientos de purificación no limitantes bien establecidos en la técnica: SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; precipitación con etanol; fraccionamiento por inmutafinidad o columnas de intercambio iónico; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio aniónico tal como QAE o DEAE; cromatoenfoco; filtración en gel usando, por ejemplo, una columna SEPHADEX® G-75; y columnas de proteína A SEPHAROSE® para eliminar los contaminantes tales como IgG. La adición de un inhibidor de proteasas, tal como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), o una mezcla de cóctel de inhibidores de proteasas también puede ser útil para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación. Una persona experta en la técnica reconocerá que los procedimientos de purificación adecuados para una proteína de interés, por ejemplo una glucoproteína, pueden requerir alteraciones para adaptarse a los cambios del carácter de la proteína tras la expresión en un cultivo de células recombinantes.

50 Las técnicas y procedimientos de purificación que seleccionan los grupos carbohidrato de la glucoproteína también son de utilidad en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, las técnicas incluyen, cromatografía por HPLC o de intercambio iónico usando resinas de intercambio catiónico o aniónico, en las que se recoge la fracción más básica o más ácida, dependiendo de qué carbohidrato se esté seleccionando. El uso de las técnicas también puede provocar la eliminación concomitante de contaminantes.

55 El procedimiento de purificación puede comprender además etapas adicionales que inactivan y/o eliminan virus y/o retrovirus que podrían estar presentes potencialmente en el medio de cultivo celular de las líneas celulares de mamíferos. Hay disponible un número significativo de etapas de aclaramiento vírico, que incluyen pero sin limitación, tratamiento con caótrofos tales como urea o guanidina, detergentes, etapas adicionales de ultrafiltración/diafiltración, separación convencional, tal como cromatografía de intercambio iónico o de exclusión por

65

tamaño, pH extremos, calor, proteasas, disolventes orgánicos o cualquier combinación de los mismos.

La molécula de CTLA4Ig purificada requiere concentración y un intercambio de tampón antes del almacenamiento o el procesamiento adicional. Puede usarse un sistema Pall Filtron TFF para concentrar e intercambiar el tampón de elución de la anterior columna de purificación con el tampón final que se desee para la sustancia farmacéutica.

En un aspecto, pueden cargarse moléculas de CTLA4Ig purificadas, que se hayan concentrado y sometido a una etapa de diafiltración, en recipientes BIOTAINER® de 2 l, en una bolsa de bioprocesamiento de 50 l o en cualquier otro recipiente adecuado. Las moléculas de CTLA4Ig de los recipientes pueden almacenarse durante aproximadamente 60 días de 2° a 8 °C antes de congelar. El almacenamiento prolongado de las moléculas de CTLA4Ig purificadas de 2° a 8 °C puede conllevar un aumento de la proporción de las especies de APM. Por lo tanto, para el almacenamiento durante tiempos prolongados, las moléculas de CTLA4Ig pueden congelarse a aproximadamente -70 °C antes del almacenamiento y almacenarse a una temperatura de aproximadamente -40 °C. La temperatura de congelación puede variar desde aproximadamente -50 °C a aproximadamente -90 °C. El tiempo de congelación puede variar y depende en gran medida del volumen del recipiente que contiene las moléculas de CTLA4Ig, y del número de recipientes que se introduzcan en el congelador. Por ejemplo, en una modalidad, las moléculas de CTLA4Ig están en recipientes BIOTAINER® de 2 l. La introducción de menos de cuatro recipientes BIOTAINER® de 2 l en el congelador puede requerir de aproximadamente 14 a al menos 18 horas de tiempo de congelación. La introducción de al menos cuatro recipientes puede requerir de aproximadamente 18 a al menos 24 horas de tiempo de congelación. Los recipientes con moléculas de CTLA4Ig congeladas se almacenan a una temperatura de aproximadamente -35 °C a aproximadamente -55 °C. El tiempo de almacenamiento a una temperatura de aproximadamente -35 °C a aproximadamente -55 °C puede variar y puede ser desde tan solo 18 horas. La sustancia farmacéutica congelada puede descongelarse de forma controlada para la formulación del producto farmacéutico.

La solicitud de patente de Estados Unidos en tramitación con la presente con n.º de serie 60/752.267, presentada el 20 de diciembre de 2005 y el documento PCT/US2006/049074 presentado el 19 de diciembre de 2006 enseñan procedimientos para la producción de proteínas de la invención, específicamente de productos glucoproteínicos recombinantes, mediante cultivos de células animales o de mamífero.

Composición farmacéutica

La presente invención utilizan composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de CTLA4Ig mezcladas con un vehículo o adyuvante aceptable que es conocido por los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas preferiblemente incluyen vehículos y adyuvantes adecuados que incluyen cualquier material que, cuando se combina con la molécula de CTLA4Ig, mantiene la actividad de la molécula y no reacciona con el sistema inmunitario del sujeto. Estos vehículos y adyuvantes incluyen, pero sin limitación, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero, tales como albúmina de suero humana, sustancias tamponadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de aceites grasos vegetales saturados, solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones (por ejemplo, emulsión de aceite en agua), sales o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, sustancias con base celulósica y polietilenglicol. Otros vehículos también pueden incluir soluciones estériles, comprimidos, que incluyen comprimidos recubiertos y cápsulas. Habitualmente los vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar (por ejemplo, sacarosa, glucosa, maltosa), ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales de los mismos, estearato de magnesio o calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles, u otros excipientes conocidos. Los vehículos también pueden incluir aromas y aditivos colorantes u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden los vehículos se formulan mediante procedimientos convencionales notorios. Las composiciones también pueden formularse en diversas composiciones lipídicas, tales como, por ejemplo, liposomas así como en diversas composiciones poliméricas, tales como microesferas poliméricas.

Las formulaciones que comprenden moléculas de CTLA4 solubles se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos en tramitación con la presente con n.º de serie 60/752,150 presentada el 20 de diciembre de 2005 y el documento PCT/US2006/062297 presentado el 19 de diciembre de 2006. Tal como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos en tramitación con la presente con n.º de serie 60/752,150, las molécula de CTLA4 solubles pueden formularse para aplicaciones IV y subcutáneas. En resumen, una formulación subcutánea (SC) adecuada comprende moléculas de CTLA4Ig a una concentración de proteína de al menos 100 mg/ml combinada con una azúcar a niveles estabilizantes en un vehículo acuoso.

En la Tabla 3 siguiente se proporciona un ejemplo de un producto farmacéutico SC con CTLA4Ig que se administra mediante una jeringuilla cargada previamente.

TABLA 3

Composición de producto farmacéutico SC de CTLA4Ig, 125 mg/ml (125 mg/jeringuilla)	
Componente	Cantidad (mg/jeringuilla)
CTLA4Ig	125

Composición de producto farmacéutico SC de CTLA4Ig, 125 mg/ml (125 mg/jeringuilla)	
Componente	Cantidad (mg/jeringuilla)
Sacarosa	170
Poloxamer 188	8,0
Fosfato sódico monobásico, monohidratado	0,143
Fosfato sódico dibásico, anhidro	0,971
Agua inyectable	c.s. hasta 1 ml

Los ejemplos I y II de la presente descripción describen la fabricación de una formulación intravenosa (IV) y subcutánea de CTLA4Ig de utilidad en los procedimientos de la invención. Más adelante se ofrece un ejemplo de la formulación de CTLA4Ig liofilizada que se utiliza en el procedimiento de la invención que se describe en el Ejemplo III.

TABLA 4

Composición de producto farmacéutico de CTLA4Ig liofilizada (250mg/vial)	
Componente	Cantidad (mg/vial) ^a
CTLA4Ig	262,5
Maltosa monohidratada	525
Fosfato sódico monobásico, monohidratado ^b	18,1
Cloruro sódico ^b	15,3
Ácido clorhídrico	Ajustar a 7,5
Hidróxido sódico	Ajustar a 7,5
^a Incluye un 5 % extra para las pérdidas en el vial, aguja y jeringuilla.	
^b Estos componentes están presentes en la solución de la sustancia farmacéutica con CTLA4Ig.	

El producto farmacéutico liofilizado puede reconstituirse con un vehículo acuoso. El vehículo acuoso de interés en el presente documento es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para la administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tras la liofilización. Habitualmente, el producto farmacéutico liofilizado se reconstituye a aproximadamente 25 mg/ml con 10 ml de agua inyectable estéril, USP (SWFI) o cloruro sódico al 0,9 % inyectable, USP. La solución reconstituida se diluye además a concentraciones de producto farmacéutico de entre 1 y 10 mg/ml con cloruro sódico al 0,9 % inyectable, USP. El producto farmacéutico diluido inyectable es isotónico y adecuado para la administración mediante infusión intravenosa.

Artículo manufacturado

Además, se describe un artículo manufacturado que contiene el producto farmacéutico y preferiblemente proporciona instrucciones para su uso. El artículo manufacturado comprende un envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas y tubos de ensayo. El envase puede estar formado por varios materiales tales como vidrio, plástico o metales.

El envase mantiene las formulaciones liofilizadas o líquidas. La etiqueta del envase, o asociada a él, puede indicar instrucciones para la reconstitución y/o el uso. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que el producto farmacéutico a 250 mg/vial debe reconstituirse a concentraciones de proteína como las que se describen anteriormente. La etiqueta puede indicar también que la formulación SC es útil o que debe usarse para la administración subcutánea. El envase con la formulación puede ser un vial de usos múltiples, que permita administraciones repetidas (por ejemplo, de 2-6 administraciones), por ejemplo, de la formulación subcutánea. De forma alternativa, el envase puede ser una jeringuilla previamente cargada que contiene, por ejemplo, la formulación subcutánea.

El artículo manufacturado puede comprender además un segundo envase que comprende, por ejemplo, un vehículo adecuado para la formulación liofilizada.

El artículo manufacturado puede incluir, además, otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas, y prospectos con instrucciones de uso.

Para un producto farmacéutico sin tensioactivos preferiblemente se utilizan las jeringuillas sin silicona, tal como tras la reconstitución de un producto farmacéutico liofilizado y/o la transferencia de las soluciones del vial a la bolsa intravenosa y puede envasarse conjuntamente con el vial del producto farmacéutico.

Procedimientos de uso

La presente invención proporciona una molécula de CTLA4Ig o composición farmacéutica de la misma para su uso en un método de tratamiento de sujetos con AI que comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de la molécula de CTLA4Ig o composición farmacéutica de la misma.

La administración de una cantidad eficaz de la molécula de CTLA4Ig o composición farmacéutica es, en particular,

para aliviar al sujeto de al menos uno de los síntomas asociados a la enfermedad, que incluyen la reducción de: inflamación de las articulaciones, dolor con la exploración de las articulaciones, inflamación, rigidez matinal y dolor, y daños estructurales que posteriormente disminuyen la capacidad física.

5 Los procedimientos de la invención también pueden usarse para mejorar la función física de los sujetos con AI tal como se evalúa en el Cuestionario de valoración de la salud (HAQ) y/o el instrumento de calidad de vida relacionada con la salud (SF-36).

10 Los procedimientos de la invención pueden usarse también para inhibir los daños estructurales de las articulaciones en sujetos con AI evaluados por la puntuación de la erosión y el edema de la médula ósea y/o puntuación de sinovitis de la muñeca y la mano.

15 La cantidad de alivio de los síntomas que proporciona la presente invención puede medirse usando cualquiera de los criterios aceptados establecidos para medir y documentar el alivio de los síntomas en un entorno clínico. Los criterios aceptables para medir el alivio de los síntomas puede incluir puntuaciones que se basan en los criterios establecidos por el American College of Rheumatology (por ejemplo, ACR 20), las cuatro mediciones de alivio de los síntomas (en: "CDER Guideline for the Clinical Evaluation of Anti-inflammatory and Antirheumatic Drugs—FDA 1988"), y el Cuestionario de evaluación de la salud (HAQ) (Fries, J.F. y cols., *J. Rheumatology*, 9:789-793 (1982)). Para una descripción general de estos criterios, véase *Guidance for Industry: Clinical Development Programs for Drugs, Devices, and Biological products for the Treatment of Rheumatoid Arthritis (AR)* (Feb. 1999).

20 La presente invención proporciona diversos procedimientos, locales o sistémicos, para administrar la molécula de CTLA4Ig sola o junto con otros fármacos terapéuticos. Los procedimientos incluyen procedimientos intravenosos, intramusculares, intraperitoneales, orales, de inhalación y subcutáneos, así como procedimientos de bomba implantable, infusión continua, genoterapia, liposomas, supositorios, contacto tópico, vesículas, cápsulas e inyección. La CTLA4Ig, complejada con un vehículo, se liofiliza habitualmente para su almacenamiento y se reconstituye con agua o una solución tamponada antes de su administración. Tal y como es la práctica estándar en la técnica, las composiciones de la invención pueden administrarse al sujeto en cualquier forma farmacéuticamente aceptable.

25 El modo de administración y pauta posológica más eficaz para las formulaciones de esta invención depende de la salud del paciente y de la respuesta al tratamiento y del juicio del doctor que lo trate. De acuerdo con la práctica de la invención, una cantidad eficaz para tratar a un sujeto es una cantidad de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg de peso de un sujeto. En otra modalidad, la cantidad eficaz es una cantidad de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso de un sujeto, preferiblemente de 1 a 10 mg/kg de peso de un sujeto. En una modalidad específica, la cantidad eficaz de CTLA4Ig es de aproximadamente 2 mg/kg de peso de un sujeto. En otra modalidad específica, la cantidad eficaz de CTLA4Ig es de aproximadamente 10 mg/kg de peso de un sujeto. En otra modalidad específica, una cantidad eficaz de CTLA4Ig es 500 mg para un sujeto que pese menos de 60 kg, 750 mg para un sujeto que pese entre 60-100 kg y 1000 mg para un sujeto que pese más de 100 kg.

30 Las formulaciones de moléculas de CTLA4Ig de la invención pueden administrarse a un sujeto en una cantidad y durante un tiempo (por ejemplo, cantidad de tiempo y/o veces múltiples) suficiente para bloquear la unión de las moléculas de B7 endógenas (por ejemplo, CD80 y/o CD86) a sus ligandos respectivos, en el sujeto. El bloqueo de la unión de B7 endógena y el ligando por lo tanto inhibe las interacciones entre las células positivas para B7 (por ejemplo, células positivas para CD80 y/o CD86) con células positivas para CD28 y/o CTLA4. Por consiguiente, las dosis de los agentes pueden variar dependiendo del sujeto y el modo de administración, las solicitudes de patentes de Estados Unidos publicadas n.º 2003/0083246 y 2004/0022787 enseñan dosis y pautas de administración para CTLA4Ig que tienen la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N.º: 2 para tratar enfermedades reumáticas, tales como artritis reumatoide. Una cantidad eficaz de molécula de CTLA4Ig puede administrarse a un sujeto una vez al día, a la semana, al mes y/o al año, en una sola vez o en veces múltiples por hora/día/semana/mes/año, dependiendo de la necesidad. Por ejemplo, en una modalidad, puede administrarse inicialmente una cantidad eficaz de la molécula de CTLA4Ig una vez cada dos semanas durante un mes, y después de eso una vez al mes o los Días 1, 15, 29 y después una vez al mes. Se permite un intervalo de +/- 3 días para las primeras dosis (es decir, los Días 15 y 29). Se permite un intervalo de +/- 7 día para las dosis mensuales posteriores.

35 De forma alternativa, una persona con conocimiento en la técnica sería capaz de modificar la pauta de administración como respuesta al estado de riesgo del paciente y/o su respuesta al tratamiento. Por ejemplo, la pauta que se describe anteriormente podría modificarse añadiendo el día de administración 5 a la pauta.

40 Tal como se usa en el presente documento, "cuatro semanas," "mes", "meses" o "mensual" se refiere a un periodo de 28 ± 7 días

45 Habitualmente, las dosis de la formulación de la molécula de CTLA4Ig de la invención están basadas en el peso corporal, y las pautas de administración pueden venir dictadas por los perfiles mínimos diana en suero. Habitualmente, la concentración mínima diana de las moléculas de CTLA4Ig de la invención de entre aproximadamente 3 µg/ml y aproximadamente 35 µg/ml serán suficiente para tratar AI o para prevenir el desarrollo

de AR en sujetos con AI, preferiblemente de entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml, más preferiblemente de entre aproximadamente 10 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml. Una persona experta en la técnica sería capaz de ajustar la dosis y/o la pauta de administración de CTLA4Ig para lograr las concentraciones mínimas en suero deseadas.

5 La administración de las moléculas o composiciones farmacéuticas de la invención puede ser mediante una infusión intravenosa de 30 minutos a una hora o más. De forma alternativa, las inyecciones subcutáneas múltiples pueden administrar la dosis necesaria.

10 Las moléculas de CTLA4Ig de la invención pueden administrarse de forma concomitante o secuencial junto con otro tratamiento inmunosupresor / inmunomodulador, por ejemplo, como se especifica en el presente documento, las dosis del compuesto inmunosupresor, o inmunomodulador variarán por supuesto dependiendo del tipo de cofármaco empleado.

15 Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) pueden administrarse de forma concomitante o secuencial junto con la molécula de CTLA4Ig de la invención. Los AINE reducen las reacciones inflamatorias en un sujeto. Los AINE incluyen, pero sin limitación ácido acetilsalicílico, salicilato de colina magnesio, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato sódico, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tolmetina, acetaminofeno, 20 ibuprofeno, inhibidores de Cox-2, meloxicam y tramadol.

Los corticosteroides pueden administrarse de forma concomitante o secuencial junto con la molécula de CTLA4Ig de la invención. Por ejemplo, dosis bajas estables de corticosteroide oral (equivalente a ≤10 mg de prednisona al día), o 25 dosis altas de corticosteroides administradas cada seis meses como ciclo oral (equivalente a 20 mg/día de prednisona al día durante un máximo de dos semanas), o una única dosis IM (intramuscular) o una única dosis IA (intra-articular).

Los ejemplos de corticosteroides incluyen pero sin limitación, betametasona, budesonida, cortisol, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona.

30 Habitualmente, la dosis y pauta de administración estándar de los fármacos coadministrados que se describen anteriormente no se ven influenciados por la adición de las moléculas de CTLA4Ig de la invención a la pauta de tratamiento. Sin embargo, una persona con conocimientos en la técnica puede prescribir dosis menores de los fármacos coadministrados debido a la incorporación de las moléculas de CTLA4Ig de la invención menos tóxicas en 35 la pauta de tratamiento. La información de prescripción puede basarse en el prospecto para cada fármaco coadministrado.

Tal como se describe anteriormente, la destrucción de las articulaciones se produce al inicio de la AR. Este entendimiento ha subrayado la necesidad de tratamientos que puedan alterar de forma fundamental y no meramente 40 suprimir los procesos inflamatorios que provocan los síntomas debilitantes y las lesiones estructurales al inicio del curso de la AR. En consecuencia, esto ha supuesto un creciente énfasis en el diagnóstico y tratamiento tempranos de la AR. Sin embargo, los criterios de 1987 de la ARA para la AR son menos sensibles y específicos cuando se aplican a sujetos con artritis inflamatoria y estos sujetos reciben entonces el diagnóstico de artritis indiferenciada, un problema clínico habitual.

45 Recientemente se ha demostrado que los sujetos con AI que también dan positivo para anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos (positivos en anticuerpos contra CCP2) presentan un riesgo elevado de desarrollar AR desde tan solo un año después de la observación (Van Gaalen, F.A. y cols., "Autoantibodies to Cyclic Citrullinated Peptides Predict Progression to Rheumatoid Arthritis in Patients with Undifferentiated Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 50(3):709- 50 715 (2004)). Una prueba positiva para determinar la presencia de anticuerpos en suero contra los péptidos citrulinados cíclicos tiene un mayor valor predictivo del desarrollo de AR que los criterios más tradicionales, tales como la presencia o ausencia de factor reumatoide. El 83 % de los sujetos con AI que dieron positivo para anticuerpos contra CCP desarrollaron AR en un año, comparado con 18 % de los controles negativos para anticuerpos contra CCP. Este hallazgo sugiere que puede identificarse fácilmente una subpoblación de sujetos con 55 AI que tendrán riesgo de desarrollar AR y que por lo tanto serían candidatos ideales para el tratamiento dirigido contra los mecanismos subyacentes que desencadenan la inflamación y la destrucción de las articulaciones en AR. La estrategia podría prevenir el desarrollo de lesiones articulares, discapacidad funcional y posterior menor calidad de vida que desafortunadamente caracteriza la historia natural de la AR.

60 Los ejemplos III y IV describen un estudio clínico diseñado para comparar la eficacia de CTLA4Ig con placebo para prevenir el desarrollo de AR en sujetos con artritis indiferenciada de inicio reciente que presentan un riesgo elevado de desarrollar AR.

65 El estudio clínico es un estudio de diseño en paralelo, aleatorizado, de doble ciego, controlado con placebo, de dos grupos de 12 meses de duración para el criterio de valoración primario y de 24 meses para el criterio de valoración secundario. Los sujetos se asignan de forma aleatoria 1:1 para recibir o CTLA4Ig o placebo durante los seis

primeros meses del estudio. La aleatorización se estratifica en dos grupos basándose en la presencia o ausencia de erosiones.

Los sujetos de este estudio se seleccionaron cuidadosamente para asegurarse de que tenían AI de inicio reciente (es decir, presencia de síntomas de artritis durante < 18 meses), de que eran positivos para anticuerpos contra CCP2, de que no cumplían los criterios de diagnóstico de ninguna otra enfermedad reumática, y de que no habían recibido más tratamiento con DMARD durante más de 2 semanas o de ningún fármaco biológico indicado para la AR. El estudio se diseñó para investigar si un periodo de tratamiento relativamente corto, 6 meses, con monoterapia con CTLA4Ig prevenía la progresión a AR en 1 año o 2 años después del inicio del tratamiento. Además, se exploraron los efectos de CTLA4Ig sobre la actividad de la enfermedad, función física, calidad de vida relacionada con la salud, y actividad del biomarcador PD en sujetos con AI y se compararon con placebo tanto durante el periodo de tratamiento de 6 meses y durante hasta 18 meses después de la última dosis de la medicación del estudio. La inclusión de un periodo de observación sin tratamiento durante 18 meses después de la última dosis de la medicación del estudio permitió evaluar la persistencia de cualesquiera efectos observados de tratamiento con CTLA4Ig. Se permitió el uso de AINE y de dosis bajas estables de corticosteroides orales (<10 mg/día de prednisona o equivalente), así como el uso limitado de dosis elevadas de tratamiento con corticosteroides, tanto durante los periodos de tratamiento como de observación. Los sujetos que desarrollaron AR en cualquier momento se excluyeron del estudio y podían recibir el tratamiento estándar.

Debido a los estrictos criterios de admisión, que limitaron la aleatorización a 57 sujetos (a 56 de los cuales se trató), no se realizó un análisis estadístico formal de las hipótesis. Los resultados de este estudio, sin embargo, eran generalmente coherentes en múltiples mediciones de la eficacia de los resultados (clínica, radiológica, RM, y actividad de los biomarcadores) a favor de CTLA4Ig comparado con el placebo, y proporcionan indicios de que CTLA4Ig, administrado por vía IV una vez al mes a una dosis de 10 mg/kg basado en el peso corporal durante 6 meses, ralentiza la progresión de AI a AR. El beneficio terapéutico de CTLA4Ig pareció persistir durante hasta 18 meses después de interrupción del fármaco.

La proporción de sujetos que desarrollaron AR para el mes 12 era menor para el grupo que recibió CTLA4Ig (12/27, 46,2 %) que para el grupo con placebo (16/24, 66,7 %) (20,5 % de diferencia entre tratamientos; IC a 95 %: ~47,4 %, +7,8 %). Para el mes 24, 87,5 % (12/24) de los sujetos con AI habían desarrollado AR en el grupo con placebo comparado con 73,9 % (17/23) de sujetos que habían recibido un ciclo de 6 meses de tratamiento con CTLA4Ig (13,6 % de diferencia entre tratamientos; IC a 95 %: -37,6 %, +10,8 %). La dosis escalonada según el peso de 10 mg/kg dosis de CTLA4Ig que se usó en este estudio de sujetos con AI es análoga a la dosis de 10 mg/kg autorizada para el tratamiento de AR en adultos.

En esta población de sujetos con AI, el tratamiento con CTLA4Ig mejoró la función física y la actividad de la enfermedad referida por el médico. En el mes 6, más de dos veces el número de sujetos tratados con CTLA4Ig comparado con placebo habían logrado una mejora en función física clínicamente significativa (HAQ-DI) (62 % frente a 24 %) o presentaban remisión de la enfermedad indicada por una puntuación en el DAS-28 (CRP) de < 2,6 (71 % contra 35 %). Las mejoras numéricamente mayores en ILLAQ-DI y DAS 28 (CRP) observadas al final del periodo de tratamiento del estudio con CTLA4Ig eran aún evidentes después de 6 y 18 meses de seguimiento sin tratamiento, aunque las diferencias entre el grupo de tratamiento y de placebo eran menores los meses 12 y 24. Las evaluaciones radiográficas usando imágenes de RM con contraste de gadolinio de la mano y muñeca y las radiografías convencionales de manos y pies, indicaron una progresión mínima de la enfermedad durante el periodo de tratamiento con el fármaco del estudio entre los sujetos que recibieron CTLA4Ig.

De forma notable, después de 6 meses de tratamiento con CTLA4Ig, se redujeron los niveles en suero de los anticuerpos contra CCP2, y esta reducción era evidente todavía después de 6 meses sin tratamiento con el fármaco del estudio. Por comparación, los niveles de los anticuerpos contra CCP2 aumentaron en el grupo con placebo. Los anticuerpos contra CCP2 predicen con mucha fiabilidad el futuro desarrollo de AR tanto en sujetos sanos como en pacientes con artritis indiferenciada.

Se ha defendido una estrategia conservadora para el tratamiento de AI temprana, limitando el uso de los DMARD y posteriormente de los tratamientos biológicos sólo a aquellos pacientes cuyos síntomas y signos de artritis no responden a los AINE y a dosis bajas de corticosteroides. En este estudio de 56 sujetos con AI, CTLA4Ig fue bien tolerado por los individuos con enfermedad en una etapa muy temprana. Durante los 6 meses del periodo de tratamiento del estudio, los EA se refirieron a tasas similares en los grupos con CTLA4Ig y con placebo, ningún EA provocó la muerte, e igualmente, pocos sujetos en ambos grupos de tratamiento presentaron un EAG (1 en cada grupo de tratamiento) o fueron excluidos debido a un EA (1 en cada grupo de tratamiento). Además, no se observaron indicios de un mayor riesgo de infecciones con CTLA4Ig, y sólo 1 sujeto refirió EA por la infusión en el intervalo de 1 hora desde el inicio de la infusión con CTLA4Ig. Los datos del laboratorio clínico de hematología y análisis bioquímico de la sangre generalmente no presentaban nada que reseñar y no se identificaron problemas de seguridad. Cuatro (4) sujetos se convirtieron en seropositivos para anticuerpos contra CTLA4-T el mes 12, 2 de los cuales dieron positivo para anticuerpos neutralizadores. El desarrollo de anticuerpos no pareció mostrar relación directa con los hallazgos sobre seguridad clínica.

Los inventores descubrieron que la administración de CTLA4Ig retardó la progresión a AR definitiva en los pacientes con AI. Además, los efectos modificadores de la enfermedad del tratamiento con CTLA4Ig se mantuvieron durante 6 meses después de interrumpir el tratamiento.

- 5 La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deberían interpretarse como limitantes del alcance de la invención, que está definido por las reivindicaciones.

EJEMPLO I

- 10 El producto farmacéutico CTLA4Ig, liofilizado, (250mg/vial) es uno estéril, apirógeno adecuado para la administración intravenosa (IV). Cada vial de uso único contiene 250 mg de CTLA4Ig que se reconstituye con agua inyectable estéril, USP y que se diluye además con cloruro sódico al 0,9 % inyectable, USP, en el momento de usar.

- 15 La fórmula del lote para un tamaño del lote de 115 litros se describe en la Tabla 5 más adelante.

TABLA 5
Fórmula del lote

Componente	Cantidad (kg)
Sustancia farmacéutica con CTLA4Iga	4,6
Maltosa monohidratada	9,2
Ácido clorhídrico	Ajustar a pH 7,5
Hidróxido sódico	Ajustar a pH 7,5
Agua inyectable	c.s. hasta 119,6b
^a Sustancia farmacéutica con CTLA4Ig: concentración proteínica 50 mg/ml, fosfato sódico 25 mM, cloruro sódico 50 mM, pH de 7,5, <5 % de especies de APM.	
^b densidad de la solución a granel formulada = aprox. 1,04 g/ml.	

- 20 Se añade la cantidad necesaria de sustancia farmacéutica de CTLA4Ig a un recipiente de mezclado limpio y esterilizado de acero inoxidable equipado con un mezclador. La solución de la sustancia farmacéutica se mezcla a 250 ± 50 rpm manteniendo la temperatura de la solución entre 5-25 °C.

Se añade la cantidad necesaria de maltosa monohidratada en polvo al recipiente de mezclado. La solución se mezcla durante un mínimo de 10 minutos a 15-25 °C.

- 25 El pH de la solución se ajusta a 7,3-7,7, si fuera necesario usando la solución de hidróxido sódico 1 N o la solución de ácido clorhídrico 1 N preparadas anteriormente. El lote se lleva al peso final del lote (c.s. final) usando agua inyectable, USP, y se mezcla durante un mínimo de 8 minutos. Se toman muestras de la solución a granel formulada para determinar el pH.

- 30 La solución a granel formulada se filtra previamente con un filtro de 0,45 µm. Se toman muestras de la solución a granel formulada después de filtrar con un filtro de 0,45 µm para determinar la carga biológica y el contenido en endotoxinas bacterianas (BET).

- 35 La solución a granel formulada prefiltrada se esteriliza por filtración con dos filtros de 0,22 µm en serie antes del llenado.

- 40 La solución a granel formulada esterilizada por filtración se envasa y se tapa parcialmente con un tapón de butilo gris Daikyo de 20 nm mediante una máquina automática de envasado y taponado. Los viales con laminado interior de vidrio de plomo de tipo I de 15 cc se lavan y se esterilizan/despirogenizan.

- Los viales de producto farmacéutico cargados y parcialmente taponados se liofilizan. En la Tabla 6 siguiente se proporciona un resumen del ciclo de liofilización que se usó para la liofilización del producto farmacéutico con CTLA4Ig.

45 TABLA 6

Ciclo de liofilización para el producto farmacéutico con CTLA4Ig liofilizado	
Parámetro de procesamiento	Control durante el proceso
Temperatura de carga	5 + 3 °C
Congelación (curva descendente)	De 5 °C a -45 °C en 2,5 horas.
Congelación	Mantener a -45 + 3 °C durante 4 horas.
Secado primario (curva descendente)	De -45 °C a -19 °C en 2 horas.
Secado primario (vacío)	100 + 20 micrómetros
Secado primario	Mantener a -19 + 2 °C durante 84 horas.
Secado intermedio (curva descendente)	De -19 °C a 0 °C en 2 horas.

Ciclo de liofilización para el producto farmacéutico con CTLA4Ig liofilizado	
Parámetro de procesamiento	Control durante el proceso
Secado intermedio	Mantener a 0 + 3 °C durante 8 horas.
Secado secundario (curva descendente)	De 0 °C a 30 °C en 2,5 horas.
Secado secundario (vacío)	100 + 20 micrómetros
Secado secundario	Mantener a 30 °C durante 12 horas.
Taponado	30 + 3 °C
Taponado (Vacío)	500 + 100 micrómetros
Almacenamiento antes de descargar	Mantener a 20 + 3 °C durante al menos 4 horas.

Al final del ciclo de liofilización, la presión de la cámara se eleva a 500 micrómetros usando nitrógeno esterilizado por filtración y se lleva a cabo el taponado de los viales a vacío. Los viales taponados permanecen en el liofilizador durante al menos 4 horas. Los viales liofilizados y taponados se sellan con un precinto de aluminio de 20 mm, blanco flip-off con aire filtrado con HEPA mediante la máquina taponadora. Los viales sellados se enjuagan con agua mediante un lavaviales exterior. Los viales con el producto farmacéutico lavados se almacenan de 2 a 8 °C.

La composición de producto farmacéutico de CTLA4Ig liofilizado (250 mg/vial) se recoge en la Tabla 7 siguiente.

TABLA 7

Composición de producto farmacéutico de CTLA4Ig liofilizado (250 mg/vial)	
Componente	Cantidad (mg/vial) ^b
CTLA4Ig	262,5
Maltosa monohidratada	525
Fosfato sódico monobásico, monohidratado ^b	18,1
Cloruro sódico ^b	15,3
Ácido clorhídrico	Ajustar a 7,5
Hidróxido sódico	Ajustar a 7,5
^a Incluye un 5 % extra para las pérdidas en el vial, aguja y jeringuilla.	
^b Estos componentes están presentes en la solución de la sustancia farmacéutica con CTLA4Ig.	

EJEMPLO II

El producto farmacéutico de CTLA4Ig SC, 125 mg/ml (125 mg/vial) se formula en forma de una solución estéril, apirógena, lista para usar adecuada para la administración subcutánea. Se fabrica un lote de producto farmacéutico de CTLA4Ig SC, 125 mg/ml (125 mg/vial) a una escala de 5 l (3.500 viales). La fórmula del lote se describe en la Tabla 8 siguiente.

TABLA 8

Fórmula del lote	
Componente	Cantidad (g)
Sustancia farmacéutica con CTLA4Iga	625
Sacarosa	850
Poloxamer 188	40
Fosfato sódico monobásico, monohidratado	0,715
Fosfato sódico dibásico, anhidro	4,86
Agua inyectable	c.s. hasta 5,0 l
Tamaño total del lote (l)	5,0
^a Sustancia farmacéutica con CTLA4Ig: concentración proteínica 50 mg/ml, fosfato sódico 25 mM, cloruro sódico 50 mM, pH de 7,5, <5 % de especies de APM.	

Tal como se describe anteriormente en el Ejemplo I, el procedimiento de fabricación para el producto farmacéutico de CTLA4Ig SC, 125 mg/ml (125 mg/vial) supone el intercambio de tampones de la sustancia farmacéutica a granel de fosfato sódico 15 mM, cloruro sódico mM a un pH de 7,5 a tampón de fosfato sódico 10 mM a pH 7,8, seguido de concentración de la proteína de ~50 mg/ml a ~150 mg/ml por eliminación del tampón. Después se disuelven la sacarosa y el Poloxamer 188 en la solución de proteína concentrada y se ajusta el peso del lote final con tampón de fosfato sódico 10 mM, a pH 7,8. La solución a granel se filtra a través de un filtro esterilizador de 0,22 micrómetros y se carga en viales de vidrio de plomo de tipo I de 5 cc esterilizados y despirogenados, tapados con tapones de caucho de 20 mm y sellados con precintos flip-off de aluminio de 20 mm.

La composición del producto farmacéutico de CTLA4Ig SC, 125 mg/ml (125 mg/vial) se proporciona en la Tabla 9 siguiente.

TABLA 9

Composición del producto farmacéutico de CTLA4Ig SC, 125 mg/ml (125 mg/vial)	
Componente	Cantidad (mg/vial) ^c
CTLA4Ig	175
Sacarosa	238
Poloxamer 188	11,2
Fosfato sódico monobásico, monohidratado	0,20
Fosfato sódico dibásico, anhidro	1,36
Agua inyectable	c.s. hasta 1,4 ml
^a Incluye un 40 % extra para las pérdidas en el vial, aguja y jeringuilla.	

EJEMPLO III

5 La artritis reumatoide (AR) es un trastorno autoinmunitario que puede provocar la destrucción progresiva de las articulaciones, deformidad, discapacidad física significativa y mala calidad de vida. No se ha demostrado que ningún tratamiento prevenga el desarrollo de la AR. Este estudio comparará la eficacia de CTLA4Ig con placebo en la prevención del desarrollo de AR en sujetos con artritis indiferenciada (AI) de inicio reciente que presentan un riesgo elevado de desarrollar AR durante el periodo del estudio.

10 **Objetivo primario**
 Evaluar la proporción de sujetos con AI que desarrollan AR según se define en los criterios de la ARA de 1987 un año después del inicio de la medicación ciega del estudio.

15 **Objetivos secundarios**

1) Evaluar la proporción de sujetos con AI que desarrollan AR según se define en los criterios de la ARA de 1987 dos años después del inicio de la medicación ciega del estudio.

20 2) Evaluar el grado de sinovitis y lesiones articulares estructurales de las manos (articulaciones carpianas, MCP y PIP) a los 6, 12, y 24 meses después del inicio del tratamiento en estudio entre los dos grupos de tratamiento usando RM.

3) Evaluar la proporción de sujetos con sinovitis clínica sintomática persistente a los 6, 12, y 24 meses después del inicio de la medicación entre los dos grupos de tratamiento.

25 4) Evaluar el efecto farmacodinámico de CTLA4Ig sobre los niveles en suero de autoanticuerpos [factor reumatoide IgM y contra péptido citrulinado cíclico (anticuerpos contra CCP2)].

5) Evaluar la actividad de la enfermedad en función del tiempo entre los grupos de tratamiento usando los valores medios de la puntuación en el DAS completo (CRP).

30 6) Evaluar la proporción de sujetos con puntuación en el DAS completo de <1,6 a los 6, 12, y 24 meses.

7) Evaluar la función física y calidad de vida relacionada con la salud usando los instrumentos de Índice de discapacidad de HAQ (HAQ) y SF-36, respectivamente.

8) Evaluar la seguridad de CTLA4Ig en esta población del estudio, que incluye evaluación de la capacidad inmunógena de CTLA4Ig tras completar un ciclo de tratamiento de seis meses.

35 **Objetivo terciario**
 1) Evaluar los cambios en componentes fundamentales de la variable compuesta de AR según el ACR (artritis reumatoide según el American College of Rheumatology) en función del tiempo entre los dos grupos de tratamiento.

40 **Diseño del estudio**
 Este estudio es un estudio de diseño en paralelo, aleatorizado, de doble ciego, controlado con placebo, de dos grupos de 12 meses de duración para el criterio de valoración primario y de 24 meses para el criterio de valoración secundario. Los sujetos se asignarán de forma aleatoria 1:1 para recibir o CTLA4Ig o placebo durante los seis primeros meses del estudio. La aleatorización se estratificará en dos grupos basándose en la presencia o ausencia de erosiones (leídas centralmente). Se permitirá a los sujetos tomar fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) durante todo el estudio. Se permitirá a los sujetos tomar una dosis oral baja estable de corticosteroides (equivalente a ≤10 mg de prednisona al día) durante todo el estudio. Pueden utilizarse hasta dos de las siguientes medicaciones de corticosteroides concomitantes a dosis elevadas cada seis meses del ensayo según el criterio del investigador: ciclo oral (equivalente a 20 mg/día de prednisona al día durante un máximo de dos semanas), o una única dosis IM o una única dosis IA. Los sujetos con artritis persistente después de seis meses de la medicación del estudio pero que no cumplen los criterios de AR se observarán sin la medicación del estudio y se les permitirá tomar las medicaciones concomitantes que se describen anteriormente según el criterio del investigador. No se permitirán administraciones posteriores de medicación del estudio.

55 Los sujetos que desarrollen el criterio de valoración primario (AR según criterios de la ARA) en cualquier momento

durante el ensayo se excluirán del estudio y se les permitirá recibir tratamiento antirreumático según el criterio del investigador, que incluye DMARD y/o tratamiento biológico.

5 A los sujetos inicialmente se les administrarán dosis basándose en su peso en la visita de selección. Los sujetos que pesen < 60 kg recibirán 500 mg; los sujetos que pesen entre 60 y 100 kg recibirán 750 mg, y los sujetos que pesen > 100 kg recibirán 1 gramo. Se administrará CTLA4Ig los Días 1, 15, 29 y cada 28 días después de eso durante un total de 8 dosis. Se permitirá a los sujetos tomar una dosis oral baja estable de corticosteroides (equivalente a ≤10 mg de prednisona al día) durante todo el estudio.

10 Los sujetos a los que se les ha diagnosticado artritis inflamatoria indiferenciada se evaluarán en el Periodo de selección para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anticuerpos contra CCP2). Los sujetos que presenten una prueba positiva de anticuerpos contra CCP2 se estratificarán basándose en la presencia o ausencia de erosiones y se asignarán aleatoriamente al Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio. El Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio será de seis meses de tratamiento o con
15 CTLA4Ig o con placebo. Los sujetos que completen el periodo de tratamiento que no cumplan los criterios de AR se observarán sin de la medicación del estudio en el Periodo de observación manteniendo el ciego. El Periodo de observación consistirá en visitas trimestrales durante 18 meses para determinar la seguridad y eficacia.

20 Población del Estudio

Hombres o mujeres (que no estén lactando ni embarazadas) de al menos 18 años de edad, pero no superior a los 75 años con diagnóstico de artritis inflamatoria indiferenciada (AI) que presenten sinovitis clínica sintomática de dos o más articulaciones y que 1) posean al menos uno y no más de tres de los criterios de la ARA de 1987 para el diagnóstico de AR, 2) no cumplan los criterios de diagnóstico para ninguna otra enfermedad reumática (por ejemplo, lupus eritematoso), y 3) que también sean positivos para autoanticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos mediante ELISA (Immunoscan AR Mark 2, Euro-Diagnostica, Arnhem, Holanda). La duración de la enfermedad [definida como el tiempo desde el inicio de los síntomas (dolor de la articulación, hinchazón, o rigidez significativa) de artritis inflamatoria indiferenciada hasta la admisión] debe ser de menos de 18 meses. No se permite ningún
25 tratamiento anterior con DMARD ni tratamiento biológico antes de la selección.

30 Criterios de evaluación

El criterio de valoración primario del estudio será la proporción de sujetos con un diagnóstico de AR según los criterios de la ARA de 1987 a 12 meses.

35 La medición de los criterios de valoración secundarios incluyen la proporción de sujetos con diagnóstico de AR según los criterios de la ARA de 1987 a los 24 meses, la proporción de sujetos con sinovitis clínica sintomática persistente a los 6, 12, y 24 meses, la puntuación media del DAS completo (CRP) a los 6, 12, y 24 meses, la proporción de sujetos con una puntuación en el DAS de <1,6 a los 6, 12, y 24 meses, valoraciones de factor reumatoide y de anticuerpos contra CCP e inflamación y lesiones estructurales (grado de sinovitis, erosiones, y osteítis) de las manos según RM con contraste de gadolinio usando un lector centralizado ciego a la secuencia y el
40 tratamiento. Los criterios de valoración referidos por los sujetos incluirán el HAQ y SF-36.

45 Los cambios en los componentes fundamentales de la variable compuesta de AR según el ACR se evaluarán en función del tiempo entre los dos grupos de tratamiento como criterio de valoración terciario.

Análisis de la eficacia

50 El análisis de la eficacia primario será evaluar las tasas de desarrollo de AR a los 12 meses en CTLA4Ig y placebo. Se proporcionarán estimaciones puntuales y de intervalos para la proporción de sujetos con diagnóstico de AR a los 12 meses para los dos grupos de tratamiento. Los sujetos que interrumpan el estudio con una razón expresada de "falta de eficacia" en el CRF se considerará que no responden para el criterio de valoración primario (es decir, se contarán en el numerador y denominador al evaluar la proporción de sujetos que desarrollan AR según los criterios de la ARA). Si a un sujeto le faltan datos en la visita del mes 12 sin que se deba a la interrupción y tiene una
55 evaluación de la visita posterior, se usará esta evaluación en el análisis de los 12 meses. Si no, los sujetos no se incluirán en el análisis. Se realizarán análisis similares para evaluar las tasas de desarrollo de AR a los 24 meses.

60 El grado de sinovitis y de lesiones articulares estructurales se evaluará usando RM. Se usará el sistema de puntuación OMERACT 6 AR RM (Ostergaard, M. y cols., "OMERACT Rheumatoid Arthritis Magnetic Resonance Imaging Studies. Core Set of MRI Acquisitions, Joint Pathology Definitions, and the OMERACT AR-MRI Scoring System", *J. Rheumatology*, 30(6):1385-1386 (2003)). Se resumirán los cambios desde el inicio en erosión, edema, y sinovitis a los 6, 12, y 24 meses usando herramientas estadísticas descriptivas.

65 La persistencia de sinovitis clínica sintomática se evaluará a los 6, 12 y 24 meses. Las tasas de sinovitis persistente se resumirán con estimaciones puntuales e intervalos de confianza al 95 % para los grupos con CTLA4Ig y con placebo.

5 Se evaluará el efecto farmacodinámico de CTLA4Ig sobre los niveles en suero de autoanticuerpos [factor reumatoide IgM y contra péptido citrulinado cíclico (anticuerpos contra CCP2)]. Se resumirá la distribución de las variables farmacodinámicas en las visitas al inicio, del mes 12 y del mes 24, junto con sus cambios desde el nivel inicial, por grupo de tratamiento. La proporción de sujetos que alcancen resultados positivos/negativos se resumirá por grupo de tratamiento y el estado inicial (positivo/negativo).

10 Los cambios medios desde el nivel inicial en DAS completo (CRP), HAQ y todos los componentes de SF-36 a los 6, 12 y 24 meses se resumirá con estimaciones puntuales e intervalos de confianza al 95 % para los grupos con CTLA4Ig y con placebo en cada visita. Además, los porcentajes de sujetos con remisión (puntuación en el DAS completo <1,6) se resumirá por grupo de tratamiento.

15 Los cambios en los componentes fundamentales de la variable compuesta de AR según el ACR se evaluarán en función del tiempo entre los dos grupos de tratamiento.

15 Análisis de la seguridad

20 Se enumerarán los hallazgos significativos de la exploración física y de los resultados de las pruebas clínicas y de laboratorio. Se tabularán las estadísticas de resumen. Se generarán distribuciones de frecuencia y listados individuales de todos los eventos adversos. Se enumerarán los cambios en los resultados de las pruebas clínicas de laboratorio desde el nivel inicial. Las interrupciones se resumirán por causa y por grupo de tratamiento.

Análisis de la capacidad inmunógena

25 La distribución de las variables de la capacidad inmunógena y sus cambios desde el nivel inicial se resumirá usando herramientas estadísticas descriptivas (medias geométricas, desviaciones típicas, etc.) y también se calcularán los intervalos de confianza al 95 % de los cambios desde el nivel inicial. La falta de capacidad inmunógena se define como la ausencia de una respuesta positiva. La existencia de una respuesta positiva se define basándose en un valor de corte de ensayo para la positividad para cada ensayo y la confirmación de esa respuesta se hace por inmunodepleción. Para el ensayo contra CTLA4Ig, el valor se calcula dividiendo la DO media de la muestra de suero del sujeto tras la administración entre la media de la DO de la muestra de suero del sujeto antes de la administración (Día 1). Para el ensayo contra CTLA4-T, el valor de corte se calcula dividiendo la DO media de la muestra de suero del sujeto tras la administración entre la DO media del control negativo de la placa de muestras. El valor de corte se establece durante la validación del ensayo y puede reestablecerse cuando se hagan cambios en las poblaciones de sujetos o en los reactivos del ensayo. Si una muestra es negativa, se le asigna un valor < la dilución que se evalúa. Si el valor es positivo, se evalúa una dilución seriada y se le asigna un valor de valoración correspondiente al recíproco de la dilución del suero interpolada que es igual al valor de corte para positividad establecido. También se calculará la tasa de respuesta positiva (si la hubiera) y su intervalo de confianza al 95 %.

40 Criterios para la selección de sujetos

Para ser admitido en el estudio, DEBEN cumplirse los siguientes criterios.

45 Criterios de inclusión

A. Consentimiento informado por escrito firmado

El sujeto está dispuesto a participar en el estudio y firma el consentimiento informado.

50 B. Población diana

Los sujetos deben haber sido diagnosticados de AI. Un sujeto con AI debería tener sinovitis clínica sintomática de dos o más articulaciones y debería presentar al menos uno y no más de tres de los criterios de clasificación de AR de la American Rheumatism Association (1987).

55 Los sujetos no deben cumplir los criterios para el diagnóstico de ninguna otra enfermedad reumática (por ejemplo, lupus eritematoso).

60 La duración de la enfermedad del sujeto [definida como el tiempo desde el inicio de los síntomas (dolor de la articulación, hinchazón o rigidez) de artritis inflamatoria indiferenciada hasta la admisión] debe ser de menos de 18 meses.

Los sujetos deben ser positivos para autoanticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos por ELISA (Immunoscan AR Mark 2, Euro-Diagnostica, Arnhem, Holanda).

65 C. Edad y sexo

Hombres y mujeres de edades entre 18 y 75 años. Los hombres y mujeres en edad fértil pueden ser admitidos si practican medidas anticonceptivas eficaces.

5 D. Medicación concomitante

Se permite el uso de corticosteroide oral a dosis baja estable durante todo el estudio. El tratamiento debe haberse reducido al equivalente de ≤ 10 mg prednisona al día durante 28 días y estabilizarse durante al menos 25 de los 28 días antes del tratamiento (Día 1).

10 Criterios de exclusión

A. Sexo y estado reproductor

15 1) Las mujeres en edad fértil que no estén dispuestas o no puedan usar un procedimiento aceptable para evitar los embarazos durante todo el periodo del estudio y durante hasta 10 semanas después de la última infusión de CTLA4Ig

2) Las mujeres que están embarazadas o dando el pecho

20 3) Las mujeres con una prueba de embarazo positiva en el momento de la admisión o antes de la administración del fármaco del estudio

4) Los hombres que no que no estén dispuestos o no puedan usar un procedimiento anticonceptivo adecuado durante todo el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio y durante hasta 10 semanas después de la última infusión de la medicación del estudio.

25 B. Historia médica y enfermedades concurrentes

5) Los sujetos que están imposibilitados, incapacitados o incapaces de completar las evaluaciones relacionadas con el estudio.

30 6) Los sujetos que cumplen los criterios para el diagnóstico de ninguna otra enfermedad reumática (por ejemplo, lupus eritematoso).

7) Con una duración de artritis indiferenciada superior a 18 meses

8) Los sujetos que previamente han recibido tratamiento con un tratamiento biológico de AR autorizado (infliximab, etanercept, anakinra, adalimumab).

35 9) Los sujetos con vasculitis activa de un sistema orgánico principal.

10) Síntomas actuales de enfermedad renal, hepática, hematológica, gastrointestinal, pulmonar, cardíaca, neurológica o cerebral grave, progresiva o incontrolada. Afecciones médicas concomitantes que, en opinión del investigador, puedan poner al sujeto en un riesgo inaceptable durante la participación en este estudio.

40 11) Sujetos femeninos que no hayan pasado una prueba de detección de cáncer de mama apropiado según la edad y/o los factores de riesgo (según se define en las directrices publicadas y/o estándares locales aprobados por la sociedad nacional de cáncer o médica y/o el Ministerio de sanidad), o que hayan tenido un estudio de detección de cáncer de mama que sea sospechoso de malignidad y en el que la posibilidad de malignidad no pueda excluirse razonablemente tras evaluaciones clínicas, de laboratorio u otras diagnósticas adicionales.

45 12) Los sujetos con historia de cáncer en los últimos cinco años (excepto cánceres de células epiteliales distintos del melanoma curados por resección local). Los cánceres de células epiteliales distintos del melanoma deben eliminarse antes de la administración.

13) Los sujetos que presentan drogadicción o alcoholismo clínicamente significativo.

14) Los sujetos con cualquier infección bacteriana aguda grave (tal como neumonía o pielonefritis a no ser que sea tratada y se haya resuelto completamente con antibióticos).

50 15) Los sujetos con infecciones bacterianas crónicas o recurrentes graves (tales como neumonía recurrente, bronquiectasia crónica).

16) Los sujetos con tuberculosis activa (TB) que requiera el tratamiento en los 3 años anteriores. Los sujetos con una PPD positiva en la selección no podrán ser admitidos durante el estudio a no ser que se haya descartado una infección activa por TB, y presenten una placa torácica negativa en el momento de la admisión. Una respuesta de PPD que sea igual o superior a 10 mm debería considerarse que es una prueba positiva, aunque puede aplicarse un umbral menor (5 mm) según venga determinado por la circunstancia clínica y por el investigador de acuerdo con directrices publicadas y/o estándares locales avalados por la sociedad médica.

55 17) Los sujetos con herpes zóster que se haya resuelto menos de 2 meses antes de la admisión.

60 18) Los sujetos con indicios (evaluados por el investigador) de infecciones bacterianas o víricas activas o latentes en el momento de la admisión, que incluye a los sujetos con indicios de infección por virus de la inmunodeficiencia humano (VIH).

C. Hallazgos en las pruebas físicas y de laboratorio

19) Sujetos positivos para antígeno superficial de la hepatitis B.

65 20) Sujetos positivos para anticuerpos contra la hepatitis C que también sean RIBA-positivos o PCR-positivos.

21) Los sujetos con cualquiera de los siguientes valores de laboratorio:

- Hgb < 8,5 g/dl.
 Leucocitos < 3.000/mm³ (3 x 10⁹/l)
 Plaquetas < 100.000/mm³ (100 x 10⁹/l).
 Creatinina en suero > 2 veces sobre el límite de la normalidad.
 ALT o AST en suero > 2 veces sobre el límite de la normalidad.

Cualesquiera otros resultados de pruebas de laboratorio que, en opinión del investigador, puedan poner al sujeto en un riesgo inaceptable durante la participación en este estudio.

D. Terapias y/o medicaciones prohibidas

- 22) Los sujetos que han recibido tratamiento con CTLA4Ig, o CTLA4Ig en cualquier momento.
 23) Los sujetos que han recibido tratamiento con cualquier fármaco en investigación en los 28 días (o menos de 5 semividas de eliminación terminales) anteriores a la dosis del Día 1.
 24) Los sujetos que actualmente están recibiendo tratamiento con columnas de inmovilización (tales como columnas ProSORBA), micofenolato mofetil (CELLCEPT®), ciclosporina, D-Penicilamina, o inhibidores de calcineurina.
 25) Tratamiento anterior con DMARD antes de la selección.

E. Otros criterios de exclusión

- 26) Los prisioneros o sujetos detenidos obligatoriamente (encarcelados involuntariamente) durante el tratamiento de una enfermedad psiquiátrica o física (por ejemplo, una enfermedad infecciosa) no deben admitirse a este estudio.

Sujetos que participan en la evaluación por RM

El radiólogo de las instalaciones de RM del emplazamiento es responsable de determinar si está contraindicado que un sujeto se someta a este procedimiento. La siguiente es una lista de las afecciones habituales que pueden impedir que el sujeto se someta a una RM de las manos/muñecas. Sin embargo, esto no debería usarse como sustituto de los estándares sanitarios clínicos locales. La decisión final de realizar una RM en un sujeto individual de este estudio es del radiólogo del emplazamiento, del investigador, y los estándares fijados por el Comité ético local.

- 1) Los sujetos que tienen historia de claustrofobia.
- 2) Los sujetos que tienen una limitación física que no les permite entrar en el túnel de los imanes (es decir, peso corporal superior a 250 libras o 113,4 kilogramos).
- 3) Los sujetos con perfilador de ojos tatuado o con tatuajes directamente en la mano o muñeca (área del que se van a obtener imágenes).
- 4) Los sujetos que presenten una historia de reacción alérgica a los agentes de contraste.
- 5) Los sujetos que han sido expuestos a un agente de contraste radiológico en las 72 horas anteriores al examen por RM.
- 6) Los sujetos que tienen una articulación fusionada o sustituciones en las articulaciones de la mano o muñeca que estén siendo evaluados por el examen mediante RM.
- 7) Los sujetos con marcapasos, cables de marcapasos epicardiacos, prótesis de válvulas cardiacas incompatibles con la RM, clips vasculares incompatibles con la RM, o clips de aneurisma de cualquier edad incompatibles con la RM.
- 8) Los sujetos con implantes cocleares incompatibles con la RM.
- 9) Los sujetos con estimuladores de los nervios vertebrales.
- 10) Los sujetos con una bomba de infusión.
- 11) Los sujetos con fragmentos metálicos en los ojos/órbitas o cerca del cerebro o de estructuras neurovasculares mayores del cuerpo, sujetos con una vida laboral que suponga exposición a soldadura, o sujetos que tengan metralla en cualquier parte del cuerpo.

Administración de CTLA4Ig o Placebo

Los sujetos se asignarán de forma aleatoria a 1 de 2 grupos de tratamiento:

- Grupo 1: infusiones intravenosas de CTLA4Ig (N = 25).
 Grupo 2: infusiones intravenosas de placebo (N = 25).

Los sujetos que reciban CTLA4Ig activa se les administrará una dosis basándose en su peso en la visita de selección. Los sujetos que pesen < 60 kg recibirán 500 mg; los sujetos que pesen entre 60 y 100 kg recibirán 750 mg, y los sujetos que pesen > 100 kg recibirán 1 gramo. Los sujetos a los que se les asigne de forma aleatoria para que reciban placebo se les administrará dextrosa al 5 % en agua o solución salina normal (NS).

Las dosis de la infusión se basarán en el peso corporal del sujeto en la visita de selección justo antes de la visita del Día 1. El Sistema de aleatorización central confirmará el peso corporal del sujeto y asignará el número de viales de CTLA4lg a asignar para la visita. Los sujetos recibirán las dosis de la medicación del estudio en cada visita durante el periodo de tratamiento (Días 1, 15, 29, 57, 85, 113, 141, y 169). Se permite un intervalo de +/- 3 días para las dosis de los Días 15 y 29; se permite un intervalo de +/- 7 días para las dosis posteriores. Las infusiones deberían producirse aproximadamente en el mismo momento del día durante toda la duración del estudio. Todas las dosis de la medicación del estudio se administrarán por vía intravenosa a un volumen fijo de 100 ml a caudal constante durante aproximadamente 30 minutos. La vía IV debe enjuagarse con 25 ml de D5W o de solución NS al final de la infusión. La solución de infusión debe proporcionarse al personal que administre la dosis en un envase que no identifique el contenido, de forma que se mantenga el ciego. El asesor clínico debe ser ciego a la asignación del tratamiento haciendo que un eslabón diferente cualificado de la plantilla realice la infusión de la medicación del estudio. Todas las infusiones intravenosas se harán con el sujeto en posición sedente. No se realizarán ajustes en el nivel o la pauta de las dosis de tratamiento. Los sujetos se observarán para determinar los eventos adversos y los signos vitales (tensión sanguínea, ritmo cardíaco, respiraciones, temperatura) se controlarán desde el inicio de cada infusión (antes de la administración y durante 60 minutos). Existe un intervalo de +/- 5-minutos para la obtención de los signos vitales. Los sujetos se observarán durante un mínimo de 1 hora desde el inicio de la infusión. El Periodo de observación debería extenderse si es lo clínicamente indicado.

Modificaciones de las dosis en ausencia de eventos adversos

En ausencia de eventos adversos que se considere que están al menos posiblemente relacionados con el tratamiento con la medicación del estudio, los sujetos completarán sus infusiones programadas tal como se ha prescrito por protocolo. La dosis programada del sujeto se administrará en 72 horas (+/- 3 días) antes o después del día diana para adaptarse a la conveniencia del sujeto y/o del personal del emplazamiento para los Días 15 y 29. Se permite un intervalo de +/- 7 día para las dosis posteriores.

Tratamientos prohibidos y restringidos durante el estudio

No están permitidos los DMARD (por ejemplo, metotrexato, oro oral o parenteral, sulfasalazina, cloroquina, hidroxiclороquina, D-penicilamina, azatioprina, leflunomida, ciclosporina) o biológicos (por ejemplo, etanercept, adalimumab, anakinra).

Se permitirá a los sujetos tomar fármacos antiinflamatorios no esteroideos durante todo el estudio. Se permitirá a los sujetos tomar una dosis oral baja estable de corticosteroides (equivalente a ≤10 mg de prednisona al día) durante todo el estudio. Pueden utilizarse hasta dos de las siguientes medicaciones de corticosteroides concomitantes a dosis elevadas cada seis meses del ensayo según el criterio del investigador: ciclo oral (equivalente a 20 mg/día de prednisona al día durante un máximo de dos semanas), o una única dosis IM (intramuscular) o una única dosis IA (intraarticular).

Se permite el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), que incluyen aspirina (ASA), durante este periodo.

Deberían evitarse las inyecciones IA e IM de corticosteroides. No se permiten inyecciones IA o IM de esteroides a dosis altas ARE durante el mes anterior a la evaluación clave de la eficacia (es decir, Día 169, mes 12, y mes 24).

Las siguientes medicaciones pueden usarse, excepto 12 horas antes de la evaluación articular:

acetaminofeno (paracetamol)
 productos combinados que incluyan acetaminofeno y analgésicos narcóticos (por ejemplo, acetaminofeno con fosfato de codeína, acetaminofeno con napsilato de propoxifeno, acetaminofeno con clorhidrato de oxicodona, acetaminofeno con bitartrato de hidrocodona, etc.) tramadol

TABLA 10

Procedimientos y observaciones del estudio								
A. Fase de tratamiento con el fármaco del estudio en doble ciego								
Día de visita	Día 1 ^a	Día 15 (+/- 3 días)	Día 29 (+/- 3 días)	Día 57 (+/- 7 días)	Día 85 (+/- 7 días)	Día 113 (+/- 7 días)	Día 141 (+/- 7 días)	Día 169 (+/- 7 días)
Aleatorizar y estratificar a los sujetos (Contactar con el Centro de aleatorización central)	X							
Evaluaciones de la eficacia								X
Radiografías de manos y pies								X

ES 2 539 840 T3

Procedimientos y observaciones del estudio								
A. Fase de tratamiento con el fármaco del estudio en doble ciego								
Día de visita	Día 1 ^a	Día 15 (+/- 3 días)	Día 29 (+/- 3 días)	Día 57 (+/- 7 días)	Día 85 (+/- 7 días)	Día 113 (+/- 7 días)	Día 141 (+/- 7 días)	Día 169 (+/- 7 días)
RM de mano-muñeca con gadolinio (únicamente en emplazamientos europeos)								X
Recuento de articulaciones con dolor por palpación ^b	X	X	X	X	X	X	X	X
Recuento de articulaciones hinchadas	X	X	X	X	X	X	X	X
Evaluación del dolor por el sujeto	X	X	X	X	X	X	X	X
Evaluación de la actividad de la enfermedad por el sujeto	X	X	X	X	X	X	X	X
Evaluación global por el doctor de la actividad de la enfermedad	X	X	X	X	X	X	X	X
Evaluación global por el sujeto de la función física (HAQ)	X	X	X	X	X	X	X	X
SF-36	X		X		X			X
Respuesta de los sujetos al tratamiento					X			X
Evaluaciones de la seguridad								
Control de los eventos adversos	X	X	X	X	X	X	X	X
Examen físico parcial	X	X	X	X	X	X	X	X
ECG								X
Signos vitales	X	X	X	X	X	X	X	X
Análítica								
Hemograma	X	X	X	X	X	X	X	X
Bioquímica	X	X	X	X	X	X	X	X
Análisis de orina								X
Prueba de embarazo en orina/suero (solo mujeres en edad fértil) ^c	X	X	X	X	X	X	X	X
CRP	X	X	X	X	X	X	X	X
RF de IgM	X							X
Biomarcadores (IL-6, TNF α , IL-1 beta, MMP-3)	X							X
Tipado de HLA	X							
Capacidad inmunógena	X							X
Anticuerpos contra CCP2								X
Administración	X	X	X	X	X	X	X	X

^a Todas las evaluaciones y resultados deben ser revisadas antes de contactar con el Centro de aleatorización central. Todas las evaluaciones deben realizarse antes de la administración.

^b Se realizará una evaluación de recuento 68/66.

^c Debería realizarse una prueba de embarazo negativa en las 48 horas anteriores a la visita.

B. Observación de doble ciego posterior al tratamiento

Día de visita (se permiten +/- 7 días para los meses 9, 15, 18, y 21; se permiten +/- 30 días para los meses 12 y 24)	Mes 9 (Día 253)	Mes 12 (Día 365) ^a	Mes 15 (Día 449)	Mes 18 (Día 533)	Mes 21 (Día 617)	Mes 24 (Día 729)	Term temprana
Evaluaciones de la eficacia							
Radiografías de manos y pies ^b		X				X	
RM de mano-muñeca con gadolinio (únicamente en emplazamientos europeos)		X				X	
Recuento de articulaciones con dolor por palpación ^c	X	X	X	X	X	X	X
Recuento de articulaciones hinchadas	X	X	X	X	X	X	X
Evaluación del dolor por el sujeto	X	X	X	X	X	X	X
Evaluación de la actividad de la enfermedad por el sujeto	X	X	X	X	X	X	X
Evaluación global por el doctor de la actividad de la enfermedad	X	X	X	X	X	X	X

ES 2 539 840 T3

Día de visita (se permiten +/- 7 días para los meses 9, 15, 18, y 21; se permiten +/- 30 días para los meses 12 y 24)	Mes 9 (Día 253)	Mes 12 (Día 365) ^a	Mes 15 (Día 449)	Mes 18 (Día 533)	Mes 21 (Día 617)	Mes 24 (Día 729)	Term temprana
Evaluación global por el sujeto de la función física (HAQ)	X	X	X	X	X	X	X
SF-36	X	X	X	X	X	X	X
Respuesta de los sujetos al tratamiento	X	X	X	X	X	X	X
Evaluaciones de la seguridad							
Control de los eventos adversos	X	X	X	X	X	X	X
Examen físico parcial	X	X	X	X	X	X	X
Examen físico completo							
Peso						X	X
Signos vitales	X	X	X	X	X	X	X
Analítica							
Hemograma	X	X	X	X	X	X	X
Bioquímica	X	X	X	X	X	X	X
Análisis de orina						X	X
Prueba de embarazo en orina/suero (solo mujeres en edad fértil)	X ^d	X	X	X	X	X	X
Detección de cáncer de mama							
Anual/periódica (sólo mujeres)		X				X	X
CRP	X	X	X	X	X	X	X
RF de IgM		X				X	
Biomarcadores (IL-6, TNF α , IL-1 beta, MMP-3)		X				X	
Capacidad inmunógena	X	X					
Anticuerpos contra CCP2		X				X	

^a Si el sujeto no se presenta en la clínica para la visita de los 12 meses, todas las evaluaciones necesarias para el mes 12 se realizarán en la siguiente visita clínica.
^b Si las radiografías se toman entre los meses 6 y 12 y el sujeto interrumpe el tratamiento, las radiografías deberían enviarse al lector central para evaluar la puntuación en el Sharp modificado por Genant.
^c Se realizará una evaluación de las articulaciones de recuento 68/66.
^d Debería realizarse una prueba de embarazo negativa en las 48 horas anteriores a la visita.

Evaluaciones de la seguridad

5 Todos los sujetos que reciban una dosis de fármaco del estudio serán evaluados en pruebas de seguridad y capacidad inmunógena. Los criterios de valoración de la seguridad incluyen eventos adversos, cambios clínicamente significativos de los signos vitales, y anomalías en las pruebas de laboratorio. El investigador determinará la gravedad de cada evento adverso como leve, moderada, grave, o muy grave. Los hallazgos del laboratorio que el investigador sienta que son clínicamente relevantes basándose en las Directrices del laboratorio deberían registrarse como eventos adversos. Además, el investigador determinará la relación entre el evento adverso y la administración del fármaco del estudio.

10 Los exámenes físicos completo y/o parcial pueden ser realizados por un médico (MD), osteópata (DO), auxiliar (PA), o enfermero (NP). Aunque el examen físico puede no ser tan exhaustivo como el examen completo inicial, los aspectos clave del examen parcial deberían evaluar sistemas corporales importantes según venga indicado clínicamente. Estos sistemas corporales pueden incluir nódulos linfáticos, hígado, bazo y mama, según el criterio del examinador. Un examen físico parcial puede registrar cualesquiera cambios en el estado del sujeto (sistemas corporales) desde el último examen y no excluye el examen de ninguno de los sistemas corporales según esté clínicamente indicado.

15 Es necesaria una radiografía de tórax en la visita de selección si no se ha realizado ya en los seis meses anteriores a la obtención del Consentimiento informado escrito o si la documentación no está en el expediente.

20 Es necesario un electrocardiograma (ECG) de 12 derivaciones en la visita de selección si no se ha realizado ya en los seis meses anteriores a la obtención del Consentimiento informado escrito o si la documentación no está en el expediente. El ECG se repetirá al final del periodo de tratamiento (Día 169) o 28 días después de la interrupción si el sujeto interrumpe el periodo de tratamiento pronto.

25 Para identificar a los sujetos con tuberculosis (TB) latente, es necesario realizar una prueba de PPD (prueba cutánea de derivado de proteína tuberculina purificada) si no se ha realizado ya en los seis meses anteriores a la obtención del Consentimiento informado escrito o si la documentación no está en el expediente. Todos los sujetos que incluyen los que han sido vacunados anteriormente contra BCG deberían ser evaluados para determinar la TB latente.

La prueba cutánea de PPD debería realizarse de acuerdo con pautas publicadas que proporcionan recomendaciones para las pruebas de PPD y su interpretación en sujetos con artritis reumatoide que están siendo considerados para su tratamiento con agentes biológicos ("Preliminary guidelines for diagnosing and treating tuberculosis in subjects with rheumatoid arthritis in immunosuppressive trials or being treated with biological agents", *Ann. Rheum. Dis.*, 61(Sup.): ii62-ii63 (2002) y en los emplazamientos de fuera de los EE. UU., pueden ser aplicables también las pautas locales avaladas por sociedades médicas sobre las pruebas de PPD en sujetos con AR que están siendo tratados con agente biológicos), en sujetos inmunodeprimidos ("Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161:5221-5247 (2000) y "Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161:1376-1395 (2000)) y sujetos con historia anterior de vacunaciones contra BCG.

Los sujetos con una PPD positiva en la selección no podrán ser admitidos durante el estudio a no ser que se haya descartado una infección activa por TB, y presenten una placa torácica negativa en el momento de la admisión. Una respuesta de PPD que sea igual o superior a 10 mm debería considerarse que es una prueba positiva, aunque puede aplicarse un umbral menor (5 mm) según venga determinado por la circunstancia clínica y por el investigador de acuerdo con directrices publicadas y/o estándares locales avalados por la sociedad médica.

Antes de ser admitidos en este estudio, es necesario que las mujeres se sometan a una prueba de detección de cáncer de mama apropiada para la edad y/o factores de riesgo. La detección del cáncer de mama debería realizarse de acuerdo con pautas publicadas y/o estándares locales avalados por el Instituto nacional del cáncer o Sociedad médica y/o Ministerio de sanidad. Además, las pautas de detección del cáncer de mama utilizadas por el emplazamiento de investigación deberían estar disponibles en el IRB/Comité ético local y explicarse en el Consentimiento informado del sujeto.

La detección de cáncer de mama documentada realizada en los 6 meses anteriores a la selección se aceptará como que cumple este requisito. Sin embargo, será necesaria la detección si la documentación del centro de detección no está en el expediente o si el examen de detección se realizó más de 6 meses antes de la admisión en el estudio.

Basándose en los criterios de aceptación al estudio para la detección del cáncer de mama, es necesario que las mujeres se realicen una detección de cáncer de mama anual o periódica.

Deberían realizarse radiografías normales de manos/muñecas y pies en la selección para los sujetos admisibles. Las radiografías realizadas en los sujetos admisibles (después de confirmación de una prueba positiva contra CCP2) se enviarán a un lector central para su evaluación para determinar la presencia o ausencia de erosiones. La información sobre las erosiones se usará para la estratificación en el estudio. También se realizarán radiografías normales de manos/muñecas y pies a los 6, 12, y 24 meses y serán evaluadas por un lector central para determinar la puntuación en el Sharp modificado por Genant. Si las radiografías se realizan entre los meses 6 y 12 y el sujeto abandona, las radiografías deberían enviarse al lector central para su evaluación.

Debería realizarse una RM con contraste de gadolinio de la mano/muñeca (sólo de un lado del cuerpo) antes de la asignación aleatoria de todos los sujetos únicamente en emplazamientos europeos que presenten una prueba positiva contra CCP2 y sinovitis clínica sintomática de dos o más articulaciones de la mano o muñeca. La RM será evaluada por un lector central. También se realizará una RM de seguimiento de la misma mano/muñeca a los 6, 12, y 24 meses y será evaluada por un lector central. No se realizarán RM de los pies.

Se realizarán pruebas de embarazo en orina o suero en las 48 horas anteriores a cada visita para todas las mujeres en edad fértil. Si cualquier mujer se queda embarazada, inmediatamente abandonará el estudio.

RM con contraste de gadolinio de mano y muñeca

Se realizará una RM con contraste de gadolinio de la mano/muñeca (sólo de un lado del cuerpo) antes de la asignación aleatoria de todos los sujetos únicamente en emplazamientos europeos que presenten una prueba positiva contra CCP2 y sinovitis clínica sintomática de dos o más articulaciones de la mano o muñeca en las dos semanas anteriores a la primera dosis de la medicación del estudio (Día -14 a Día -1) usando un aparato 1.5 Tesla y repetirse a los 6, 12 y 24 meses. Los datos de la RM serán interpretados por radiólogos de un centro central de acuerdo con el procedimiento OMERACT 6 de la siguiente manera:

Puntuación de Erosión/Edema de la muñeca y mano

Las erosiones y el edema de la médula ósea se puntuarán por separado de acuerdo con el esquema de puntuación OMERACT 6. Cada hueso de la muñeca y mano (huesos carpianos, radio distal, cúbito distal, bases metacarpianas y los huesos que comprenden las articulaciones MCP) se puntúa por separado en una escala de 0-10, según se determina por la proporción de hueso erosionado y volumen de edema (puntuados por separado) en proporción al volumen óseo evaluado. La escala de puntuación se determina en incrementos del 10 % donde una puntuación de 10 representa >90 % de afectación del hueso evaluado para determinar erosiones o edema.

Puntuación de sinovitis de la muñeca y mano

5 La sinovitis se evalúa en múltiples regiones de la muñeca (la articulación radiocubital distal, la articulación radiocarpiana, las articulaciones intercarpianas y carpometacarpianas así como las articulaciones MCP 2^a-5^a) en una escala de 0-3. Una puntuación de 3 representa un grado grave donde el tejido con contraste de gadolinio comprende >2/3 del compartimiento sinovial evaluado.

10 Todas las imágenes de RM para todos los sujetos con imágenes disponibles tanto al inicio como a los 12 meses serán leídas por un lector central entrenado ciego a la asignación de los tratamientos y a la secuencia.

Tipado de HLA

15 Se extraerá sangre de todos los sujetos a ser asignados aleatoriamente para determinar el tipado de HLA el Día 1 para determinar la presencia o ausencia de los alelos que están asociados a la susceptibilidad/gravedad de AR (los alelos de "epítomos compartidos" HLA-DR0401 y 0404). Los sujetos aleatorizados se incluirán en las categorías de negativo, heterocigoto, homocigoto o doblemente heterocigótico para estos alelos. Esta información caracterizará adicionalmente el riesgo del sujeto del estudio de desarrollar AR grave.

Evaluaciones de las pruebas de laboratorio

20 Se obtendrán muestras de sangre y/u orina antes de la infusión todas las visitas de cada sujeto admitido en este estudio. Cualesquiera resultados en las pruebas de laboratorio que el investigador considere clínicamente relevantes debería registrarse en la página apropiada de eventos adversos del CRF.

25 A. Hematología

Hemoglobina, hematocrito, recuento de glóbulos blancos, que incluye recuento de plaquetas diferencial y recuento de glóbulos rojos.

30 B. Química sanguínea

35 Sodio, Creatinina, Potasio, Nitrógeno ureico en sangre (BUN), Cloruro, Bilirrubina total, Proteína total, Alanin aminotransferasa (ALT), Albúmina, Aspartato aminotransferasa (AST), Calcio, Gamma-glutamilttransferasa (GGT), Fósfor, Fosfatasa alcalina, Ácido úrico, Glucosa

C. Análisis de orina

40 pH, Proteína, Glucosa, Sangre, Examen microscópico del sedimento de la orina en sangre si es positiva sangre, proteína o glucosa en la tira reactiva.

D. Detección de hepatitis

45 (realizada sólo en la visita de selección), antígeno superficial de la hepatitis B (si es positiva, anticuerpo nuclear) anticuerpo contra la hepatitis C (si es positiva, RIBA o PCR)

E. Pruebas de embarazo:

50 Deben realizarse pruebas de embarazo en orina o en suero (sensibilidad mínima de 25 UI/l de HCG) para todas las mujeres en edad fértil en las 48 anteriores a cada visita hasta la visita del Mes 9. Si cualquier mujer se queda embarazada, abandonará el estudio. Las pruebas de embarazo se procesarán de forma local.

F. Pruebas farmacodinámicas (PD)

55 IgM, Proteína reactiva C (CRP) Citocinas inflamatorias (IL-6, TNF α , IL-1 beta) Metaloproteinasa de matriz 3 (MMP-3) anticuerpos contra CCP2

G. Determinación de la capacidad inmunógena

60 Anticuerpo contra CTLA4Ig

H. Otros

Antígenos leucocitarios humanos (HLA)

65 Además, el investigador obtendrá muestras para pruebas de laboratorio adicionales si se considera necesario para controlar la seguridad del sujeto.

Capacidad inmunógena

5 El potencial inmunógeno de CTLA4Ig se evaluará basándose en los niveles de anticuerpos contra CTLA4Ig. Se obtendrán muestras de suero de los sujetos que completen la fase de tratamiento con el fármaco en los días de visita 1, 169, 253 y el Día 365 que serán analizadas para determinar la presencia de anticuerpos contra CTLA4Ig.

10 Se obtendrá una muestra de suero de los sujetos que no completen la fase del estudio de tratamiento con el fármaco del estudio el Día 1 y los Días 28, 56 y 85 después de la última dosis de la medicación del estudio. Las muestras se analizarán para determinar la presencia de anticuerpos contra CTLA4Ig.

15 Se usarán procedimientos sensibles y validados de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para medir las valoraciones tanto de anticuerpos contra CTLA4Ig en suero como contra CCP-2 en suero.

15 Evaluaciones de la eficacia

A. Radiografías de manos y pies

20 Se realizarán radiografías de manos y pies de todos los sujetos con una prueba positiva contra CCP2 en la selección, el Día 169, el Mes 12, y el Mes 24. Todos los centros tendrán que cumplir los requisitos técnicos. La radiografía de manos y pies será estándar para asegurarse una calidad de imagen suficiente para la evaluación de la progresión radiográfica de la artritis reumatoide. Las instalaciones y el personal estarán cualificados para la participación en el ensayo basándose en las capacidades técnicas del equipo y de la experiencia y formación autorizada de los técnicos radiólogos. La técnica radiográfica se armonizará mediante el uso de un manual de procedimiento radiográfico escrito y formación de los técnicos radiólogos. Además el sistema de cribado de las imágenes se estandarizará para asegurar una resolución suficiente para la evaluación de erosiones y estrechamiento del espacio interarticular. Las radiografías obtenidas durante el ensayo se enviarán a una instalación de lectura central para el control de la calidad y evaluación central (de forma ciega) por un radiólogo entrenado y con experiencia en la puntuación de artritis reumatoide por el esquema de puntuación Sharp modificado por Genant. Se asignará un lector primario y un lector de refuerzo. Los lectores serán declarados aptos para el estudio mediante la evaluación de un conjunto de casos de prueba y la evaluación del acuerdo entre los lectores. Los lectores serán ciegos al orden de los tiempos.

35 B. RM con contraste de gadolinio de mano y muñeca

40 Se realizará una RM con contraste de gadolinio de la mano-muñeca en todos los sujetos aleatorizado con una prueba positiva contra CCP2 que tengan sinovitis clínica sintomática de las manos en la selección, el Día 169, el Mes 12, y el Mes 24. La mano-muñeca del sujeto con más sinovitis según la evaluación clínica debería seleccionarse inicialmente y utilizarse para todas las evaluaciones posteriores. La RM inicial (y todos los estudios de RM posteriores) no deberían realizarse si la mano y/o la muñeca son asintomáticas o si no existe sinovitis según la evaluación clínica.

45 El examen de la RM será estándar para asegurarse una calidad de imagen suficiente para la evaluación de la progresión radiográfica de la artritis reumatoide. Las instalaciones y el personal estarán cualificados para la participación en el ensayo basándose en las capacidades técnicas del equipo y de la experiencia y formación autorizada de los técnicos. La técnica radiográfica se armonizará mediante el uso de un manual de procedimiento radiográfico escrito y formación de los técnicos. Los datos de RM recogidos durante el ensayo se enviarán a una instalación de lectura central para el control de la calidad y evaluación central. Las evaluaciones de la eficacia serán realizadas sólo por el lector central.

50 C. Evaluaciones del recuento de articulaciones

55 Las medidas de la respuesta serán revisadas y se analizarán con el personal de la investigación en un Meeting de investigadores u otro foro como procedimiento de estandarizar la puntuación entre el personal investigador. El entrenamiento y la formación de la evaluación del recuento de las articulaciones se analizará en el Meeting de los investigadores o en talleres.

60 Las evaluaciones del recuento de las articulaciones pueden ser realizadas por el siguiente personal: MD, DO, PA, NP o RN. De forma ideal, el recuento de las articulaciones debería realizarse antes de que se realice cualquier otra evaluación o procedimiento.

65 Deben realizarse todos los esfuerzos para asegurarse de que el mismo evaluador(es) completará la evaluación para cada sujeto. Las visitas deberían programarse tomando en cuenta la disponibilidad del evaluador(es). Si el evaluador(es) no puede completar la evaluación, entonces una persona cualificada, con experiencia similar puede realizar la evaluación. La documentación de quién realizó la evaluación debe registrarse en las notas fuente.

D. Evaluaciones clínicas

5 Las evaluaciones de respuesta clínicas deberían ser realizadas por el mismo asesor(s) y aproximadamente en el mismo momento del día durante toda la duración del estudio. El asesor(es) clínico debería ser una persona diferente de la que administra la infusión con la medicación del estudio.

Los asesores clínicos completarán las evaluaciones globales y las páginas del recuento de las articulaciones de los CRF de su puño y letra. Estas páginas serán los documentos fuente para el estudio.

10 Los sujetos completarán las páginas HAQ y SF-36 del CRF de su puño y letra. Estas páginas serán los documentos fuente para este estudio.

Se usará la CRP obtenida del laboratorio central para calcular el DAS completo.

15 E. Evaluaciones farmacodinámicas

Los datos farmacodinámicos recogidos en este estudio incluirán los valores de los análisis de laboratorio constituidos por variables continuas. Se recogerán los biomarcadores para la inmunomodulación o la inflamación en la artritis reumatoide, que incluyen IgM RF, CRP, y anticuerpos contra CCP2.

20 La CRP se recogerá en cada visita durante la fase de tratamiento de doble ciego con el fármaco del estudio, la fase de observación de doble ciego postratamiento, así como la Terminación temprana en ambas fases.

25 El factor reumatoide (IgM RF) y los biomarcadores se recogerán el Día -21, Día 1, Día 169, y los Meses 12 y 24. Los anticuerpos contra CCP2 se recogerán en la selección, el Día 169, el Mes 12, y el Mes 24.

Además, una porción del suero recogido en cada visita se almacenará y se analizarán los siguientes biomarcadores: citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF α , y IL-1 beta) y la metaloproteinasa de matriz 3 (MMP-3).

30 Evaluaciones de la investigación de los criterios de valoración

A. Función física

35 La función física se evaluará usando la sección de discapacidad del Cuestionario de evaluación de la salud (HAQ) completo (Fries, J.F. y cols., "Measurement of Subject Outcome in Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 23:137-145 (1980)). Esta sección incluye 20 cuestiones para evaluar las funciones físicas en 8 dominios: vestirse, levantarse, comer, caminar, higiene, alcanzar, coger y actividades habituales. Las cuestiones se evalúan en una escala de 4 puntos: 0 = sin ninguna dificultad, 1 = con alguna dificultad, 2 = con mucha dificultad, y 3 = incapaz de hacerlo. Las puntuaciones más altas indican una disfunción mayor. Se calculará un Índice de discapacidad sumando las puntuaciones peores de cada dominio y dividiendo entre el número de dominios contestados.

B. Calidad de vida relacionada con la salud

45 Se usará el SF-36 para medir la calidad de vida relacionada con la salud (Birrell, F.N. y cols., "How does the Short Form 36 Health Questionnaire (SF-36) in Rheumatoid Arthritis (AR) Relate to AR Outcome Measures and SF-36 Population Values? A Cross-Sectional Study", *Clin. Rheumatol.*, 19:195-199 (2000); Keller, S.D. y cols., "The SF-36 Arthritis-Specific Health Index (ASHI): II. Tests of validity in four clinical trials", *Med. Care*, 37(5 Supl.):MS51-60 (Mayo de 1999); Ware, J.E. y cols., "The SF-36 Arthritis-Specific Health Index (ASHI): I. Development and cross-validation of scoring algorithms", *Med. Care*, 37(5 Sppl.):MS40-50 (Mayo de 1999); y Kosinski, M. y cols., "The SF-36 Health Survey as a generic outcome measure in clinical trials of subjects with osteoarthritis and rheumatoid arthritis: relative validity of scales in relation to clinical measures of arthritis severity", *Med. Care*, 37(5 Supl.):MS23-39 (mayo de 1999)). Se calcularán las puntuaciones subescala individuales y dos puntuaciones resumen: (1) resumen del componente físico (PCS) que incluye función física, rol físico, dolor corporal, estado de salud general; (2) resumen del componente mental (MCS) que incluye vitalidad, función social, rol emocional, y salud mental. El SF-36 fue recomendado por la FDA como instrumento validado para medir la calidad de vida relacionada con la salud en sujetos con AR (*Guidance for Industry, Clinical Development Programs for Drugs, Devices, and Biological Products for the Treatment of Rheumatoid Arthritis (AR)*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Evaluation and Research (Feb. de 1999)).

60 Información sobre el producto farmacéutico

Un farmacéutico o personal cualificado del emplazamiento, no asociado de otro modo al desarrollo del estudio, reconstituirá el fármaco para la administración intravenosa (IV).

65 Toda la reconstitución y las diluciones deben realizarse usando jeringuillas de polipropileno sin silicona (Norm-Ject fabricada por Henke Sass Wolf en Alemania).

OBSERVACIÓN: DEBE usarse una aguja y jeringuilla diferente para cada vial reconstituido.

5 Los viales están sellados a vacío. Si cualquier vial se encuentra sin vacío, deberían separarse y no usarse. Estos viales deben guardarse hasta su recogida por el Control del fármaco del estudio.

10 OBSERVACIÓN: NO debería dejarse entrar aire en el vial antes de su reconstitución. Para evitar la formación de espuma tras la adición de SWFI, el vial debería agitarse suavemente hasta que el contenido se disuelva completamente. Cuando se haya disuelto completamente, el liofilizado en polvo, debería dejarse entrar aire en el vial con una aguja para disipar la espuma que pueda haber.

15 Cada vial de producto farmacéutico con CTLA4Ig inyectable, 250 mg/vial, debería reconstituirse con 10 ml de SWFI (sin agente bacteriostático) proporcionando una concentración de 25 mg/ml. Para minimizar la formación de espuma, el caudal de SWFI debería dirigirse a los laterales del vial.

20 Se incorpora un exceso suficiente de producto farmacéutico con CTLA4Ig a cada vial para compensar las pérdidas por extracción de forma que puedan extraerse 10 ml de la solución reconstituida que contengan 250 mg para la administración parenteral. Después de la reconstitución del producto, la solución debe diluirse más con D5W o cloruro sódico al 0,9 % (NS = solución salina "Normal").

25 La solución de infusión continua debe filtrarse tras la administración usando un filtro en línea, estéril, apirógeno, de baja unión a proteínas con un tamaño de poro de 1,2 µm. Esta infusión debería administrarse durante un periodo de aproximadamente 30 minutos. Ninguna parte no usada de la solución de infusión debería almacenarse para su reutilización.

30 No existen datos sobre la compatibilidad del producto farmacéutico de CTLA4Ig con otras sustancias intravenosas. El producto farmacéutico con CTLA4Ig debería administrarse con una vía intravenosa distinta cuando sea posible y no mezclarse con otras medicaciones. Asegurar un enjuague adecuado y apropiado entre cualquier otra sustancia farmacéutica si van a administrarse otros fármacos a través de la misma vía de forma secuencial.

35 No se han observado incompatibilidades con los frascos de cristal ni con las bolsas de cloruro de polivinilo ni con los kits de administración.

40 Debe tenerse cuidado de asegurar la esterilidad de la solución preparada, ya que el producto farmacéutico NO contiene ningún conservante antimicrobiano ni agentes bacteriostáticos.

45 Los viales de producto farmacéutico con CTLA4Ig inyectable, 250 mg/vial, deberían almacenarse refrigerados (2-8 °C) y protegerse de la exposición a la luz por periodos prolongados. Los viales intactos son estables durante al menos uno año en estas condiciones. Todas las diluciones de producto farmacéutico con CTLA4Ig inyectable deben usarse en 12 horas después de la reconstitución del vial original.

50 Las pautas de estabilidad específica para cada dilución son las siguientes:

55 El producto farmacéutico con CTLA4Ig inyectable reconstituido, 25 mg/ml, puede almacenarse a temperaturas de 15-25 °C y con luz ambiental o refrigerado (2-8 °C) durante hasta 6 horas en el vial original.

60 Las diluciones de producto farmacéutico con CTLA4Ig inyectable reconstituido, 10 mg/ml en NS en bolsas IV de cloruro de polivinilo (PVC) o bolsas que no sean de PVC pueden almacenarse a temperaturas de 15-25 °C y a luz ambiental o con refrigeración (2-8 °C) durante no más de 12 horas desde el momento de la reconstitución inicial.

65 Las soluciones de producto farmacéutico con CTLA4Ig inyectable diluidas son compatibles con los kits de infusión IV estándar de PVC.

Resultados

Se realizó un análisis parcial después de que todos los sujetos aleatorizados completaron la visita del Mes 12 o abandonaron de forma prematura para determinar el criterio de valoración de eficacia primaria de desarrollo de AR. Se pudo evaluar a 51/56 pacientes aleatorizados (edad media: 45 años; duración de síntomas media: 7 meses [intervalo 1–18 meses]; nivel medio de CRP: 1,1 mg/dl); 80 % presentaban oligoartritis, 50 % presentaban erosiones. Después de 1 año, 12/27 (44 %) de los pacientes tratados con CTLA4Ig desarrollaron AR contra 16/24 (67 %) de los pacientes tratados con placebo (23 % de diferencia; intervalo de confianza al 95 % –6 a +48). El tiempo hasta el abandono debido al desarrollo de AR se muestra en la Figura 2.

Conclusión

65 El CTLA4Ig retarda la progresión a AR definitiva en los pacientes con AI. Los efectos modificadores de la enfermedad del tratamiento con CTLA4Ig se mantuvieron durante 6 meses después de interrumpir el tratamiento.

EJEMPLO IV

5 Los datos de 2 años para el estudio que se describe en el Ejemplo III se presentan más adelante. Los datos incluyen datos de eficacia, seguridad, y actividad de los marcadores farmacodinámicos (PD) para adultos con AI que recibieron hasta 6 meses de tratamiento con CTLA4lg o placebo de doble ciego. Los sujetos con AI persistente después de 6 meses tratamiento en el estudio de doble ciego, pero que no cumplían los criterios de AR, se controlaron sin medicación del estudio durante el desarrollo posterior de AR durante hasta otros 18 meses más.

10 Población del Estudio

15 Se cribó a un total de 184 sujetos, de los cuales se admitió a 57 y se aleatorizaron en una proporción de 1:1 a tratamiento con CTLA4lg (N = 29) o placebo (N = 28) con doble ciego. El no cumplimiento de los criterios de aptitud para participar en el estudio era la razón más frecuente por la que los sujetos fueron cribados pero no aleatorizados.

20 Todos menos 1 de los sujetos aleatorizados recibieron al menos 1 dosis de la medicación del estudio. Un sujeto asignado al grupo con CTLA4lg, fue excluido debido a la presencia de erosiones detectadas después de la aleatorización pero antes de la administración del fármaco del estudio. Así, se aleatorizó un total de 56 sujetos, 28 en cada grupo de tratamiento, y recibieron al menos 1 dosis de fármaco del estudio.

25 Entre los sujetos que fueron asignados aleatoriamente al tratamiento, 39 (22 con CTLA4lg, 17 con placebo) completaron el Periodo de tratamiento de 6 meses con el fármaco del estudio y pasaron al Periodo de observación de 18 meses. De estos, 28 abandonaron de forma prematura antes de completar el Periodo de observación (15 del grupo con CTLA4lg, 13 en el grupo con placebo). Dieciséis (16) de estos 28 sujetos (8 en cada grupo de tratamiento) abandonaron antes del Mes 12. Un total de 7 (25,0 %) sujetos del grupo con CTLA4lg y 4 sujetos (14,3 %) del grupo con placebo completaron el estudio de 24 meses.

30 La falta de eficacia fue la razón más frecuente de la interrupción prematura durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio, donde más de dos veces el número de sujetos del grupo con placebo (n=8, 28,5 %) abandonaron por esta razón comparado con el grupo con CTLA4lg (n=3, 10,7 %). La falta de eficacia fue también la razón más habitual para abandonar el Periodo de observación. Durante este periodo de 18 meses la proporción de sujetos que entraron en el Periodo de observación que fueron excluidos por esta razón de nuevo fue mayor para el grupo con placebo (12/17, 70,6 %) que para el grupo con CTLA4lg (11/22, 50,0 %). Entre los 23 sujetos que fueron excluidos debido a la falta de eficacia durante el Periodo de observación, 14 (7 CTLA4lg, 7 placebo) abandonaron antes de mes 12.

35 Los eventos adversos llevaron a la interrupción prematura de 1 sujeto del grupo con CTLA4lg durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio y 1 sujeto en el grupo con placebo durante el Periodo de observación.

40 Los grupos con CTLA4lg y placebo estaban equilibrados con respecto a características demográficas de edad, peso, distribución de sexo, y distribución racial. La edad media de los 56 sujetos aleatorizado y tratados era de 44,8 años (intervalo: 23 a 74 años). La mayoría de los sujetos eran blancos (85,7 %) y mujeres (71,4 %). Aunque la mayoría de los sujetos de ambos grupos de tratamiento se admitieron en emplazamientos en Europa (el 60,7 % para el grupo con CTLA4lg, 75,0 % para el grupo con placebo), un mayor porcentaje de sujetos del grupo con CTLA4lg se admitió en emplazamientos de Suramérica (17,9 % contra 7,1 % para el grupo con placebo).

45 Los grupos con CTLA4lg y placebo generalmente estaban equilibrados con respecto a las características de enfermedad inicial. Todos menos 5 sujetos presentaban enfermedad que afectaba al menos a 2 articulaciones; 2 sujetos de cada grupo de tratamiento presentaban enfermedad que afectaba sólo 1 articulación, y un sujeto del grupo con CTLA4lg no presentaba sinovitis en la selección o inicial (Día 1). Este último sujeto fue admitido porque cumplía 3 criterios de diagnóstico para AR (criterios de la ARA de 1987), pero se excluyó del análisis de la eficacia primario debido a esta relevante desviación del protocolo. El grupo de los sujetos cumplía entre 1 y 3 criterios de diagnóstico para AR, y la mayoría de los sujetos (58,9 %) cumplía 3 criterios. Entre todos los sujetos, la duración media de la artritis inflamatoria (IA) fue de 7,9 meses y fue algo mayor en el grupo con CTLA4lg (8,8 meses) que en el grupo con placebo (7,1 meses). El nivel de CRP medio fue similar en los grupos con CTLA4lg y placebo (11,2 mg/l y 10,7 mg/l, respectivamente), al igual que el porcentaje de sujetos con indicios radiográficos de erosiones al inicio (53,5 % y 57,1 %, respectivamente).

60 Los hallazgos de la historia médica general eran coherentes con la enfermedad inflamatoria activa y generalmente eran similares para los 2 grupos. La mayoría de los sujetos (>75 %) en ambos grupos de tratamiento estaban recibiendo una medicación antirreumática el Día 1 (78,6 % en CTLA4lg, 89,3 % en placebo), siendo los AINE la medicación antirreumática más habitual empleada.

65 Catorce (14) sujetos, que incluían 9 asignados al grupo con CTLA4lg y 5 asignados al grupo con placebo, estaban recibiendo un fármaco corticosteroide oral o inyectable el Día 1. Para 4 sujetos (14,3 %) asignados al grupo con CTLA4lg y 2 sujetos (7,1 %) asignado al grupo con placebo, el tratamiento concomitante el Día 1 consistía en una

dosis oral baja de corticosteroide (≤ 10 mg/día de equivalente de prednisona).

Extensión de la exposición

5 A pesar de la mayor tasa de interrupción prematura en el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio en el grupo con placebo, la mayoría de los sujetos de los grupos con CTLA4Ig y placebo (89,3 % y 75,0 %, respectivamente) recibieron 6 meses de tratamiento y recibieron las 8 infusiones de fármaco del estudio programadas (75,0 % y 71,4 %, respectivamente). Un (1) sujeto del grupo con CTLA4Ig (3,6 %) y 5 sujetos del grupo con placebo (17,9 %) recibieron 3 o menos infusiones de fármaco del estudio. Ningún sujeto recibió más de 8
10 infusiones de fármaco del estudio o recibió más de 6 meses de tratamiento del estudio.

La mayoría de los sujetos de la población de análisis de todos los tratados no faltó a ninguna de las infusiones infusión de CTLA4Ig (85,7 %) o placebo (92,9 %) programadas durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio, y ningún sujeto de ninguno de los dos grupos de tratamiento faltó a más de 1 infusión programada.
15

El uso de corticosteroides a dosis bajas durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio fue bajo y similar para los grupos con CTLA4Ig y placebo en el análisis de la población de ITT, tanto en términos de porcentaje de sujetos que usaban estos fármacos ($n=5$, 17,9 % en cada grupo) como en la dosis media de corticosteroide en estos tiempos. Lo mismo era aplicable durante el Periodo de observación, donde 5 de los 22 sujetos que entraron en este periodo del grupo con CTLA4Ig, y 7 de los 17 sujetos del grupo con placebo, tenían tratamiento con corticosteroides a dosis bajas.
20

El número de ciclos de uso de corticosteroide a dosis altas durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio para la población de análisis de Intención de tratar (ITT) también fue similar para los 2 grupos: 3 ciclos del grupo con CTLA4Ig (en 2 sujetos) y 4 ciclos del grupo con placebo (en 4 sujetos). El uso de corticosteroides a dosis altas durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio consistía en corticosteroides intramusculares (IM) o intraarticulares (IA); ningún sujeto de ninguno de los dos grupos recibió dosis de corticosteroide oral de ≥ 10 mg/día durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio.
25

30 Durante el Periodo de observación de 18 meses el número de ciclos de corticosteroides a dosis baja era de 9 del grupo con CTLA4Ig y 6 en el grupo con placebo. Para 2 sujetos de cada grupo de tratamiento, los corticosteroides de dosis altas consistían en una dosis oral de ≥ 10 mg/día. Ningún sujeto de ninguno de los dos grupos de tratamiento recibió más de 2 ciclos de corticosteroides de dosis alta durante los periodos del tratamiento con el fármaco del estudio ni durante el Periodo de observación.
35

Todos los sujetos del grupo con CTLA4Ig y la mayoría de sujetos (96,4 %) del grupo con placebo recibieron al menos 1 medicación concomitante durante el Periodo de observación con el fármaco del estudio. Los analgésicos, acetaminofeno y diclofenaco, fueron las medicaciones concomitantes que se usaron más frecuentemente, que cada una la tomaban 7 (25,0 %) sujetos del grupo con CTLA4Ig y 9 (32,1 %) sujetos del grupo con placebo.
40

Resultados de la eficacia

Los resultados de este estudio muestran que 6 meses de tratamiento con CTLA4Ig retrasa la progresión a AR definitiva en sujetos con AI. Para el Mes 12, 12 de 26 sujetos (46,2 %) con AI del grupo con CTLA4Ig desarrollaron AR comparado con 16 de 24 sujetos (66,7 %) con AI del grupo con placebo. El IC a 95 % que rodea la diferencia del 20,5 % del grupo de tratamiento en favor de CTLA4Ig para el criterio de valoración de la eficacia primaria era de (-47,4, 7,8). La proporción de sujetos con AI que desarrollaron AR para el Mes 24 también fue menor en el grupo con CTLA4Ig (17/23, 73,9 %) comparado con el grupo con placebo (21/24, 87,5 %), aunque la magnitud de la diferencia entre tratamientos (-13,6 %; IC a 95 %: -37,6, 10,8) fue inferior a la observada en el Mes 12.
45
50

La eficacia de CTLA4Ig en retrasar la progresión a AR definitiva apareció más pronunciada en el subgrupo de sujetos que presentaban indicios radiográficos de erosiones al inicio comparado con el subgrupo sin erosiones iniciales.

55 La proporción de sujetos con AI que desarrollaron AR, de acuerdo con los criterios de la ARA de 1987, en el espacio de 1 año desde el inicio de la medicación del estudio, fue menor para el grupo con CTLA4Ig (12/26, 46,2 %) comparado con el grupo con placebo (16/24, 66,7 %) (-20,5 % de diferencia; IC a 95 %: -47,4, 7,8).

El análisis de la sensibilidad previamente especificado del criterio de valoración de la eficacia primaria que incluía cada uno de los 55 sujetos aleatorizados y tratados incluidos en la población ITT de análisis de la eficacia proporcionó resultados similares favorables a CTLA4Ig. En el análisis de la sensibilidad, la proporción de sujetos con AI que desarrollaron AR en el espacio de 1 año desde el inicio de la medicación del estudio fue de 42,9 % para el grupo con CTLA4Ig (12/28 sujetos) comparado con 59,3 % (16/27 sujetos) para el grupo con placebo (-16,4 % de diferencia entre grupos de tratamiento, IC a 95 %: -42,3, 11,0).
60
65

Menos sujetos con AI que se asignaron de forma aleatoria a 6 meses de tratamiento con CTLA4Ig (17/23, 73,9 %)

desarrollaron AR, definida usando los criterios de la ARA de 1987, para el Mes 24 comparado con los sujetos asignados al tratamiento con placebo (21/24, 87,5 %). La diferencia entre los grupos de tratamiento en el desarrollo de AR para el Mes 24 era de -13,6 % (IC a 95 %: -37,6, 10,8). Aunque el tratamiento del estudio no se administró después del mes 6, los sujetos e investigadores siguieron ciegos a la identidad del tratamiento del estudio que se había administrado hasta el final del Periodo de observación de 18 meses (Mes 24).

El estudio muestra una menor progresión estructural, basándose en las radiografías de pies y manos, del grupo con CTLA4Ig comparado con el grupo con placebo el mes 12, tal y como reflejan los menores cambios medios en las puntuaciones de erosión y JSN. Además, las imágenes de las RM con contraste de gadolinio de las muñecas y manos en un subconjunto de 21 sujetos indicó indicios mínimos de progresión de la enfermedad del grupo con CTLA4Ig al final del Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio, mientras que los cambios medios desde el nivel inicial para el Mes 6 en las puntuaciones de erosión, edema y sinovitis según la RM en el grupo con placebo eran indicativas del empeoramiento de la enfermedad. La diferencia en las puntuaciones de RM entre los grupos de tratamiento persistió durante 6 meses después de que hubiera el tratamiento del estudio.

La presencia de sinovitis era necesaria en el momento de la selección o el Día 1 para ser admitidos en el estudio. La proporción de sujetos con AI que tenía sinovitis clínica sintomática persistente en el Mes 6 era inferior entre los sujetos tratados con CTLA4Ig (4/5, 80 %) que con placebo (12/12, 100 %). La diferencia en la proporción de sujetos que tenían sinovitis clínica sintomática persistente entre los grupos del estudio era de -20,0 % (IC a 95 %: -71,5, 15,21). Para el mes 12, la proporción de sujetos con sinovitis clínica persistente era de 10 de 11 sujetos para el grupo con CTLA4Ig y 7 de 7 sujetos para el grupo con placebo.

Se hicieron evaluaciones por RM con contraste de gadolinio de las manos y muñecas en un total de 11 sujetos del grupo con CTLA4Ig y 10 del grupo con placebo; por el diseño del protocolo, las RM sólo se realizaron para los sujetos admitidos en los emplazamientos de investigación en Europa. Los cambios medios desde el nivel inicial en las puntuaciones de la erosión ósea y sinovitis por RM de las manos y muñecas al final del Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio (Mes 6) indicó una progresión mínima de la enfermedad del grupo con CTLA4Ig (cambios medios de 0,45 y 0,27, respectivamente), mientras que los cambios eran mayores e indicativos de empeoramiento de la enfermedad en el grupo con placebo (cambios medios de 1,20 y 1,60, respectivamente). Los cambios medios desde el nivel inicial en las puntuaciones de edema por RM para el Mes indicaron una mejora con CTLA4Ig (cambio medio de -1,64) pero empeorando con placebo (cambio medio de 1,40).

Se observó un patrón de resultados similar con respecto a las puntuaciones en la RM para el Mes 12, donde 9 y 6 sujetos de los grupos con CTLA4Ig y placebo, respectivamente, se hicieron una RM tanto al inicio como después de 1 año del estudio. Para el Mes 12, se observaron pocos cambios en las puntuaciones de erosión ósea, edema, y sinovitis relativas a los valores iniciales del grupo con CTLA4Ig (cambios medios de 0,0, 0,22, y 0,22, respectivamente), mientras que en el grupo con placebo era obvia la progresión de la enfermedad (cambios medios de 5,00, 6,67, y 2,33, respectivamente).

Sólo 7 sujetos (5 CTLA4Ig, 2 placebo) se hicieron evaluaciones por RM al inicio y el Mes 24. En este pequeño subgrupo de sujetos europeos que no habían progresado a AR y por lo tanto permanecían en este estudio, las puntuaciones medias de RM iniciales eran bajas (habitualmente <1,0), y mostraban pocos cambios para el Mes 24. Al final del Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio (mes 6), los sujetos con AI del grupo con CTLA4Ig presentaban reducciones en actividad de la enfermedad (puntuaciones en el DAS 28 [CRP]) y mejoras en la función física (puntuaciones en el HAQ-DI) y calidad de vida relacionada con la salud (puntuaciones de PCS y MCS de SF-36) relativa al inicio, mientras que las puntuaciones medias de estas variables de la eficacia permanecían sin cambios en el grupo con placebo. Las diferencias entre los grupos de tratamiento eran menores en los Meses 12 y 24 del Periodo de observación sin tratamiento.

Al final del Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio, la actividad de la enfermedad, evaluada usando la puntuación del DAS 28 (CRP), se redujo relativa al inicio del grupo con CTLA4Ig (cambio medio, -1,13) pero permaneció sin cambios en el grupo con placebo (cambio medio, 0,01). En el Mes 6, se observó una mejora clínicamente significativa (reducida al menos por un valor de 1,2 desde el nivel inicial en la puntuación del DAS 28) en 8 de los 20 sujetos (40 %) con puntuaciones iniciales y del Mes 6 del grupo con CTLA4Ig comparadas con 4 de los 20 sujetos (20 %) con puntuaciones iniciales y del Mes 6 del grupo con placebo. De forma coherente con estos hallazgos, se observaron tasas mayores de actividad de la enfermedad baja (puntuación en el DAS 28 de $\leq 3,2$) o remisión de la enfermedad (puntuación en el DAS 28 < 2,6) en el Mes 6 en el grupo con CTLA4Ig (81,0 % y 71,4 %, respectivamente) comparado con el grupo con placebo (45,0 % y 35,0 %, respectivamente).

Las evaluaciones de los datos del DAS 28 (CRP) en los Meses 12 y 24 continuaron mostrando mayores mejoras en la actividad de la enfermedad para el grupo con CTLA4Ig comparado con el grupo con placebo, pero las diferencias entre los grupos de tratamiento eran menores para el Periodo de observación sin tratamiento. Entre los 18 sujetos del grupo con CTLA4Ig con puntuaciones inicial y del Mes 12 en el DAS 28, la puntuación de cambio medio fue de -0,50 en el Mes 12 y aproximadamente dos tercios (68,4 %) de los sujetos presentaban una actividad de la enfermedad baja. Entre los 13 sujetos del grupo con placebo con datos en el DAS 28 en ambos tiempos, no se observaron virtuales cambios en la actividad de la enfermedad en el Mes 12 comparado con el inicial (cambio

medio, -0,05), y 53,9 % de los sujetos presentaban actividad de la enfermedad baja. De los 11 sujetos que tenían puntuaciones en el DAS 28 en el Mes 24, se observó remisión de la enfermedad en 4 de los 7 sujetos con CTLA4Ig y 2 de los 4 sujetos con placebo.

5 Durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio, fueron obvias mejoras superiores en la actividad de la enfermedad, tal y como reflejan los mayores cambios medios desde el nivel inicial y el porcentaje de sujetos con mejora, para el grupo con CTLA4Ig comparado con el grupo con placebo tan pronto como el Día 29.

10 La proporción de sujetos con una mejora clínicamente significativa en la función física (definida como una \geq reducción del 0,3 desde el nivel inicial en la puntuación de HAQ-DI) fue mayor para el grupo con CTLA4Ig que para el grupo con placebo los meses 6, 12, y 24. Al final del Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio, 61,5 % de los sujetos aleatorizados y tratados del grupo con CTLA4Ig comparado con 24,0 % de los del grupo con placebo presentaban una mejora clínicamente significativa en HAQ-DI (diferencia entre los grupos de tratamiento de 37,5 % [IC a 95 %: 9,9, 61,4]). La proporción de sujetos del grupo con CTLA4Ig que presentaban una mejora clínicamente significativa tras 6 y 12 meses de seguimiento sin tratamiento (36,0 % para el Mes 12 y 14,3 % para el Mes 24) fue menor que la observada después de 6 meses de tratamiento, pero sin embargo todavía era numéricamente superior que las proporciones con una mejora clínicamente significativa en el grupo con placebo los Meses 12 y 24 (12,0 % y 4,2 %, respectivamente).

20 Se observaron mejoras medias superiores desde el nivel inicial de las medidas del componente físico y mental en el SF-36 para el grupo con CTLA4Ig los Meses 6, 12, y 24 comparado con el grupo con placebo. La mejora media desde el nivel inicial al final del Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio (Mes 6) fue de 10,23 para la puntuación en el PCS y 2,54 para la puntuación en el MCS del grupo con CTLA4Ig. Los cambios medios en el resumen del componente físico (PCS) y en el resumen del componente mental (MCS) para el Mes 6 en el grupo con placebo fueron pequeños (1,95 y -0,30, respectivamente).

30 Entre los sujetos del grupo con CTLA4Ig que permanecían en el estudio durante el Periodo de observación sin tratamiento, las mejoras medias los Meses 12 y 24 fueron de 3,83 y 2,46, respectivamente, para la puntuación en el PCS y 2,50 y 3,75, respectivamente, para la puntuación en el MCS. En el grupo con placebo, las puntuaciones en PCS y MCS empeoraron durante los 18 meses de Periodo de observación sin tratamiento, tal y como refleja el cambio medio negativo desde valores de nivel inicial en los Meses 12 y 24 para estos criterios de valoración.

35 Las puntuaciones radiográficas iniciales indicaron una erosión ósea mínima o estrechamiento del espacio articular entre los sujetos aleatorizados, coherentes con los criterios de elegibilidad del estudio de que sujetos no tengan un diagnóstico de AR al entrar en el estudio. Durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio de 6 meses, se produjo poco cambio en la erosión radiográfica, JSN, o en las puntuaciones totales con respecto al inicio, tal y como refleja el cambio medio en las puntuaciones en el Mes 6 para los 3 criterios de valoración de $\leq 0,13$ en el CTLA4Ig y de $\leq 0,47$ en el grupo con placebo. Se sugirió una menor progresión estructural del grupo con CTLA4Ig comparado con el grupo con placebo en el Mes 12, donde el cambio medio en la puntuación total fue de 0,02 del grupo con CTLA4Ig y 1,11 del grupo con placebo.

45 Los resultados de erosión radiográfica imputada y el análisis de las puntuaciones en JSN mostraron menores cambios medios, indicativos de una menor progresión estructural, después de 6 y 12 meses desde el final del Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio (es decir, los Meses 12 y 24) del grupo con CTLA4Ig (cambio medio en las puntuaciones totales de 0,29 y 0,02) comparado con el grupo con placebo (1,21 y 2,13).

50 Los sujetos del grupo con CTLA4Ig mostraron mejoras porcentuales medias en los componentes individuales del ACR durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio. En el Mes 6, las mejoras porcentuales medias en las evaluaciones de articulaciones con dolor por palpación, articulaciones hinchadas, y dolor valorado por el sujeto fueron de 64,91 %, 57,34 %, y 70,03 %, respectivamente. Por comparación, los sujetos del grupo con placebo mostraron un empeoramiento en los componentes nucleares individuales del ACR durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio, con cambios porcentuales medios en las valoraciones articulaciones con dolor por palpación, articulaciones hinchadas, y dolor valorado por el sujeto de -63,3 %, -10,5 %, y -83,4 %, respectivamente.

55 Las mejoras porcentuales en los componentes nucleares del ACR observadas para el grupo con CTLA4Ig durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio no se mantuvieron una vez se terminó el tratamiento del estudio entre los sujetos que permanecieron en el estudio.

60 Los criterios de valoración de la eficacia primarios y secundarios relacionados, así como las características demográficas y de enfermedad inicial, se examinaron por separado para los subgrupos definidos basándose en la presencia o ausencia de erosiones en la entrada al estudio (es decir, estratos de aleatorización).

65 Las características demográficas fueron similares entre el subconjunto de 31 sujetos con indicios radiográficos de erosión al inicio y el subconjunto de 25 sujetos sin indicios radiográficos de erosión al inicio. Las características de la enfermedad inicial también fueron similares para estos 2 subgrupos, excepto que la puntuación de erosión radiográfica fue mayor para el subgrupo con erosiones iniciales que en el subgrupo sin erosiones iniciales.

Entre el subgrupo de sujetos con indicios radiográficos de erosión al inicio, la proporción de sujetos con AI que desarrollaron AR, de acuerdo con los criterios de la ARA de 1987, en el periodo de 1 año desde el inicio de la medicación del estudio, fue menor para el grupo con CTLA4Ig (4/13, 30,8 %) que para el grupo con placebo (9/14, 64,3 %). Entre el subgrupo de sujetos sin indicios radiográficos de erosiones al inicio, 61,5 % de los sujetos del grupo con CTLA4Ig (8/13) y 70,0 % de sujetos en el grupo con placebo (7/10) desarrollaron AR para el Mes 12.

La proporción de sujetos con AI que desarrollaron AR para el Mes 24 fue menor para el grupo con CTLA4Ig que para el grupo con placebo sólo entre los sujetos que presentaban indicios radiográficos de erosiones al inicio (50,0 % [6/12 sujetos] para CTLA4Ig; 85,7 % [12/14 sujetos] para placebo). Entre el subgrupo de sujetos que no presentaban indicios radiográficos de erosiones al inicio, el 100 % de sujetos del grupo con CTLA4Ig (11/11) y 90 % de sujetos del grupo con placebo (9/10) habían desarrollado AR para el Mes 24.

Seguridad

El CTLA4Ig, administrado IV una vez al mes con una dosis ajustada al peso de 10 mg/kg durante hasta 6 meses, generalmente se toleró bien en el tratamiento de adultos con AI. No se refirieron muertes durante el estudio. Durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio, 1 sujeto del grupo con CTLA4Ig refirió EAG (carcinoma de células basales) y 1 sujeto del grupo con placebo (ciática). Ambos EAG fueron evaluados por el investigador como no relacionados con el tratamiento del estudio. Un (1) sujeto en cada uno en los grupos con CTLA4Ig y placebo fue excluido del tratamiento durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio debido a un EA. 1 Sujeto de cada grupo de tratamiento refirió EA agudo debido a la infusión (referido en 1 hora desde el inicio de la infusión con fármaco del estudio); el EA agudo debido a la infusión del grupo con CTLA4Ig (disnea) se produjo durante la primera infusión y provocó la interrupción del tratamiento. Se refirieron infecciones o infestaciones durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio en un porcentaje similar de sujetos en los grupos con CTLA4Ig (35,7 %) y placebo (39,3 %). Ninguna de las infecciones referidas del grupo con CTLA4Ig fue de intensidad grave. Durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio, los EA fueron reseñados por un porcentaje de sujetos similar en los grupos con CTLA4Ig (64,3 %) y placebo (71,4 %). Todos los EA del grupo con CTLA4Ig fueron leves o moderados en intensidad. No se produjeron problemas de seguridad a partir de la evaluación del laboratorio o datos de los signos vitales.

En conjunto, los EA fueron referidos por 18 (64,3 %) sujetos tratados con CTLA4Ig y 20 (71,4 %) sujetos tratados con placebo durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio o en los 56 días posteriores a la última infusión de la medicación del estudio. Las frecuencias de los eventos adversos generalmente fueron similares para los grupos con CTLA4Ig y placebo. Los EA referidos más frecuentemente por clase de órgano sistémico (SOC) fueron infecciones y infestaciones (35,7 % en CTLA4Ig; 39,3 % en placebo), trastornos gastrointestinales (21,4 % en CTLA4Ig; 25,0 % en placebo), y respiratorios, torácicos y del mediastino (17,9 % en CTLA4Ig; 21,4 % en placebo). Los eventos adversos referidos por al menos el 10 % de los sujetos de alguno de los dos grupos de tratamiento durante el periodo de tratamiento del estudio fueron diarrea (14,3 % en CTLA4Ig; 10,7 % en placebo), cefalea (10,7 % en CTLA4Ig; 7,1 % en placebo), nasofaringitis (10,7 % en CTLA4Ig; 7,1 % en placebo), infección del tracto urinario (7,1 % en CTLA4Ig; 10,7 % en placebo), dolor faringolaríngeo (3,6 % en CTLA4Ig; 14,3 % en placebo), y gastroenteritis (0 % en CTLA4Ig; 10,7 % en placebo). No se reseñaron trastornos autoinmunitarios durante el periodo de tratamiento del estudio en ninguno de los dos grupos de tratamiento.

La proporción de sujetos del grupo con placebo con EA de intensidad grave fue de 10,7 % (único EA grave de ciática, infección vírica, edema faríngeo). Ningún sujeto del grupo con CTLA4Ig presentó un EA durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio que se considerara de intensidad grave o muy grave de acuerdo con el investigador.

La frecuencia de los EA relacionados fue 50 % (n=14) para el grupo con CTLA4Ig y 35,7 % (n=10) para el grupo con placebo durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio. El EA relacionado individual más habitual fue cefalea, referida por 3 sujetos (10,7 %) del grupo con CTLA4Ig y 2 sujetos (7,1 %) para el grupo con placebo. El eczema fue el otro único EA relacionado referido por >1 sujeto tratado con CTLA4Ig, y fue referido por 2 sujetos (7,1 %).

Los datos del laboratorio clínico fueron generalmente sin nada que reseñar, y no se identificaron problemas de seguridad en esta población con AI.

Durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio, la frecuencia de los parámetros de análisis hematológico y bioquímico de la sangre que cumplieron los criterios de anormalidad marcada (MA) definidos por el patrocinador fue pequeña y similar en los grupos con CTLA4Ig y placebo. Para cada parámetro del análisis hematológico y bioquímico de la sangre, se identificaron MA para 2 o menos sujetos de alguno de los dos grupo de tratamiento.

Se observaron cambios pequeños desde el nivel inicial (Día 1) en los parámetros del análisis hematológico y bioquímico de la sangre durante los periodos de tratamiento con el fármaco del estudio y observación, y estos

cambios mostraron una variación considerable y no se observó un patrón coherente en los 2 grupos.

Además, los niveles de neutrófilos en sangre, ALT, y AST permanecieron estables tras el tratamiento con CTLA4Ig durante todo el periodo del estudio. Ningún sujeto de ninguno de los dos grupo de tratamiento presentó un valor de ALT o AST que fuera $> 3x$ ULN (límite superior de la normalidad) en ninguno de los tiempos de medición, ni un valor de recuento de neutrófilos que fuera $< 0,5 \times 10^9$ células/l o $> 15 \times 10^9$ células/l.

Dos sujetos presentaron anomalías de laboratorio referidas como EA durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio. Se refirió un aumento en las enzimas hepáticas como EA en un sujeto del grupo con CTLA4Ig el Día 141, y persistió durante 120 días antes de resolverse. Ninguno de los valores enzimáticos de este sujeto cumplió los criterios de MA. Se refirió trombocitopenia como EA en un sujeto del grupo con placebo y provocó la interrupción del tratamiento del estudio. Los valores de recuento de plaquetas para este sujeto fueron de 284×10^9 c/l al inicio y se redujeron a un ritmo constante durante el estudio, y eran de 86×10^9 c/l para el Día 169 y de 22×10^9 c/l en el último valor registrado del Día 319.

Los valores medios para todos los parámetros de los signos vitales permanecieron estables durante todo el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio en los grupos con CTLA4Ig y placebo.

La mayoría de los sujetos de ambos grupos de tratamiento presentaron un ECG normal al inicio y de nuevo al final del Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio. La proporción de sujetos cuyo ECG fue normal al inicio pero anormal el Día 169 (o en el momento de la terminación temprana) fue similar para los grupos con CTLA4Ig (1/24, 4,2 %) y con placebo (2/23, 8,7 %).

Resultados farmacodinámicos

El tratamiento con CTLA4Ig se asoció a reducciones medias desde el nivel inicial en el Mes 6 en IL-6 (-4,49 pg/ml), TFN- α (-1,70 pg/ml), IL-1 β (-0,12 pg/ml), y MMP-3 (-2,29 ng/ml). Por comparación, se observaron aumentos pequeños o no se observaron cambios relativos al inicio en el grupo con placebo en el Mes 6 para IL-6 (1,08 pg/ml), TFN- α (0,07 pg/ml), IL-1 β (-0,09 pg/ml), y MMP-3 (14,34 ng/ml).

Después de 6 meses sin tratamiento del estudio, el grupo con CTLA4Ig todavía presentaba descensos medios mayores en la mayoría de estas citocinas que el grupo con placebo. En el Mes 12, los cambios medios desde el nivel inicial para los grupos con CTLA4Ig y placebo fueron de -0,14 y 6,37 pg/ml, respectivamente, para IL-6; -0,50 y -0,10 pg/ml, respectivamente, para TFN- α ; y -2,55 y 25,34 ng/ml, respectivamente, para MMP-3. No se observaron diferencias entre los 2 grupos en el cambio medio desde el nivel inicial para IL-1 β en el Mes 12 (-0,09 y -0,24 pg/ml); sin embargo, el número de sujetos con datos iniciales y del Mes 12 fue pequeño (n=7 en grupo con placebo y n=13 en grupo con CTLA4Ig).

Sólo 5 sujetos del grupo con CTLA4Ig y 3 del grupo con placebo tenían datos iniciales y del Mes 24 sobre citocinas. Todavía era obvio un descenso medio en IL-6 y TFN- α en este pequeño subconjunto de sujetos tratados con CTLA4Ig que no habían desarrollado AR (-3,44 pg/ml y -0,82 pg/ml, respectivamente).

Todos los sujetos dieron positivo para anticuerpos contra CCP2 el Día 1, de forma coherente con los criterios de elegibilidad del estudio. En el grupo con placebo, todos los sujetos con datos evaluables siguieron siendo positivos en los Meses 6, 12, y 24. Por comparación, el porcentaje de sujetos con AI que dieron positivo para anticuerpos contra CCP2 disminuyó en el grupo con CTLA4Ig a 90,9 % (20/22 sujetos) en el Mes 6, 86,7 % (13/15 sujetos) en el Mes 12, y 83,3 % (5/6 sujetos) en el Mes 24.

Estos datos son coherentes con los resultados para los niveles en suero de los anticuerpos contra CCP2. En el grupo con CTLA4Ig, se observaron reducciones medias desde el nivel inicial en anticuerpos contra CCP2 en el Mes 6 (-94,5 U/l) y en el Mes 12 (-6,46 U/l). En el grupo con placebo, los niveles de anticuerpos contra CCP2 estaban aumentados con respecto a los valores iniciales en el Mes 6 (cambio medio, 16,32 U/l) y en el Mes 12 (149,5 U/l). Sólo 6 sujetos del grupo con CTLA4Ig y 3 del grupo con placebo tenían datos iniciales y del Mes 24 sobre anticuerpos contra CCP2. Uno (1) de estos sujetos con CTLA4Ig era negativo para anticuerpos contra CCP2.

Al inicio (Día 1), 85,7 % de los sujetos del grupo con CTLA4Ig y 71,4 % de los sujetos del grupo con placebo eran positivos para RF. En el grupo con CTLA4Ig, este porcentaje disminuyó a 59,1 % al final del Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio (Mes 6). Después de 6 y 18 meses de seguimiento sin tratamiento, la proporción de sujetos que permanecía en el estudio que eran positivos para RF era de 11 de 15 (73,3 %) en el Mes 12 y 3 de 6 (50,0 %) en el Mes 24. Por comparación, la proporción de sujetos del grupo con placebo que eran positivos para RF aumentó durante los 24 meses del estudio (14 de 20 [70,0 %] en el Mes 6 a 3 de 3 [100 %] en el Mes 24).

Ningún sujeto del grupo con CTLA4Ig presentó una seroconversión positiva de RF en el Mes 6, 12 o 24. En el grupo con placebo, 2 de los 7 sujetos evaluados que eran negativos para RF al inicio eran positivos en el Mes 6, y 1 de los 2 sujetos evaluables que eran negativos para RF al inicio era positivo en el Mes 12.

Al inicio (Día 1), el porcentaje de sujetos para los que se detectó el alelo de los epítomos compartidos HLA-DRB10401, HLA-DRB10404, y HLA-DRB10101 fue similar para los grupos de CTLA4Ig (46,4 % [13/28]) y de placebo (39,3 % [11/28]).

5 Capacidad inmunógena

Los datos de capacidad inmunógena estaban disponibles para un total de 23 de los 28 sujetos aleatorizado y tratados del grupo con CTLA4Ig. Ningún sujeto fue seropositivo para anticuerpos contra CTLA4Ig (específicos para la porción IgG de la molécula) en ningún momento durante los 24 meses el periodo del estudio.

10 Cuatro (4) de los 23 sujetos (17,4 %) eran seropositivos en el ensayo contra CTLA4-T (Tip). En estos 4 sujetos, no se detectaron anticuerpos contra CTLA4-T 3 meses después de la última dosis (muestra del Mes 9) pero se detectaron 6 meses después de la última dosis (muestra del Mes 12). Las valoraciones en estos sujetos eran bajas (intervalo: 65 a 98; la sensibilidad del ensayo es 25). De estas 4 muestras, 2 contenían anticuerpos neutralizadores y 15 2 no.

La presencia de una respuesta de seroconversión positiva de anticuerpos no pareció afectar a la seguridad. No se refirieron EA en los sujetos o en proximidad temporal a la respuesta de seroconversión positiva en los sujetos. En un sujeto, se refirió tendosinovitis con inicio el Día 384, aproximadamente 6 meses después de la última dosis del fármaco del estudio (CTLA4Ig) y cerca del momento de la respuesta de seroconversión positiva. Este EA se evaluó como improbablemente relacionado con el tratamiento del estudio y de intensidad moderada, y se refirió que era persistente.

25 Conclusiones generales

Los resultados para los criterios de valoración de la eficacia primarios y secundarios clave relacionados en este estudio sugieren que CTLA4Ig, administrado como monoterapia durante 6 meses en una dosis ajustada al peso de 10 mg/kg IV, retrasa la progresión a AR definitiva en los sujetos con AI, y se observaron efectos de modificación de la enfermedad de CTLA4Ig 6 y 18 meses después de la interrupción del fármaco. En los sujetos con AI, se observaron mejoras mayores en la función física, actividad de la enfermedad referida por el médico, y calidad de vida relacionada con la salud tras 6 meses de tratamiento con CTLA4Ig que con placebo. Las evaluaciones radiográficas de manos y pies indicaron una progresión mínima de la enfermedad durante el Periodo de tratamiento con el fármaco del estudio entre los sujetos que recibieron CTLA4Ig; la progresión de daños estructurales también fue menor 6 meses después de terminar el fármaco del grupo con CTLA4Ig que en el grupo con placebo. Las evaluaciones de RM de muñecas y manos fueron más limitadas pero mostraron una tendencia similar. Comparado con el placebo, el tratamiento con CTLA4Ig se asoció a una mayor reducción de los niveles de anticuerpos contra CCP2 en suero y un descenso en el porcentaje de sujetos que dieron positivo para anticuerpos contra CCP2 y RF. CTLA4Ig a una dosis ajustada al peso de 10 mg/kg administrada IV una vez al mes durante 6 meses fue bien tolerada por los sujetos con AI. La tasa de capacidad inmunógena (seroconversión positiva inducida por el fármaco) fue baja, y la presencia de anticuerpos contra CTLA4Ig o CTLA4-T no presentó correlación directa con ningún hallazgo de seguridad clínica en este estudio de exploración.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

45 **Listado de secuencias**

<110> Bristol-Myers Squibb Company Vratsanos, George

50 <120> PROCEDIMIENTO PARA PREVENIR EL DESARROLLO DE ARTRITIS REUMATOIDE EN SUJETOS CON ARTRITIS INDIFERENCIADA

<130> 11268 NP

55 <150> 61/050.336
<151> 05-05-2008

<160>2

60 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1223

<212> ADN

65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 539 840 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (11)..(1159)

5 <400> 1

```

agcttcacca atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg      49
      Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu
      1              5              10

gtc ctt gca ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg      97
Val Leu Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val
      15              20              25

gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt      145
Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe
      30              35              40              45

gtg tgt gag tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca      193
Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr
      50              55              60

gtg ctt cgg cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc      241
Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr
      65              70              75

tac atg atg ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg      289
Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr
      80              85              90

ggc acc tcc agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg      337
Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg
      95              100             105

gcc atg gac acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca      385
Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro
      110             115             120             125

ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att      433
    
```

ES 2 539 840 T3

Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile	Tyr	Val	Ile	
				130					135					140		
gat	cca	gaa	ccg	tgc	cca	gat	tct	gat	cag	gag	ccc	aaa	tct	tct	gac	481
Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Gln	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	
			145					150					155			
aaa	act	cac	aca	tcc	cca	ccg	tcc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	529
Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
		160					165					170				
tcg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	577
Ser	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
	175					180					185					
tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	625
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
190					195					200					205	
gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	673
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				210					215					220		
aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	721
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
			225				230						235			
gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	769
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
		240					245					250				
gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	817
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
	255					260					265					
aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	865
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
270					275					280					285	
acc	ctg	ccc	cca	tcc	ccg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	913
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
				290					295					300		
acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	961
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
			305					310					315			
gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	1009
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
		320					325					330				
ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	1057
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
	335					340					345					
aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	1105
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
350					355					360					365	
gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	1153
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	

ES 2 539 840 T3

370

375

380

ggt aaa tgagtgcgac ggccggcaag ccccgctccc cgggctctcg cggtcgcacg 1209
Gly Lys

aggatgcttc taga 1223

<210> 2

<211> 383

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 539 840 T3

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

ES 2 539 840 T3

				180						185						190
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	
		195					200					205				
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
	210					215					220					
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
225					230					235					240	
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
				245					250					255		
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
			260					265					270			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
		275					280					285				
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
	290					295					300					
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
305					310					315					320	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
				325					330					335		
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
			340					345					350			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
		355					360					365				
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
	370					375					380					

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de CTLA4, en donde la molécula de CTLA4 se une a CD80 y/o CD86 y comprende un dominio extracelular de CTLA4 tal como se muestra en la SEC ID N.º: 2 que empieza por alanina en la posición 26 o metionina en la posición 27 y que termina por ácido aspártico en la posición 150, para su uso en el tratamiento de la artritis indiferenciada (AI).
- 10 2. La molécula para el uso de la reivindicación 1, en donde la molécula de CTLA4 comprende además una secuencia de aminoácidos que altera la solubilidad o la afinidad de la molécula de CTLA4.
- 15 3. La molécula para el uso de la reivindicación 2, en donde la secuencia de aminoácidos que altera la solubilidad o la afinidad comprende una inmunoglobulina.
- 20 4. La molécula para el uso de la reivindicación 3, en donde la inmunoglobulina es una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma.
- 25 5. La molécula para el uso de la reivindicación 4, en donde la región constante de inmunoglobulina o de la porción de la misma está mutada para reducir la función efectora.
- 30 6. La molécula para el uso de la reivindicación 4, en donde la región constante de inmunoglobulina o la porción de la misma comprenden una bisagra y las regiones CH2 y CH3 de una molécula de inmunoglobulina humana o de mono.
- 35 7. La molécula para el uso de la reivindicación 5, en donde la región constante de inmunoglobulina o de la porción de la misma comprende una bisagra y las regiones CH2 y CH3 de una molécula de inmunoglobulina humana o de mono.
- 40 8. La molécula para el uso de la reivindicación 1, en donde la molécula de CTLA4 comprende:
(a) una secuencia de aminoácidos que comienza por metionina en la posición 27 y que termina por lisina en la posición 383 de la SEC ID N.º: 2, o
(b) una secuencia de aminoácidos que comienza por alanina en la posición 26 y que termina por lisina en la posición 383 de la SEC ID N.º: 2.
- 45 9. La molécula para el uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 8 para reducir un síntoma de AI.
10. La molécula para el uso de la reivindicación 9, en donde el síntoma se selecciona a partir del grupo constituido por hinchazón de las articulaciones, dolor con la exploración de las articulaciones, inflamación, rigidez matinal y dolor.
11. La molécula para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la molécula de CTLA4 es una molécula de fusión soluble de CTLA4 que es para administrarla a un sujeto en una cantidad de 10 mg/kg de peso del sujeto.
12. La molécula para el uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 8 para inhibir lesiones estructurales.
13. La molécula para el uso de la reivindicación 12, en donde la lesión estructural se selecciona del grupo constituido por erosión en la muñeca y mano, edema de la médula ósea en la muñeca y mano, sinovitis en la muñeca y mano.

FIG. 1

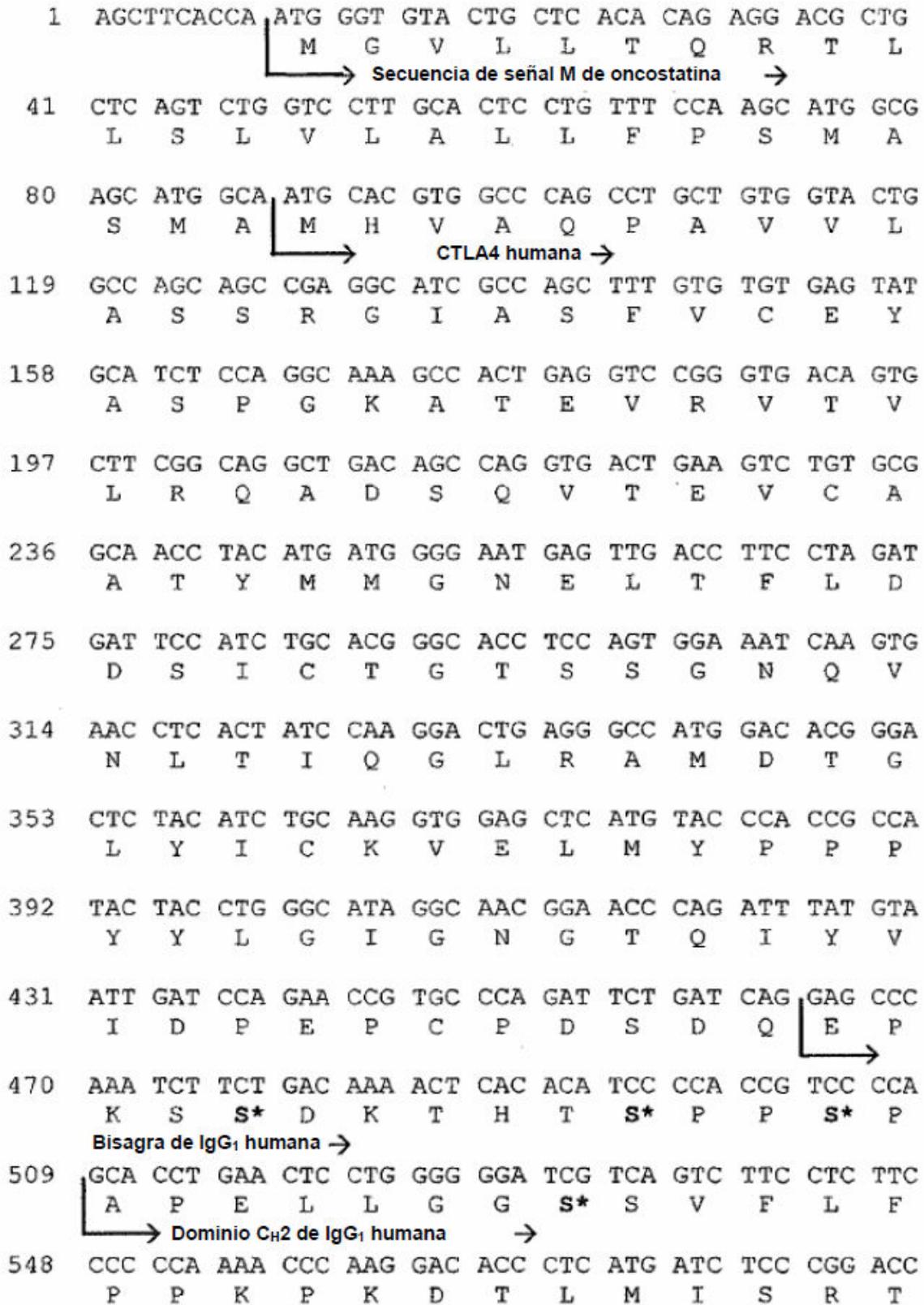


FIG. 1 (Continuación)

587	CCT	GAG	GTC	ACA	TGC	GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA
	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E
626	GAC	CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAC	GGC	GTG
	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V
665	GAG	GTG	CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG
	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q
704	TAC	AAC	AGC	ACG	TAC	CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC
	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V
743	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG	TGC
	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C
782	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	GCC	CTC	CCA	GCC	CCC	ATC	GAG	AAA
	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K
821	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	CAG	CCC	CGA	GAA	CCA	CAG
	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q
							→ Dominio C _H 3 de IgG ₁ humana →						
860	GTG	TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAT	GAG	CTG	ACC	AAG
	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K
899	AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAT
	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y
938	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG
	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q
977	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	CTG	GAC
	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D
1016	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AAG	CTC	ACC	GTG
	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V
1055	GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	CAG	CAG	GGG	AAC	GTC	TTC	TCA	TGC
	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C
1094	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	CAG
	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q
1133	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	CCG	GGT	AAA	TGA	GTGCGACG		
	K	S	L	S	L	S	P	G	K	-			
1172	GCCGGCAAGC CCCGCTCCCC GGGCTCTCGC GGTCGCAC GAGGATGCTT												
1222	CTAGA												

FIG. 2

