

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2009.05.05	(73) Titular(es): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY ROUTE 206 AND PROVINCE LINE ROAD PRINCETON, NJ 08543 US
(30) Prioridade(s): 2008.05.05 US 50336 P 2009.05.01 US 387359	
(43) Data de publicação do pedido: 2011.02.02	(72) Inventor(es): GEORGE VRATSANOS JEAN-CLAUDE BECKER MICHAEL CORBO US US US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.04.22 144/2015	(74) Mandatário: JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE PREVENIR O DESENVOLVIMENTO DE ARTRITE REUMATOIDE EM INDIVÍDUOS COM ARTRITE NÃO DIFERENCIADA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA TRATAR ARTRITE NÃO DIFERENCIADA (UA) E/OU PREVENIR O DESENVOLVIMENTO DE ARTRITE REUMATOIDE (RA) EM INDIVÍDUOS COM UA ADMINISTRANDO-SE A UM INDIVÍDUO EM NECESSIDADE DA MESMA UMA QUANTIDADE EFICAZ DE MOLÉCULA DE CTLA4 SOLÚVEL.

RESUMO

MÉTODO DE PREVENIR O DESENVOLVIMENTO DE ARTRITE REUMATOIDE EM INDIVÍDUOS COM ARTRITE NÃO DIFERENCIADA

A presente invenção refere-se a métodos e composições para tratar artrite não diferenciada (UA) e/ou prevenir o desenvolvimento de artrite reumatoide (RA) em indivíduos com UA administrando-se a um indivíduo em necessidade da mesma uma quantidade eficaz de molécula de CTLA4 solúvel.

DESCRIÇÃO

MÉTODO DE PREVENIR O DESENVOLVIMENTO DE ARTRITE REUMATOIDE EM INDIVÍDUOS COM ARTRITE NÃO DIFERENCIADA

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se, de um modo geral, ao campo de doenças do sistema imunitário, por exemplo, artrite não diferenciada (UA).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A artrite reumatoide (RA) é a mais comum artrite inflamatória, afetando aproximadamente 1% da população mundial (Wolfe, F., "The epidemiology of drug treatment failure in rheumatoid arthritis", *Baillieres Clin. Rheumatol.*, 9(4):619-632 (novembro 1995)). As mulheres têm 2 a 3 vezes mais probabilidade de desenvolver doença em comparação com os homens, com um pico de incidência entre a quarta e a sexta décadas de vida (Hochberg, M.C. et al., "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 Suppl. 1):4-12 (outubro 1991); Spector, T.D., "Rheumatoid arthritis", *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 16(3):513-537 (Agosto 1990); e Zvaifler, N.J., "Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis", in *Arthritis and Allied Conditions*, McCarty, D.J., Koopman, W.J., eds. Philadelphia: Lea e Febiger, 723-736 (1993)). Enquanto a RA é reconhecida clinicamente devido à severa inflamação que afeta as articulações sinoviais, ela é também uma doença sistêmica com frequentes manifestações extra-articulares. A história natural da RA é infelizmente caracterizada por destruição articular, função física prejudicada e qualidade de vida relacionada com saúde precária.

Existe evidência científica crescente de que a

destruição articular ocorre precocemente na RA. Acima de 90% dos indivíduos têm evidência de dano articular por radiografia convencional dentro de dois anos após o diagnóstico de RA (Emery, P., "The Optimal Management of Early Rheumatoid Disease: The Key to Preventing Disability", *Br. J. Rheum.*, 33:765-768 (1994)). O dano de articular pode ser detectado dentro de semanas após o início dos sintomas usando técnicas mais sensíveis, tais como MRI ou ultrassom (McGonagle, D. et al., "The relationship between synovite and bone changes in early untreated rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum.*, 42:1706-1711 (1999) e Wakefield, R.J. et al., "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)). Estas descobertas criaram uma necessidade crescente de terapêuticas que podem eficazmente inibir os processos inflamatórios que causam perda óssea e de cartilagem precoce na RA e deram ênfase crescente em diagnóstico precoce e tratamento de RA.

No entanto, os critérios da 1987 *American Rheumatism Association* (ARA) para RA são menos sensíveis e específicos quando aplicados a indivíduos com artrite inflamatória em comparação com indivíduos com doença mais estabilizada. Indivíduos com artrite inflamatória precoce podem ter oligoartrite em vez de poliartrite, podem ter sintomas de artrite durante menos do que seis semanas ou podem inicialmente não possuir o fator reumatoide, nódulos ou erosões reumatoides em radiografia convencional (Van Gaalen, F.A. et al., "Autoantibodies to Cyclic Citrullinated Peptides Predict Progression to Rheumatoid Arthritis in Patients with Undifferentiated Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 50(3):709-715 (2004)). Como um resultado, estes indivíduos frequentemente não atendem aos critérios diagnósticos de 1987 para RA (ou qualquer outra doença

reumática) precocemente no processo de doença. Estes indivíduos são então diagnosticados com artrite não diferenciada (UA) pelo processo de exclusão. Aproximadamente 40% dos indivíduos referidos para centros de cuidados terciários especializados designados para o diagnóstico e controlo de artrite inflamatória precoce não atendem aos critérios diagnósticos RA ou qualquer outra doença reumatoide (Van Gaalen, F.A. *et al.*, "Autoantibodies to Cyclic Citrullinated Peptides Predict Progression to Arthritis Rheumatoid in Patients with Undifferentiated Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 50(3):709-715 (2004)). Portanto, a artrite não diferenciada é uma entidade clínica comum.

A sinóvia normal é um tecido que circunda e separa os espaços das articulações. As camadas de revestimento de células, compostas de sinoviócitos semelhantes a macrófago e semelhante a fibroblasto, revestem uma estroma de tecido conjuntivo fino contendo números escassos de células dendríticas, fibroblastos, mastócitos e estruturas vasculares (Konttinen, Y.T. *et al.*, "Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates", *Arthritis Rheum.*, 24(1):71-79 (jan. 1981)).

Na RA, o tecido sinovial torna-se notavelmente espesso e dilatado. Quando a doença progride, existe uma proliferação gradual e recrutamento de sinoviócitos, bem como recrutamento de células inflamatórias na sinóvia (Konttinen, Y.T. *et al.*, "Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates", *Arthritis Rheum.*, 24(1):71-79 (Jan. 1981)). Até 50% dos leucócitos infiltrantes na sinóvia são linfócitos T, primariamente células T CD4+ com um fenótipo de memória/ativado (Konttinen, Y.T. *et al.*, "Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates",

Arthritis Rheum., 24(1):71-79 (jan. 1981); Forre, O. et al., "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. et al., "Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes", *N. Engl. J. Med.*, 293(11):517-520 (setembro 1975); Kidd, B.L. et al., "Immunohistological features of synovitis in ankylosing spondylitis: a comparison with rheumatoid arthritis", *Ann. Rheum. Dis.*, 48(2):92-98 (feb. 1989); Cush, J.J. et al., "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. et al., "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); e Klareskog, L. et al., "Relationship between HLA DR expressing cells and T lymphocytes of different subsets in rheumatoid synovial tissue", *Scand. J. Immunol.*, 15(5):501-507 (Maio 1981)). Células de origem de monócito/macrófago também se tornam proeminentes na sinóvia reumatoide, responsável por até 20% de células, e elas também exibem um fenótipo ativado (Firestein, G.S. et al., "How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?" *Arthritis Rheum.*, 33(6):768-773 (Junho 1990) e Firestein, G.S. et al., "Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid", *J. Immunol.*, 144(9):3347-3353 (1 de maio de 1990)). Células semelhantes a monócito/macrófago na sinóvia reumatoide produzem um conjunto de moléculas pró-inflamatórias, incluindo as citocinas IL-1, TNF- α , IL-6, GM-CSF bem como enzimas proteolíticas incluindo colagenases e metaloproteinases da matriz. Células B, células de plasma e

neutrófilos responsáveis por menos do que 5% de células na sinóvia reumatoide, embora os neutrófilos sejam proeminentes no fluido sinovial (Konttinen, Y.T. et al., "Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates", *Arthritis Rheum.*, 24(1):71-79 (Jan. 1981); Forre, O. et al., "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 (Fevereiro 1982); e Firestein, G.S. et al., "Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid", *J. Immunol.*, 144(9):3347-3353 (1 de maio de 1990)).

À medida que a proliferação sinovial e inflamação avança, a massa de tecido sinovial vascular e inflamatório em expansão é denominada *pannus*. O *pannus* é responsável pela invasão da cartilagem articular e destruição de osso. Acredita-se que os produtos de células T ativadas sejam os fatores motores atrás da formação e expansão do *pannus* (Zvaifler, N.J. et al., "Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum.*, 37(6):783-789 (jun. 1994)).

As células semelhantes a monócito/macrófago e células dendríticas na sinóvia reumatoide expressam tanto MHC classe II bem como moléculas coestimulatórias tais como CD80 (B7-1) /CD86 (B7-2), e presumivelmente funcionam como células apresentadoras de antígeno (Balsa, A. et al., "Differential expression of the costimulatory moléculas B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) in rheumatoid synovial tissue", *Br. J. Rheumatol.*, 35(1):33-37 (Jan. 1996); Liu, M.F. et al., "The presence of costimulatory moléculas CD86 and CD28 in artrite reumatoide synovium", *Arthritis Rheum.*, 39(1):110-114 (janeiro 1996); Ranheim, E.A. et al.,

"Elevated expression of CD80 (B7/BB1) and other accessory moléculas on synovial fluid mononuclear cell subsets in rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum.*, 37(11):1637-1646 (novembro 1994); Sfrikakis, P.P. et al., "Expression of CD28, CTLA4, CD80, and CD86 moléculas in subjects com autoimmune rheumatic diseases: implications for immunotherapy", *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 83(3):195-198 (junho 1997); e Thomas, R. et al., "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)). As células T CD4+ ativadas expressando CD28 são tipos celulares infiltrantes proeminentes na sinóvia reumatoide e comumente são encontradas adjacentes às células que expressam MHC classe II e moléculas coestimulatórias. Isto sugere um importante papel para a ativação/coestimulação de células T na patogénese da inflamação sinovial. Isto é consistente com a observação experimental de que células T ativadas, ou por meio do contato célula a célula com sinoviócitos e osteoclastos ou pela elaboração de citocinas secretadas, são importantes fatores no direcionamento de sinovite e destruição óssea na RA. Tomadas em conjunto, estas observações sugerem que células T ativadas e os sinais coestimulatórios libertados através de CD28 desempenham um papel essencial no direcionamento da imunopatologia de RA.

A abordagem para o tratamento de RA evoluiu por meio do início da terapêutica de Fármaco Antirreumático Modificador da Doença (DMARD) antes de seguir o diagnóstico com subsequente otimização de terapêutica de fármaco a fim de ter um maior impacto benéfico sobre o resultado da doença (Redlich, K. et al., "Rheumatoide Arthrite Therapy After Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Blockade", *Arthritis Rheum.*, 40(12):3308-3319 (2003)). No entanto, nenhum padrão de cuidado existe para o tratamento de pacientes com UA (Harrison, B.J. et al., "Natural remission

in inflammatory polyarthritis: issues of definition and prediction," Br. J. Rheumatol., 35:1096-1100 (1996)). Isto deve-se amplamente à incapacidade do médico para determinar de forma precisa o prognóstico destes indivíduos e o seu risco de desenvolvimento de RA com base nas características clínicas comumente usadas na apresentação. A artrite não diferenciada pode remitir espontaneamente, progredir para uma doença reumática diferenciada tal como RA ou permanecer não diferenciada (Quinn, M.A. et al., "Evaluation and management of early inflammatory polyarthritis", Rheumatology, Terceira Edição, MOSBY (Elsevier Limited), 885-891 (2003)). Os DMARDs não são geralmente iniciados no princípio em indivíduos com UA devido à incerteza em torno do prognóstico. Em vez disso, os AINEs são tradicionalmente os primeiros fármacos a serem usados seguidos por corticosteroides orais. Os DMARDs são geralmente usados quando os sintomas e sinais de artrite são refratários aos primeiros dois tipos de intervenção. Portanto, uma abordagem "piramidal" tem sido tradicionalmente usada (Harrison, B.J. et al., "Natural remission in inflammatory polyarthritis: issues of definition and prediction", Br. J. Rheumatol., 35:1096-1100 (1996)). Infelizmente, no entanto, esta abordagem pode permitir que o paciente desenvolva danos e destruição articular antes do início da terapêutica potencialmente modificadora da doença.

Nenhuma terapêutica antirreumática aprovada foi demonstrada como fundamentalmente alterando o curso de artrite não diferenciada e prevenindo o desenvolvimento de RA. Um agente que direciona TNF alfa, infliximab, foi estudado num ensaio clínico direcionando prevenção/remissão de RA precoce após um curto curso de terapêutica com antagonista de TNF. No entanto, dados publicados demonstram que um curso de 6 meses de terapêutica com antagonista de TNF não previne a progressão de UA para RA (Saleem, B. et al., Rheumatology, Academic Unit of Musculoskeletal

Disease, Leeds, United Kingdom, Ann. Rheum. Dis., 66 (Suppl. II):186 (2007)).

Claramente, existe uma necessidade para um tratamento que possa oferecer aos indivíduos com artrite não diferenciada em alto risco de desenvolvimento de RA a oportunidade de fundamentalmente alterar o curso da sua doença seletivamente direcionando a ativação das células T e prevenir o desenvolvimento de RA.

Os documentos US 2005/196402 e US 2004/0022787 descrevem a utilização de moléculas CTLA4 no tratamento de artrite (incluindo artrite reumatoide, artrite reumatoide juvenil, osteoartrite, artrite psoriática).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a moléculas CTLA4, em que as moléculas CTLA4 se ligam a CD80 e/ou CD86 e compreendem um domínio extracelular de CTLA4 conforme mostrado na SEQ ID NO:2 começando com alanina na posição 26 ou metionina na posição 27 e terminando com ácido aspártico na posição 150, para utilização no tratamento de artrite não diferenciada (UA).

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 apresenta a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:1) de uma porção de uma cassette de expressão para uma molécula de CTLA4-Ig. É também mostrada a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:2) codificada pelo ácido nucleico. As moléculas de CTLA4-Ig que podem ser produzidas a partir desta cassette de expressão incluem moléculas tendo a sequência de aminoácidos de resíduos: (i) 26-383 de SEQ ID NO:2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO:2, (iii) 27-383 de SEQ ID NO:2, ou (iv) 26-382 de SEQ ID NO:2, ou opcionalmente (v) 25-382 de SEQ ID NO:2, ou (vi) 25-383 de SEQ ID NO:2. A cassette de expressão compreende as seguintes regiões: (a) uma sequência de sinal de Oncostatina M (nucleótidos 11-88 de SEQ ID NO: 1; aminoácidos 1-26 de SEQ ID NO:2); (b) um domínio extracelular de CTLA4 humana (nucleótidos 89-463 de

SEQ ID NO:1; aminoácidos 27-151 de SEQ ID NO:2); (c) uma porção modificada da região constante de IgG1 humana (nucleótidos 464-1159 de SEQ ID NO: 1; aminoácidos 152-383 de SEQ ID NO:2), incluindo uma região de dobradiça modificada (nucleótidos 464-508 de SEQ ID NO:1; aminoácidos 152-166 de SEQ ID NO:2), um domínio CH2 de IgG1 humana modificado (nucleótidos 509-838 de SEQ ID NO:1; aminoácidos 167-276 de SEQ ID NO:2), e um domínio CH3 de IgG1 humana (nucleótidos 839-1159 de SEQ ID NO:1; aminoácidos 277-383 de SEQ ID NO:2).

A Figura 2 representa o tempo para descontinuação devido ao desenvolvimento de RA como avaliado no estudo clínico descrito no exemplo III.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Conforme utilizado no presente documento:

Os termos "CTLA4-Ig" ou "Molécula de CTLA4-Ig" ou "molécula de CTLA4Ig" são usados indistintamente, e referem-se a uma molécula de proteína que compreende pelo menos um polipéptido tendo um domínio extracelular de CTLA4 ou porção do mesmo e uma região constante de imunoglobulina ou porção da mesma. O domínio extracelular e uma região constante de imunoglobulina podem ser de tipo selvagem, ou mutantes ou modificados, e de mamífero, incluindo ser humano ou ratinho. O polipéptido pode também compreender domínios de proteína adicionais. Uma molécula de CTLA4-Ig pode também referir-se a formas multímeras do polipéptido, tal como dímeros, tetrameros e hexâmeros. Uma molécula de CTLA4-Ig também é capaz de se ligar a CD80 e/ou CD86.

O termo "B7-1" refere-se a CD80; o termo "B7-2" refere-se a CD86; e o termo "B7" refere-se a ambos B7-1 e B7-2 (CD80 e CD86). O termo "B7-1-Ig" ou "B7-1Ig" refere-se a CD80-Ig; o termo "B7-2-Ig" ou "B7-2Ig" refere-se a CD86-Ig. Numa forma de realização, "CTLA4Ig" refere-se a uma

molécula de proteína tendo a sequência de aminoácidos de resíduos: (i) 26-383 de SEQ ID NO:2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO:2; (iii) 27-383 de SEQ ID NO:2, ou (iv) 27-382 de SEQ ID NO:2, ou opcionalmente (v) 25-382 de SEQ ID NO:2, ou (vi) 25-383 de SEQ ID NO:2. Em forma monomérica estas proteínas podem ser referidas no presente documento como "monómeros de SEQ ID NO:2," ou monómeros "tendo uma sequência SEQ ID NO:2". Estes monómeros de SEQ ID NO:2 podem dimerizar-se, de modo que combinações dímeras possam incluir, por exemplo: (i) e (i); (i) e (ii); (i) e (iii); (i) e (iv); (i) e (v); (i) e (vi); (ii) e (ii); (ii) e (iii); (ii) e (iv); (ii) e (v); (ii) e (vi); (iii) e (iii); (iii) e (iv); (iii) e (v); (iii) e (vi); (iv) e (iv); (iv) e (v); (iv) e (vi); (v) e (v); (v) e (vi); e, (vi) e (vi). Estas diferentes combinações dímeras podem também associar-se entre si para formar moléculas de CTLA4Ig tetrâmeras. Estes monómeros, dímeros, tetrâmeros e outros multímeros podem ser referidos no presente documento como "proteínas de SEQ ID NO:2" ou proteínas "tendo uma sequência SEQ ID NO:2". (ADN codificando CTLA4Ig conforme mostrado em SEQ ID NO:2 foi depositado em 31 de maio de 1991 com a American Type Culture Collection (ATCC®), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 sob as provisões do Tratado de Budapeste, e foi acordado o número de acesso ATCC®, ATCC® 68629; uma linha celular de ovário de hamster chinês (CHO) expressando CTLA4Ig como mostrado em SEQ ID NO:2 foi depositada em 31 de maio de 1991 com o número de identificação ATCC® CRL-10762).

Uma "substância de fármaco" refere-se ao material de partida utilizado na formulação do produto de fármaco final. A composição de substância de fármaco de CTLA4Ig típica compreende uma concentração de proteína de 20 mg/ml a 60 mg/ml, pH de 6 a 8 e espécies de %HMW de < 5%.

Uma "solução de volume formulada" refere-se à formulação final antes do preenchimento do recipiente, tal

como a solução formulada antes do preenchimento dos frascos para liofilização, ou a solução formulada antes do preenchimento da seringa para injeção SC.

Um "produto de fármaco" refere-se à formulação final embalada num recipiente que pode ser reconstituído antes do uso, tal como com um produto de fármaco liofilizado; diluído antes do uso, tal como com um produto de fármaco líquido; ou utilizado no estado em que se encontra, tal como com o produto de fármaco de solução SC.

"*Health Assessment Questionnaire (HAQs)*" refere-se a uma série de questões usadas para avaliar os pacientes quanto aos sintomas de atividade de doença. Estes sintomas incluíram: inchaço da articulação, sensibilidade da articulação, inflamação, rigidez matinal, atividade de doença e incapacidade avaliados para cada paciente num questionário autoadministrado considerando o seu bem-estar e função físicos, atividade de doença e incapacidade conforme avaliados por um médico, e dor (Fries, J.F. et al., J. Rheumatology, 9:789-793 (1982)).

"*Medical Outcomes Study Short Form-36 (SF-36)*" refere-se a formulários utilizados para avaliar o impacto da terapêutica sobre a qualidade de vida relacionada com a saúde (HRQOL). O SF-36 consiste em 36 itens que abrangem quatro domínios físicos e quatro mentais (função física, aspetos físicos, dor corporal, saúde geral, vitalidade, função social, papel emocional, e saúde mental). Estes domínios individuais são usados para derivar as pontuações resumidas do componente físico e mental que variam de 0 a 100, com maiores pontuações indicando melhor qualidade de vida.

A "*1987 Revised American Rheumatism Association (ARA) Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis (RA)*" refere-se a uma série de critérios descritos no quadro 1 abaixo. Para os propósitos de classificação, diz-se que um indivíduo tem RA se ele tiver cumprido pelo menos

quatro dos sete critérios. Os critérios 1 a 4 devem estar presentes durante pelo menos 6 semanas.

QUADRO 1

Critérios ARA Revistos de 1987 para a Classificação de RA	
Critério	Definição
1. Rigidez Matinal	Rigidez matinal nas, e em torno das articulações permanecendo pelo menos 1 hora antes da melhoria máxima.
2. Artrite de três ou mais áreas articulares	Pelo menos três áreas articulares simultaneamente tendo inflamação de tecido mole ou fluido (não apenas sobrecrecimento ósseo) observados por um médico (as 14 áreas articulares possíveis são [direita ou esquerda] PIP, MCP, pulso, cotovelo, joelho, tornozelo e articulações de MTP)
3. Artrite de articulações da mão	Pelo menos uma área articular inflamada como acima na articulação do pulso, MCP ou PIP.
4. Artrite simétrica	Envolvimento simultâneo das mesmas áreas articulares (como no critério 2) em ambos os lados do corpo (envolvimento bilateral de articulações de PIP, MCP, ou MTP é aceitável sem simetria absoluta)
5. Nódulos reumatoides	Nódulos subcutâneos sobre protuberâncias ósseas ou superfícies extensoras, ou em regiões justa-articulares, observados por um médico.
6. Fator reumatoide sérico.	Demonstração de quantidades anormais de "fator reumatoide" sérico por qualquer método que foi positivo em menos do que 5 por cento de indivíduos de controle normais.

Critérios ARA Revistos de 1987 para a Classificação de RA	
Critério	Definição
7. Alterações radiográficas	Alterações típicas de RA em radiografias da mão e pulso, que devem incluir erosões ou descalcificações ósseas inequívocas localizadas em, ou mais acentuadas adjacentes às articulações envolvidas (alterações de osteoartrite apenas não se qualificam)
Abreviaturas: ARA, American Rheumatism Association; PIP, interfalângica proximal; MCP, metacarpo falângica; MTP, metatarso falângica; RA, artrite reumatoide; PA, ântero-posterior*.	

O termo "ACR" refere-se a estudos de resposta clínica com base em critérios estabelecidos pelo American College of Rheumatology. A Série de Dados de Núcleo de ACR e Definições de Resposta são descritas no quadro2 abaixo. Um indivíduo cumpre os critérios de "ACR20" se houver uma melhoria de 20 por cento em contagens de articulação sensível e inflamada e melhoria de 20 por cento em três dos cinco sintomas restantes medidos, tais como alterações de doença globais do paciente e médico, dor, incapacidade física, e um reagente de fase aguda tal como Proteína C reativa (CRP) ou Relatório de Segurança Expedido (ESR) (Felson, D.T. et al., Arthritis Rheum., 36:729-740 (1993); Felson, D.T. et al., Arthritis Rheum., 38:1-9 (1995)). De forma semelhante, um indivíduo satisfaz o critério de "ACR50" ou "ACR70" se houver uma melhoria de 50 ou 70 por cento, respetivamente, em contagens de articulação sensível e inflamada e melhorias de 50 ou 70 por cento, respetivamente, em três de cinco sintomas restantes medidos, tais como alterações de doença global do paciente

e médico, dor, incapacidade física, e um reagente de fase aguda tal como CRP ou ESR.

QUADRO 2

Série de Dados de Núcleo de ACR e Definições de Resposta	
Componente de série de dados de núcleo de ACR	Ferramenta de Avaliação Validada
1. Contagem de articulação sensível	Contagem padronizada de 68 articulações
2. Contagem de articulação inflamada	Contagem padronizada de 66 articulações
3. Avaliação de dor global do indivíduo	Uma escala visual de 0 - 100 mm analógica visual
4. Avaliação de atividade de doença global do indivíduo	Uma escala visual de 0 - 100 mm analógica visual
5. Avaliação de atividade de doença global do médico	Uma escala visual de 0 - 100 mm analógica visual
6. Avaliação de função física do Indivíduo	<i>Health Assessment Questionnaire</i> (HAQ)
7. Valor de reagente de fase aguda	ESR (Westergren) e proteína C reativa

Uma pessoa é diagnosticada com artrite não diferenciada (UA) quando tem sinovite clínica sintomática de duas ou mais articulações e possui pelo menos um, e não mais do que três, dos critérios para a classificação de RA da Associação de Reumatismo Americana (1987) descritos no quadro 1.

Conforme utilizado no presente documento, "tratar" ou "tratando" a UA significa controlar a UA através de terapêuticas medicinais ou outras. O tratamento da UA pode suprimir eventos imunomediados associados à doença, melhorar os sintomas da doença ou distúrbio, reduzir a gravidade da doença, alterar o curso de uma progressão da doença e/ou melhorar ou curar a doença. Por exemplo, o

tratamento de UA pode ser realizado regulando-se uma resposta imunitária, por exemplo, regulando as interações celulares positivas de CTLA4- e/ou CD28- funcionais. Alternativamente, o tratamento da UA pode ser realizado prevenindo-se ou inibindo-se o progresso da doença para RA por meio do uso das composições descritas no presente documento. Por exemplo, o tratamento de UA inclui a inibição de erosão da articulação conforme avaliado por MRI.

As amostras de soro podem ser analisadas em relação a CTLA4Ig através de um ensaio de imunoabsorção ligado por enzima (ELISA).

Monómeros e Multímeros de CTLA4-Ig

As moléculas CTLA4-Ig podem incluir, por exemplo, as proteínas de CTLA4-Ig em monómero, dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero, hexâmero, ou outras formas multiméricas. Moléculas de CTLA4-Ig podem compreender uma fusão de proteína com pelo menos um domínio extracelular de CTLA4 e uma região constante de imunoglobulina. Moléculas de CTLA4-Ig podem ter sequências do tipo selvagem ou mutantes, por exemplo, com respeito ao domínio CTLA4 extracelular e sequências de região constante de imunoglobulina. Os monómeros de CTLA4-Ig, sozinhos, ou em dímero, tetrâmero ou outra forma multimérica, podem ser glicosilados.

Em algumas formas de realização, a invenção fornece populações de moléculas de CTLA4-Ig que têm pelo menos uma certa percentagem de dímero ou outras moléculas multiméricas. Por exemplo, a invenção fornece moléculas de populações de CTLA4-Ig que são maiores do que 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 99,5% de dímeros de CTLA4-Ig. Numa forma de realização, a invenção fornece uma molécula de população de CTLA4-Ig que compreende desde cerca de 95% a cerca de 99,5% de dímero de CTLA4-Ig e desde cerca de 0,5% a cerca de 5% de tetrâmero CTLA4-Ig. Noutra forma de

realização, a molécula de população de CTLA4-Ig compreende cerca de 98% de dímero de CTLA4-Ig, cerca de 1,5% de tetrâmero de CTLA4-Ig e cerca de 0,5% de monómero de CTLA4-Ig.

Numa forma de realização, a invenção fornece uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população é substancialmente livre de moléculas de monómero de CTLA4-Ig. Substancialmente livre de moléculas de monómero de CTLA4-Ig pode referir-se a uma população de moléculas de CTLA4-Ig que têm menos do que 1%, 0,5%, ou 0,1% de monómeros.

Numa forma de realização, a invenção fornece uma população de moléculas de CTLA4-Igs, em que a população é substancialmente livre de multímeros de CTLA4-Ig que são maiores do que os dímeros, tais como tetrâmeros, hexâmeros, etc. Substancialmente livre de moléculas multiméricas de CTLA4-Ig maiores do que dímeros pode referir-se a uma população de moléculas de CTLA4-Ig que têm menos do que 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, ou 0,1% de multímeros de CTLA4-Ig maiores do que a forma dimérica.

Numa forma de realização, a molécula de monómero de CTLA4-Ig pode ter, por exemplo, a sequência de aminoácidos de: (i) 26-383 de SEQ ID NO:2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO:2 (iii) 27-383 de SEQ ID NO:2, ou (iv) 27-382 de SEQ ID NO:2, ou opcionalmente (v) 25-382 de SEQ ID NO:2, ou (vi) 25-383 de SEQ ID NO:2. Quando uma cassete de expressão compreendendo a sequência de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:1 é expressa em células CHO, a forma monomérica predominante expressa tem o resíduo de aminoácido do terminal N de metionina (resíduo 27 de SEQ ID NO:2), que corresponde ao resíduo de aminoácido de terminal N de CTLA4 humana do tipo selvagem. Entretanto, porque SEQ ID NO:1 também inclui a sequência de codificação para uma sequência de sinal de oncostatina M (nucleótidos 11-88 de SEQ ID NO:1), a proteína expressa a partir de SEQ ID NO:1 contém uma

sequência de sinal de oncostatina M. A sequência de sinal é clivada a partir da proteína expressa durante o processo de exportação da proteína do citoplasma, ou secreção para fora da célula. Porém a clivagem pode resultar em variantes de terminal N, tal como clivagem entre os resíduos de aminoácido 25 e 26 (resultando num terminal N de resíduo 26, isto é, a "variante Ala"), ou entre os resíduos de aminoácidos 24 e 25 (resultando num terminal N de resíduo 2, isto é, a "variante Met-Ala"), em oposição à clivagem entre os resíduos de aminoácido 26 e 27 (resultando num terminal N de resíduo 27). Por exemplo, a variante Met-Ala pode estar presente numa mistura de moléculas de CTLA4-Ig em cerca de 1%, e a variante Ala pode estar presente numa mistura de moléculas de CTLA4-Ig em cerca de 8 a 10%. Além disso, a proteína expressa a partir de SEQ ID NO:1 pode ter variantes de terminal C devido ao processamento incompleto. O terminal C predominante é a glicina no resíduo 382 de SEQ ID NO:2. Numa mistura de moléculas de CTLA4-Ig, monómeros tendo lisina no terminal C (resíduo 383 de SEQ ID NO:2) podem estar presente, por exemplo, em cerca de 4 a 5%.

A molécula de monómero de CTLA4-Ig pode compreender um domínio extracelular de CTLA4 humana. Numa forma de realização, o domínio extracelular pode compreender a sequência de nucleótido de nucleótidos 89-463 de SEQ ID NO:1 que codificam para os aminoácidos 27-151 de SEQ ID NO:2. Noutra forma de realização, o domínio extracelular pode compreender sequências mutantes de CTLA4 humano. Em outra forma de realização, o domínio extracelular pode compreender alterações de nucleótido para os nucleótidos 89-463 de SEQ ID NO:1 de modo que as alterações conservativas de aminoácidos sejam feitas. Noutra forma de realização, o domínio extracelular pode compreender uma sequência de nucleótidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntica aos nucleótidos 89-463 de SEQ ID NO:1.

A molécula de monómero de CTLA4-Ig pode compreender uma região constante de uma imunoglobulina humana. Esta região constante pode ser uma porção de uma região constante; esta região constante pode ter uma sequência do tipo selvagem ou mutante. A região constante pode ser de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD ou IgE humana. A região constante pode ser de uma cadeia leve ou uma cadeia pesada de uma imunoglobulina. Onde a região constante é de uma molécula de IgG, IgD, ou IgA, a região constante pode compreender um ou mais dos seguintes domínios de região constante: CL, CH1, articulação, CH2, ou CH3. Onde a região constante é de IgM ou IgE, a região constante pode compreender um ou mais dos seguintes domínios de região constante: CL, CH1, CH2, CH3, ou Ca4. Em uma forma de realização, a região constante pode compreender um ou mais domínios de região constante de IgG, IgD, IgA, IgM ou IgE.

Numa forma de realização, a molécula de monómero de CTLA4-Ig compreende uma região de articulação de IgG1 humano modificada (nucleótidos 464-508 de SEQ ID NO: 1; aminoácidos 152-166 de SEQ ID NO:2), em que as serinas nos resíduos de aminoácido 156, 162, e 165 de SEQ ID NO:2 foram construídas a partir de cisteínas presentes na sequência de tipo selvagem.

Numa forma de realização, a molécula de monómero de CTLA4-Ig compreende uma região CH2 de IgG1 humana modificada e uma região CH3 do tipo selvagem (o domínio CH2 de IgG1 humana modificado tendo nucleótidos 509-838 de SEQ ID NO: 1 e aminoácidos 167-276 de SEQ ID NO:2; o domínio de CH3 de IgG1 humana tendo nucleótidos 839-1159 de SEQ ID NO:1 e aminoácidos 277-383 de SEQ ID NO:2).

Em uma forma de realização, uma molécula de população de CTLA4-Ig compreende monómeros tendo uma sequência mostrada em qualquer uma das figuras 7, 8, ou 9 do documento de Patente U.S. N.º 7.094.874, emitida em 22 de

agosto de 2006 e nas Publicações de Pedido de Patente U.S. N.ºs. 2003/0083246 e 2004/0022787.

Numa forma de realização, uma molécula de tetrâmero de CTLA4-Ig compreende dois pares ou dois dímeros de polipéptidos de CTLA4-Ig, em que cada polipéptido tem uma das seguintes sequências de aminoácidos: (i) 26-383 de SEQ ID NO:2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO:2, (iii) 27-383 de SEQ ID NO:2, ou (iv) 27-382 de SEQ ID NO:2, ou opcionalmente (v) 25-382 de SEQ ID NO:2, ou (vi) 25-383 de SEQ ID NO:2. Cada membro do par de polipéptidos ou dímero é covalentemente ligado ao outro membro, e os dois pares de polipéptidos são não covalentemente associados entre si, desse modo formando um tetrâmero. Tais moléculas de tetrâmero são capazes de ligação a CD80 ou CD86.

Noutra forma de realização, tais moléculas tetrâmeras podem ligar-se a CD80 ou CD86 com uma avidéz que é pelo menos 2 vezes maior do que a avidéz de ligação de um dímero de CTLA4-Ig (cujos monómeros têm uma das sequências de aminoácido acima) a CD80 ou CD86. Noutra forma de realização, tais moléculas tetrâmeras podem ligar-se a CD80 ou CD86 com uma avidéz que é pelo menos 2 vezes maior do que a afinidade de ligação ou avidéz do CTLA4 de tipo selvagem a CD80 ou CD86. Tal avidéz maior pode contribuir para maior eficácia no tratamento de distúrbios imunes e outras doenças como abaixo descrito. Além disso, uma avidéz maior ou melhorada pode produzir o resultado de maior potência de um fármaco. Por exemplo, uma composição terapêutica compreendendo tetrâmero de CTLA4-Ig teria uma maior avidéz e, portanto, maior potência do que a mesma quantidade de uma composição terapêutica tendo monómero de CTLA4-Ig. Noutra forma de realização, tais moléculas tetrâmeras podem ter pelo menos uma inibição 2 vezes maior sobre a proliferação de célula T quando comparado a um dímero de CTLA4-Ig (cujos monómeros têm uma das sequências de aminoácido acima). Noutra forma de realização, tais

moléculas tetrâmeras podem ter pelo menos uma inibição 2 vezes maior sobre a proliferação de célula T quando comparado a uma molécula de CTLA4 do tipo selvagem.

A proliferação de células T pode ser medida usando ensaios padrão conhecidos na técnica. Por exemplo, um dos meios mais comuns de avaliar a proliferação de células T é estimular as células T por meio de antigénios ou anticorpos agonísticos para TCR e medir, por exemplo, a incorporação de timidina titulada (3H-TdR) em células T em proliferação ou a quantidade de citocinas libertadas por células T em proliferação em cultura. O efeito inibitório de moléculas de CTLA4-Ig na ativação ou proliferação de células T pode desse modo ser medido.

A afinidade de uma molécula de CTLA4-Ig é a intensidade da ligação da molécula a um único ligante, incluindo as proteínas de fusão CD80, CD86, ou CD80Ig ou CD86Ig. A afinidade de CTLA4-Ig para ligantes pode ser medida usando, por exemplo, análise de interação de ligação (BIA) com base na técnica de plasmón de superfície. Com exceção da medição da intensidade de ligação, ela permite a determinação em tempo real da cinética de ligação, tal como as constantes da taxa de associação e dissociação. Um *chip* sensor, consistindo numa lâmina de vidro revestida com uma película fina de metal, ao qual uma matriz de superfície é covalentemente ligada, é revestida com um dos interreagentes, isto é, CTLA4-Ig ou um dos ligantes. Uma solução contendo o outro interreagente é deixada fluir sobre sua superfície. Um raio de luz contínuo é direcionado contra o outro lado da superfície, e o seu ângulo de reflexão é medido. Na ligação de CTLA4-Ig a ligante, o ângulo de ressonância do raio de luz muda (já que depende do índice refrativo do meio próximo ao lado reativo do sensor, que por sua vez é diretamente correlacionado com a concentração de material dissolvido no meio). Ela é subsequentemente analisada com o auxílio de um computador.

Numa forma de realização, as experiências de ligação de CTLA4-Ig podem ser realizadas por ressonância de plasmón de superfície (SPR) num instrumento BIAcore (BIAcore AG, Uppsala, Suécia). CTLA4-Ig pode ser covalentemente acoplado por grupos de amina primária a uma matriz de dextrano carboximetilado num *chip* sensor BIAcore, deste modo imobilizando CTLA4-Ig no *chip* sensor. Alternativamente, um anticorpo de região anti-constante pode ser usado para imobilizar CTLA4-Ig indiretamente na superfície do sensor por meio do fragmento de Ig. A seguir, ligantes são adicionados ao *chip* para medir a ligação de CTLA4-Ig aos ligantes. As medições de afinidade podem ser realizadas, por exemplo, conforme descrito em van der Merwe, P. *et al.*, J. Exp. Med., 185(3):393-404 (1997).

A avides de moléculas de CTLA4-Ig pode também ser medida. A avides pode ser definida como a soma total da força de ligação de duas moléculas ou células uma à outra em múltiplos sítios. A avides é distinta da afinidade que é a força de ligação de um sítio numa molécula ao seu ligante. Sem estar ligado pela teoria, uma maior avides de moléculas de CTLA4-Ig pode induzir à potência aumentada de inibição por moléculas de CTLA4-Ig sobre a proliferação e ativação de células T. A avides pode ser medida, por exemplo, por duas categorias de ensaios de fase sólida: a) ensaios de inibição competitiva, e b) ensaios de eluição. Em ambos o ligante é ligado a um suporte sólido. No ensaio de inibição competitiva, as moléculas de CTLA4-Ig são então adicionadas em solução a uma concentração fixa, juntamente com ligante livre em diferentes concentrações, e a quantidade de ligante que inibe a ligação de fase sólida em 50% é determinada. Quanto menos ligante for necessário, mais forte será a avides. Em ensaios de eluição, o ligante é adicionado em solução. Após a obtenção de um estado de equilíbrio, um caotrope ou agente desnaturante (por exemplo, isotiocianato, ureia, ou dietilamina) é adicionado

em diferentes concentrações para romper as interações de CTLA4-Ig/ligante. A quantidade de CTLA4-Ig resistente à eluição é determinada a seguir com um ELISA. Quanto maior a avidéz, mais agente caotropico é necessário para eluir uma certa quantidade de CTLA4-Ig. A avidéz relativa de uma mistura heterogénea de moléculas de CTLA4-Ig pode ser expressa como o índice de avidéz (AI), igual à concentração de agente de eluição necessária para eluir 50% das moléculas de CTLA4-Igs ligadas. A análise refinada de dados pode ser realizada determinando-se as percentagens de CTLA4-Ig eluído em diferentes concentrações do agente de eluição.

Métodos de Produção das Moléculas de CTLA4Ig da Invenção

A expressão de moléculas de CTLA4Ig pode ser em células procarióticas. Mais frequentemente os procariotas são representados por várias estirpes de bactérias. As bactérias podem ser uma Gram-positiva ou uma Gram-negativa. Tipicamente, as bactérias Gram-negativas tal como *E. coli* são as preferidas. Outras estirpes microbianas podem também ser usadas.

Sequências, descritas acima, codificando moléculas de CTLA4Ig podem ser inseridas num vetor designado para a expressão de sequências exógenas em células procarióticas tais como *E. coli*. Estes vetores podem incluir sequências de controlo procarióticas comumente usadas que são definidas no presente documento como incluindo promotores para início da transcrição, opcionalmente com um operador, juntamente com sequências do sítio de ligação de ribossoma, incluem tais promotores comumente usados como os sistemas promotores de beta-lactamase (penicilinase) e lactose (lac) (Chang *et al.*, *Nature*, 198:1056 (1977)), o sistema promotor de triptofano (trp) (Goeddel *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980)) e o promotor P_L lambda derivado e sítio de ligação de ribossoma de gene-N (Shimatake *et al.*, *Nature*, 292:128 (1981)).

Tais vetores de expressão também incluirão origens de replicação e marcadores selecionáveis, tais como um gene de beta-lactamase ou neomicina fosfotransferase conferindo resistência a antibióticos, de modo que os vetores possam replicar-se em bactérias e células transportando os plasmídeos possam ser selecionadas para quando desenvolvidas na presença de antibióticos, tal como ampicilina ou canamicina.

O plasmídeo de expressão pode ser introduzido em células procarióticas por meio de uma variedade de métodos padrões, incluindo, porém não limitados a choque de CaCl_2 (Cohen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:2110 (1972), e Sambrook et al., eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edição, Cold Spring Harbor Press (1989)), e eletroporação.

De acordo com a prática da invenção, células eucarióticas são também células hospedeiras adequadas. Exemplos de células eucarióticas incluem qualquer célula animal, seja primária ou imortalizada, levedura (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Pichia pastoris*), e células vegetais. Células de mieloma, COS e CHO são exemplos de células animais que podem ser usadas como hospedeiras. Células CHO particulares incluem, porém não estão limitadas a, DG44 (Chasin et al., Som. Cell. Molec. Genet., 12:555-556 (1986); Kolkekar, Biochemistry, 36:10901-10909 (1997)), CHO-K1 (ATCC® No. CCL-61), linha celular CHO-K1 Tet-On (Clontech), CHO designada ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO clone 13 (GEIMG, Génova, IT), CHO clone B (GEIMG, Génova, IT), CHO-K1/SF designada ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), e RR-CHOK1 designada ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK). As células vegetais ilustrativas incluem células de tabaco (plantas inteiras, cultura celular, ou calo), milho, soja e arroz. Sementes de milho, soja, e arroz são também aceitáveis.

Sequências de ácidos nucleicos codificando moléculas de CTLA4Ig descritas acima podem também ser inseridas num vetor designado para expressar sequências estranhas num hospedeiro eucariótico. Os elementos regulatórios do vetor podem variar de acordo com o hospedeiro eucariótico particular.

Sequências de controlo eucarióticas comumente usadas para utilização em vetores de expressão incluem promotores e sequências de controlo compatíveis com células mamíferas, tais como, por exemplo, promotor de CMV (vetor de CDM8) e vírus de sarcoma aviário (ASV) (vetor nLN). Outros promotores comumente usados incluem os promotores precoces e tardios de Vírus Símio 40 (SV40) (Fiers *et al.*, Nature, 273:113 (1973)), ou outros promotores virais tais como aqueles derivados de poliomia, Adenovírus 2, e vírus do papiloma bovino. Um promotor induzível, tal como hMTII (Karin *et al.*, Nature, 299:797-802 (1982)) pode também ser utilizado.

Vetores para expressar moléculas de CTLA4Ig em eucariotas podem também transportar sequências chamadas regiões potenciadoras. Estas são importantes na otimização da expressão génica e são encontradas ou a montante ou a jusante da região promotora.

Exemplos de vetores de expressão para células hospedeiras eucarióticas incluem, porém não estão limitados a, vetores para células hospedeiras mamíferas (por exemplo, BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); vetores pVPakc, vetores pCMV, vetores pSG5 (Stratagene)), vetores retrovirais (por exemplo, vetores pFB (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) ou formas modificadas dos mesmos, vetores adenovirais; vetores de vírus adeno-associado, vetores de baculovírus, vetores de levedura (por exemplo, vetores pESC (Stratagene)).

Sequências de ácidos nucleicos codificando moléculas

CTLA4Ig podem integrar-se no genoma da célula hospedeira eucariótica e replicar-se à medida que o genoma hospedeiro se replica. Alternativamente, o vetor transportando moléculas de CTLA4Ig pode conter origens de replicação permitindo a replicação extracromosômica.

Para expressar as sequências de ácido nucleico em *Saccharomyces cerevisiae*, a origem de replicação do plasmídeo de levedura endógeno, pode ser usado o círculo de 2 μ . (Broach, Meth. Enzymol., 101:307 (1983)). Alternativamente, sequências do genoma de levedura capazes de promover replicação autónoma podem ser usadas (veja-se, por exemplo, Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980); e Clarke et al., Meth. Enzymol., 101:300 (1983)).

Sequências de controlo transcricionais para vetores de levedura incluem promotores para a síntese de enzimas glicolíticas (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968) e Holland et al., Biochemistry, 17:4900 (1978)). Promotores adicionais conhecidos na técnica incluem o promotor CMV fornecido no vetor CDM8 (Toyama et al., FEBS, 268:217-221 (1990)); o promotor para 3-fosfoglicerato cinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)), e aqueles para outras enzimas glicolíticas.

Outros promotores são induzíveis porque podem ser regulados por estímulos ambientais ou pelo meio de crescimento das células. Estes promotores induzíveis incluem aqueles a partir dos genes para proteínas de choque térmico, álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas associadas com catabolismo do azoto, e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose.

Sequências reguladoras podem também ser colocadas na extremidade 3' das sequências de codificação. Estas sequências podem agir para estabilizar o RNA mensageiro. Tais terminadores são encontrados na região não transladada

3' seguindo as sequências de codificação em diversos genes derivados de levedura e mamíferos.

Vetores ilustrativos para plantas e células vegetais incluem, porém não estão limitados a, plasmídeos de *Agrobacterium Ti*, vírus mosaico da couve-flor (CaMV), e vírus mosaico dourado do tomate (TGMV).

Células mamíferas podem ser transformadas por métodos que incluem, porém não estão limitados a, transfeção na presença de fosfato de cálcio, microinjeção, eletroporação, ou por meio da transdução com vetores virais.

Métodos para introduzir sequências de ADN estranhas em genomas de planta e levedura incluem (1) métodos mecânicos, tais como microinjeção em células simples ou protoplastos, centrifugação das células com contas de vidro na presença de ADN, ou disparando tungstênio revestido por ADN ou esferas de ouro em células ou protoplastos; (2) introduzindo ADN tornando as membranas celulares permeáveis a macromoléculas por meio de tratamento com polietileno glicol ou subjeção a pulsos elétricos de alta voltagem (eletroporação); ou (3) o uso de lipossomas (contendo ADNc) que se fundem às membranas celulares.

A Publicação de Pedido de Patente U.S. N.º 2005/0019859 e Patente U.S. N.º 7.332.303 ensinam processos para a produção de proteínas da invenção, especificamente produtos de glicoproteína recombinante, por culturas de células animal ou mamíferas.

Seguindo a fase de produção de proteína do processo de cultura celular, moléculas de CTLA4Ig são recuperadas do meio de cultura celular usando técnicas entendidas por alguém versado na técnica. Em particular, a molécula de CTLA4Ig é recuperada do meio de cultura como um polipéptido secretado.

O meio de cultura é inicialmente centrifugado para remover detritos celulares e particulados. A proteína desejada subsequentemente é purificada de ADN contaminante,

proteínas solúveis, e polipéptidos, com os seguintes procedimentos de purificação não-limitantes bem-estabelecidos na técnica: SDS-PAGE; precipitação de sulfato de amónio; precipitação de etanol; fracionamento em imunoafinidade ou colunas de permuta iónica; HPLC de fase reversa; cromatografia em sílica ou em uma resina de permuta aniónica tal como QAE ou DEAE; cromatofocagem; filtração de gel usando, por exemplo, coluna SEPHADEX® G-75; e colunas de proteína A SEPHAROSE® para remover contaminantes tal como IgG. A adição de um inibidor de protease, tal como fluoreto de fenil metil sulfonilo (PMSF), ou uma mistura de cocktail inibidora de proteases também pode ser útil para inibir a degradação proteolítica durante a purificação. Um perito na especialidade reconhecerá que métodos de purificação adequados para uma proteína de interesse, por exemplo, uma glicoproteína, podem necessitar de alterações para dar origem a mudanças no carácter da proteína na expressão em cultura celular recombinante.

Técnicas de purificação e métodos que selecionam para os grupos de hidrato de carbono da glicoproteína são também de utilidade dentro do contexto da presente invenção. Por exemplo, tais técnicas incluem, HPLC ou cromatografia de permuta iónica usando resinas de permuta catónica ou aniónica, em que a fração mais básica ou mais ácida é recolhida, dependendo para que hidrato de carbono está a ser selecionado. O uso de tais técnicas também pode resultar na remoção concomitante de contaminantes.

O método de purificação pode também compreender etapas adicionais que inativam e/ou removem vírus e/ou retrovírus que podem potencialmente estar presentes no meio de cultura celular de linhas celulares mamíferas. Um número significativo de etapas de depuração viral está disponível, incluindo porém não limitadas a, tratamento com caotopos tal como ureia ou guanidina, detergentes, etapas adicionais

de ultrafiltração/diafiltração, separação convencional, tal como cromatografia de permuta iônica ou por exclusão de tamanho, estremos de pH, aquecimento, proteases, solventes orgânicos ou qualquer combinação dos mesmos.

A molécula de CTLA4Ig purificada requer concentração e uma mudança de tampão antes do armazenamento ou outro processamento. Um sistema Pall Filtron TFF pode ser usado para concentrar e mudar o tampão de eluição da coluna de purificação anterior com o tampão final desejado para a substância de fármaco.

Num aspeto, moléculas de CTLA4Ig purificadas, que foram concentradas e submetidas à etapa de diafiltração, podem ser introduzidas em frascos BIOTAINER® de 2 l, bolsa de bioprocesso de 50 l ou qualquer outro recipiente adequado. Moléculas de CTLA4Ig em tais recipientes podem ser armazenadas durante cerca de 60 dias a 2° a 8 °C antes da congelação. O armazenamento prolongado de moléculas purificadas de CTLA4Ig a 2° a 8 °C pode levar aum aumento na proporção de espécies de HMW. Portanto, para armazenamento a longo prazo, moléculas de CTLA4Ig podem ser congeladas a cerca de -70 °C antes da armazenamento e armazenadas em uma temperatura de cerca de -40 °C. A temperatura de congelamento pode variar de cerca de -50 °C a cerca de -90 °C. O tempo de congelamento pode variar e depende amplamente do volume do recipiente que contém moléculas de CTLA4Ig, e o número de recipientes que são carregados no congelador. Por exemplo, numa forma de realização, as moléculas de CTLA4Ig encontram-se em frascos BIOTAINER® de 2 l. O carregamento de menos do que quatro frascos BIOTAINER® de 2 l no congelador, pode necessitar de cerca de 14 a pelo menos 18 horas de tempo de congelação. O carregamento de pelo menos quatro frascos pode necessitar de cerca de 18 a pelo menos 24 horas de congelamento. Vasos com moléculas congeladas de CTLA4Ig são armazenados em uma temperatura de cerca de -35 °C a cerca de -55 °C. O tempo

de armazenamento a uma temperatura de cerca de -35 °C a cerca de -55 °C pode variar e pode ser tão curto quanto 18 horas. A substância de fármaco congelada pode ser descongelada de uma maneira controlada para a formulação do produto de fármaco.

O Pedido de Patente U.S. copendente com Número de Série 60/752.267, depositado em 20 de dezembro de 2005 e o PCT/US 2006/049074 depositado em 19 de dezembro de 2006 ensinam processos para a produção de proteínas da invenção, especificamente produtos de glicoproteína recombinantes, através de culturas de células animal ou mamíferas.

Composição Farmacêutica

A presente invenção utiliza composições farmacêuticas compreendendo as moléculas de CTLA4Ig misturadas com um veículo aceitável ou adjuvante que é conhecido por aqueles peritos na especialidade. As composições farmacêuticas preferivelmente incluem veículos e adjuvantes adequados que incluem qualquer material que quando combinado com a molécula de CTLA4Ig retém a atividade da molécula e não é reativo com o sistema imunitário do indivíduo. Estes veículos e adjuvantes incluem, porém não estão limitados a, permutadores iões, alumina, estearato de alumínio, lecitina, proteínas de soro, tais como albumina de soro humano, substâncias de tampão tais como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas de glicerídeo parciais de ácidos gordos vegetais saturados, solução salina tamponada por fosfato, água, emulsões (por exemplo, emulsão de óleo/água), sais ou eletrólitos tais como sulfato de protamina, fosfato de hidrogénio de sódio, fosfato de hidrogénio de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinil pirrolidona, substâncias com base em celulose e polietilenoglicol. Outros veículos podem também incluir soluções estéreis; comprimidos, incluindo comprimidos e cápsulas revestidos. Tipicamente tais veículos contêm

excipientes tais como amido, leite, açúcar (por exemplo, sacarose, glicose, maltose), certos tipos de argila, gelatina, ácido esteárico ou sais dos mesmos, estearato de magnésio ou cálcio, talco, gorduras ou óleos vegetais, gomas, glicóis, ou outros excipientes conhecidos. Tais veículos podem também incluir aditivos de sabor e de cor ou outros ingredientes. Composições compreendendo tais veículos são formuladas por métodos convencionais bem conhecidos. Tais composições podem também ser formuladas dentro de várias composições lipídicas, tais como, por exemplo, lipossomas bem como em várias composições poliméricas, tais como microesferas polímeras.

Formulações compreendendo moléculas de CTLA4 solúveis são descritas no Pedido de Patente Provisório U.S. copendente com Número de Série 60/752.150 depositado em 20 de dezembro de 2005 e PCT/US2006/062297 depositado em 19 de dezembro de 2006. Como descrito no Pedido de Patente Provisório U.S. copendente com Número de Série 60/752.150, moléculas de CTLA4 solúveis podem ser formuladas para aplicações IV e subcutâneas. Em síntese, uma formulação subcutânea (SC) adequada compreende moléculas de CTLA4Ig numa concentração de proteína de pelo menos 100 mg/ml em combinação com um açúcar em níveis estabilizantes num veículo aquoso.

Um exemplo de um produto de fármaco CTLA4Ig SC que é distribuído por meio de uma seringa pré-carregada é fornecido no quadro 3 abaixo.

QUADRO 3

Composição de Produto de Fármaco de CTLA4Ig SC, 125 mg/ml (125 mg/seringa)	
Componente	Quantidade (mg/seringa)
CTLA4Ig	125
Sacarose	170
Poloxâmero 188	8,0

Composição de Produto de Fármaco de CTLA4Ig SC, 125 mg/ml (125 mg/seringa)	
Componente	Quantidade (mg/seringa)
Monohidrato monobásico de fosfato de sódio	0,143
Anidro dibásico de fosfato de sódio	0,971
Água para Injeção	q.s. a 1 ml

Os exemplos I e II da presente memória descritiva descrevem a fabricação de uma formulação intravenosa (IV) e subcutânea de CTLA4Ig útil nos métodos da invenção. Um exemplo da formulação liofilizada de CTLA4Ig utilizada no método de acordo com a invenção descrita no exemplo III é listado abaixo.

QUADRO 4

Composição de Produto de Fármaco de CTLA4Ig Liofilizado (250 mg/frasco)	
Componente	Quantidade (mg/frasco) ^a
CTLA4Ig	262,5
Monohidrato de maltose	525
Monohidrato monobásico de fosfato de sódio ^b	18,1
Cloreto de sódio ^b	15,3
Ácido clorídrico	Ajustar para 7,5
Hidróxido de sódio	Ajustar para 7,5
^a Inclui uma carga de 5% por frasco, agulha, perda de seringa.	
^b Estes componentes estão presente na substância de fármaco de solução de CTLA4Ig.	

O produto de fármaco liofilizado pode ser constituído com um veículo aquoso. O veículo aquoso de interesse no presente documento é aquele que é farmacêuticamente

aceitável (seguro e não tóxico para administração a um ser humano) e é útil para a preparação de uma formulação líquida, após liofilização. Tipicamente, o produto de fármaco liofilizado é constituído até cerca de 25 mg/ml com 10 ml de água estéril para injeção, USP (SWFI) ou injeção de cloreto de sódio a 0,9%, USP. A solução constituída é também diluída para concentrações do produto de fármaco entre 1 e 10 mg/ml com injeção de cloreto de sódio a 0,9%, USP. O produto de fármaco diluído para injeção é isotónico e adequado para administração por infusão intravenosa.

Artigo de Fabrico

Adicionalmente, é descrito um artigo de fabrico que contém o produto de fármaco e preferivelmente fornece instruções para seu uso. O artigo de fabrico compreende um recipiente. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas e tubos de ensaio. O recipiente pode ser formado por uma variedade de materiais tais como vidro, plástico ou metais.

O recipiente retém as formulações liofilizadas ou líquidas. O rótulo sobre, ou associado com, o recipiente pode indicar orientações para reconstituição e/ou uso. Por exemplo, o rótulo pode indicar que os 250 mg/frasco de produto de fármaco devem ser reconstituídos até concentrações de proteína como descrito acima. O rótulo pode também indicar que a formulação SC é útil ou destinada à administração subcutânea. O recipiente contendo a formulação pode ser um frasco de múltiplos usos, que permite administrações repetidas (por exemplo, de 2 a 6 administrações) de, por exemplo, a formulação subcutânea. Alternativamente, o recipiente pode ser uma seringa pré-carregada contendo, por exemplo, a formulação subcutânea.

O artigo de fabrico pode também compreender um segundo recipiente compreendendo, por exemplo, um veículo adequado para a formulação liofilizada.

O artigo de fabrico pode também incluir outros

materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e suplementos de embalagem com instruções para uso.

Seringas livres de silicone são preferivelmente utilizadas para produtos de fármaco livres de tensioativos, tal como na reconstituição de produto de fármaco liofilizado e/ou transferência das soluções do frasco para a bolsa intravenosa e podem ser coembalados com o frasco de produto de fármaco.

Métodos de Uso

A presente invenção fornece uma molécula de CTLA4Ig ou composição farmacêutica da mesma para utilização num método de tratamento de indivíduos com UA compreendendo administrar ao indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz da molécula de CTLA4Ig ou composição farmacêutica da mesma.

A administração de uma quantidade eficaz da molécula de CTLA4Ig ou composição farmacêutica é, em particular, para aliviar o indivíduo de pelo menos um dos sintomas associados com a doença, incluindo reduzir: inchaço articular, sensibilidade articular, inflamação, rigidez matinal, e dor, e dano estrutural subsequentemente diminuindo a incapacidade física.

Os métodos da invenção também podem ser usados para melhorar a função física de indivíduos com UA como avaliado pelo *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) e/ou o instrumento de qualidade de vida relacionada com a saúde (SF-36).

Os métodos da invenção também podem ser usados para inibir o dano estrutural das articulações em indivíduos com UA como avaliado pela pontuação de erosão e edema da medula óssea e/ou classificação de sinovite do pulso e mão.

A quantidade de alívio de sintomas fornecida pela presente invenção pode ser medida usando qualquer um dos

critérios aceites estabelecidos para medir e documentar o alívio de sintomas num cenário clínico. Critérios aceitáveis para medir o alívio de sintomas podem incluir pontuações baseadas nos critérios estabelecidos pelo *American College of Rheumatology* (por exemplo, ACR 20), as quatro medidas de alívio de sintomas (em: "CDER Guideline for the Clinical Evaluation of Anti-Inflammatory and Antirheumatic Drugs—FDA 1988"), e o *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) (Fries, J.F. et al., *J. Rheumatology*, 9:789-793 (1982)). Para uma descrição geral destes critérios, veja-se *Guidance for Industry: Clinical Development Programs for Drugs, Devices, and Biological products for the Treatment of Rheumatoid Arthritis (RA)* (fevereiro de 1999).

A presente invenção fornece vários métodos, locais ou sistémicos, para administrar a molécula de CTLA4Ig sozinha ou em conjunto com outros fármacos terapêuticos. Os métodos incluem métodos intravenosos, intramusculares, intraperitoneais, orais, inalação e subcutâneos, bem como métodos de bomba implantável, infusão contínua, terapêutica génica, lipossomas, supositórios, contato tópico, vesículas, cápsulas e injeção. O CTLA4Ig, composto com um veículo, é comumente liofilizado para armazenamento e é reconstituído com água ou uma solução tamponada antes da administração. Como é prática padrão na técnica, as composições da invenção podem ser administradas ao indivíduo em qualquer forma farmacêuticamente aceitável.

O modo de administração mais eficaz e regime de dosagem para as formulações desta invenção dependem da saúde do paciente e resposta ao tratamento e o diagnóstico do médico assistente. De acordo com a prática da invenção, uma quantidade eficaz para tratar um indivíduo é uma quantidade de cerca de 0,1 a 100 mg/kg de peso de um indivíduo. Noutra forma de realização, a quantidade eficaz é uma quantidade de cerca de 0,1 a 20 mg/kg de peso de um

indivíduo, preferivelmente 1 a 10 mg/kg de peso de um indivíduo. Em uma forma de realização específica, a quantidade eficaz de CTLA4Ig é cerca de 2 mg/kg de peso de um indivíduo. Em outra forma de realização específica, a quantidade eficaz de CTLA4Ig é cerca de 10 mg/kg de peso de um indivíduo. Noutra forma de realização específica, uma quantidade eficaz de CTLA4Ig é 500 mg para um indivíduo pesando menos do que 60 kg, 750 mg para um indivíduo pesando entre 60-100 kg e 1000 mg para um indivíduo pesando mais do que 100 kg.

As formulações de molécula de CTLA4Ig da invenção podem ser administradas a um indivíduo numa quantidade e durante um tempo (por exemplo, período de tempo e/ou tempos múltiplos) suficiente para bloquear as moléculas B7 endógenas (por exemplo, CD80 e/ou CD86) de ligarem-se aos seus ligandos respetivos, no indivíduo. O bloqueio de ligação de B7 endógena/ligando desse modo inibe as interações entre células positivas de B7 (por exemplo, células positivas de CD80 e/ou CD86) com células positivas de CD28 e/ou CTLA4. Consequentemente, as dosagens dos agentes podem variar dependendo do indivíduo e do modo de administração. As Publicações de Pedido de Patente U.S. N.^{os}. 2003/0083246 e 2004/0022787 ensinam planos de dosagem e administração para CTLA4Ig tendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:2 para tratar doenças reumáticas, tal como artrite reumatoide. Uma quantidade eficaz de molécula de CTLA4Ig pode ser administrada a um indivíduo diariamente, semanalmente, mensalmente e/ou anualmente, em tempos únicos ou múltiplos por hora/dia/semana/mês/ano, dependendo da necessidade. Por exemplo, numa *forma de realização*, uma quantidade eficaz da molécula de CTLA4Ig pode inicialmente ser administrada uma vez a cada duas semanas durante um mês, e em seguida uma vez a cada mês depois disso ou dias 1, 15, 29 e mensalmente depois disso. Uma janela de +/- 3 dias é permitida para

doses mais precoces (isto é, dias 15 e 29). Uma janela de ± 7 dias é permitida para as doses mensais posteriores.

Alternativamente, um perito na especialidade seria capaz de modificar o regime de administração em resposta ao estado de risco dos pacientes e/ou resposta à terapêutica. Por exemplo, o regime descrito acima pode ser modificado adicionando-se o dia 5 de administração ao regime.

Conforme utilizado no presente documento, "quatro semanas," "mês", "meses" ou "mensalmente" refere-se a um período de 28 ± 7 dias.

Tipicamente, doses da formulação de molécula de CTLA4Ig da invenção são baseadas no peso corporal, e os regimes de administração podem ser ditados pelos perfis séricos mínimos alvo. Tipicamente, a concentração sérica mínima alvo de moléculas de CTLA4Ig da invenção entre cerca de 3 $\mu\text{g/ml}$ e cerca de 35 $\mu\text{g/ml}$ será suficiente para tratar UA ou prevenir o desenvolvimento de RA em indivíduos com UA, preferivelmente entre cerca de 5 $\mu\text{g/ml}$ e cerca de 30 $\mu\text{g/ml}$, mais preferivelmente entre cerca de 10 $\mu\text{g/ml}$ e cerca de 30 $\mu\text{g/ml}$. Um perito na especialidade seria capaz de ajustar o plano de dosagem e/ou administração de CTLA4Ig para obter as concentrações séricas mínimas desejadas.

A administração das moléculas ou composições farmacêuticas da invenção pode ser por meio de uma infusão intravenosa de 30 minutos a uma ou mais horas. Alternativamente, injeções subcutâneas únicas a múltiplas podem libertar a dosagem necessária.

As moléculas de CTLA4Ig da invenção podem ser administradas concomitantemente ou sequencialmente em conjunção com outra terapêutica imunossupressiva/imunomoduladora, por exemplo, conforme especificado no presente documento, dosagens do composto imunossupressor, ou imunomodulador coadministrado de facto variarão dependendo do tipo de co-fármaco empregue.

Fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs)

podem ser administrados concomitantemente ou sequencialmente em conjunto com a molécula de CTLA4Ig da invenção. AINEs reduzem as reações inflamatórias num indivíduo. AINEs incluem, porém não são limitados a, ácido acetil salicílico, salicilato de magnésio de colina, diflunisal, salicilato de magnésio, salsalato, salicilato de sódio, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, cetoprofeno, cetorolaco, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tolmetina, acetaminofeno, ibuprofeno, inibidores de Cox-2, meloxicam e tramadol.

Corticosteroides podem ser administrados concomitantemente ou sequencialmente em conjunto com a molécula de CTLA4Ig da invenção. Por exemplo, corticosteroide oral de dose baixa estável (equivalente a ≤ 10 mg de prednisona diariamente), ou corticosteroides de dose alta administrados a cada seis meses como um curso oral (equivalente a 20 mg/dia de prednisona diariamente durante um máximo de duas semanas), ou uma única dose IM (intramuscular) ou uma única dose IA (intra-articular).

Exemplos de corticosteroides incluem, porém não são limitados a, betametasona, budesonida, cortisol, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona e triancinolona.

Tipicamente, as dosagens padrão e o regime de administração dos fármacos coadministrados descritos acima não são influenciados pela adição das moléculas de CTLA4Ig da invenção ao regime de tratamento. Entretanto, um perito na especialidade pode prescrever doses menores dos fármacos coadministrados devido à incorporação das moléculas de CTLA4Ig menos tóxicas da invenção no regime de tratamento. Informação da prescrição pode ser baseada no folheto informativo para cada fármaco coadministrado.

Como descrito previamente, a destruição da articulação ocorre precocemente na RA. Este discernimento realçou a

necessidade de terapêuticas que podem fundamentalmente alterar e não meramente suprimir os processos inflamatórios que causam sintomas debilitantes e dano estrutural precocemente no decorrer de RA. Consequentemente, isto tem colocado ênfase crescente no diagnóstico e tratamento mais precoce da RA. No entanto, os critérios de ARA de 1987 para RA são menos sensíveis e específicos quando aplicados a indivíduos com artrite inflamatória precoce e estes indivíduos são em seguida diagnosticados com artrite não diferenciada, um problema clínico comum.

Foi recentemente demonstrado que indivíduos com UA que são também positivos para anticorpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP2 positivos) estão em risco elevado de desenvolvimento de RA imediatamente após um ano depois da observação (Van Gaalen, F.A. et al., "Autoantibodies to Cyclic Citrullinated Peptides Predict Progression to Rheumatoid Arthritis in Patients with Undifferentiated Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 50(3):709-715 (2004)). Um teste positivo quanto à presença de anticorpos séricos contra péptidos citrulinados cíclicos tem um maior valor preditivo para o desenvolvimento de RA do que critérios mais tradicionais, tal como a presença ou ausência de fator reumatoide. 83% dos indivíduos com UA que foram positivos para anticorpos anti-CCP desenvolveram RA no espaço de um ano, em comparação com 18% de controles negativos anti-CCP. Esta descoberta sugere que uma subpopulação de indivíduos com UA pode ser facilmente identificada a qual estará em risco elevado para desenvolvimento de RA e a qual portanto seria candidata ideal para terapêutica direcionada dirigida aos mecanismos subjacentes que impulsionam inflamação e destruição da articulação na RA. Um tal método pode prevenir o desenvolvimento de dano articular, incapacidade funcional e qualidade de vida prejudicada subsequente que infelizmente caracteriza a história natural da RA.

Os exemplos III e IV descrevem um estudo clínico concebido para comparar a eficácia de CTLA4Ig com placebo na prevenção do desenvolvimento da RA em indivíduos com artrite não diferenciada de início recente que estão em risco elevado de desenvolvimento de RA.

O ensaio clínico é um estudo de projeto paralelo de duas direções, controlado com placebo, duplamente-cego, randomizado de duração de 12 meses até à finalidade primária e 24 meses até à finalidade secundária. Indivíduos são randomizados 1:1 para receber CTLA4Ig ou placebo durante os primeiros seis meses do estudo. A randomização é estratificada em dois grupos baseados na presença ou ausência de erosões.

Os indivíduos neste estudo foram cuidadosamente avaliados para assegurar que tinham UA de início recente (isto é, presença de sintomas de artrite durante < 18 meses), foram positivos para anticorpos anti-CCP2, não alcançaram os critérios diagnósticos para qualquer outra doença reumática, e não tinham recebido mais tratamento com DMARDs durante mais do que 2 semanas ou qualquer fármaco biológico indicado para RA. O estudo foi concebido para investigar se um período de tratamento de 6 meses, relativamente curto com monoterapêutica de CTLA4Ig preveniu a progressão para RA dentro de 1 ano ou 2 anos após o início do tratamento. Além disso, os efeitos de CTLA4Ig sobre a atividade da doença, função física, qualidade de vida relacionada à saúde, e atividade de biomarcador de PD em indivíduos com UA foram explorados e comparados ao placebo tanto durante o período de tratamento de 6 meses e até 18 meses após a última dose de medicação de estudo. A inclusão de um período de observação sem tratamento de 18 meses após a última dose de medicação de estudo permitiu a avaliação da persistência de quaisquer efeitos observados do tratamento com CTLA4Ig. A utilização de AINEs e corticosteroides orais de dose baixa estáveis (<10 mg/dia

de prednisona ou equivalente), bem como o uso limitado de terapêutica com corticosteroide de dose alta, foram permitidos durante ambos os períodos de tratamento e observação. Indivíduos que desenvolveram RA em qualquer momento foram descontinuados do estudo e puderam receber cuidados padrão.

Por causa de critérios de envolvimento estritos, que limitaram a randomização a 57 indivíduos (56 dos quais foram tratados), a testagem de hipótese estatística formal não foi feita. Os resultados deste estudo foram, no entanto, geralmente consistentes através de medidas de resultado múltiplas de eficácia (clínica, radiológica, MRI e atividade de biomarcador) em favor de CTLA4Ig sobre o placebo, e fornecem evidência de que CTLA4Ig, administrado IV mensalmente numa dose de 10 mg/kg com base no peso corporal durante 6 meses, diminui a progressão de UA para RA. O benefício terapêutico de CTLA4Ig pareceu persistir até 18 meses após a descontinuação do fármaco.

A proporção de indivíduos que desenvolveram RA no mês 12 foi menor para o grupo que recebeu CTLA4Ig (12/27, 46,2%) do que para o grupo de placebo (16/24, 66,7%) (20,5% de diferença de tratamento; IC de 95%: -47,4%, +7,8%). No mês 24, 87,5% (12/24) de indivíduos com UA tinham desenvolvido RA no grupo de placebo em comparação com 73,9% (17/23) de indivíduos que tinham recebido um curso de 6 meses de tratamento com CTLA4Ig (13,6% de diferença de tratamento; IC de 95%: -37,6%, +10,8%). A dose de 10 mg/kg ligada ao peso de CTLA4Ig usada neste estudo de indivíduos com UA é análoga à dosagem de 10 mg/kg aprovada para o tratamento de RA em adultos.

Nesta população de indivíduos com UA, o tratamento com CTLA4Ig melhorou a função física e a atividade da doença relatada pelo médico. No mês 6, mais do que duas vezes como muitos indivíduos tratados com CTLA4Ig em comparação com o placebo tinham obtido uma melhoria clinicamente

significativa na função física (HAQ-DI) (62% contra 24%) ou tinham remissão da doença como indicado por uma pontuação de DAS-28 (CRP) de $< 2,6$ (71% contra 35%). As melhorias numericamente maiores em ILAQ-DI e DAS 28 (CRP) observadas no final do período de tratamento de estudo com CTLA4Ig foram ainda evidentes após 6 e 18 meses de seguimento sem tratamento, embora as diferenças de grupo de tratamento com placebo fossem menores nos meses 12 e 24. As avaliações radiográficas usando imagens de MR realçadas por gadolínio da mão e pulso e radiografias convencionais das mãos e pés, indicaram mínima progressão da doença durante o período de tratamento com o fármaco do estudo entre os indivíduos recebendo CTLA4Ig.

Notavelmente, após 6 meses de tratamento com CTLA4Ig, os níveis séricos de anticorpos anti-CCP2 foram reduzidos, e esta redução foi ainda evidente após 6 meses sem nenhum tratamento com fármaco de estudo. Por comparação, os níveis de anticorpos anti-CCP2 foram aumentados no grupo de placebo. Os anticorpos anti-CCP2 são altamente preditivos do desenvolvimento futuro de RA em ambos indivíduos saudáveis e pacientes com artrite não diferenciada.

Uma abordagem conservadora para tratamento de UA precoce foi defendida, limitando a utilização de DMARDs e subsequentemente, biológicas para apenas aqueles pacientes cujos sintomas e sinais de artrite são refratários a AINEs e corticosteroides de dose baixa. Neste estudo de 56 indivíduos com UA, CTLA4Ig foi bem tolerado por indivíduos com doença em estágio muito precoce. Durante o período de tratamento de estudo de 6 meses, AEs foram relatadas em taxas semelhantes para os grupos de CTLA4Ig e placebo, nenhuma AE resultou em morte, e igualmente, números baixos de indivíduos em ambos grupos de tratamento tinham uma SAE (1 em cada grupo de tratamento) ou foram descontinuados devido a uma AE (1 em cada grupo de tratamento). Além disso, não existiu nenhuma evidência para um maior risco de

infecções com CTLA4Ig, e AEs infusionais ocorrendo dentro de 1 hora do início de infusão de CTLA4Ig foram relatadas para apenas 1 indivíduo. Os dados de laboratório clínicos para hematologia e bioquímicas foram geralmente não notáveis e nenhum problemas de segurança foi identificado. Quatro (4) indivíduos tornaram-se seropositivos para anticorpos anti-CTLA4-T no mês 12, 2 dos quais testados foram positivos para anticorpos neutralizantes. O desenvolvimento de anticorpos não pareceu estar correlacionado com ocorrências de segurança clínica.

Os inventores descobriram que a administração de CTLA4Ig retardou a progressão para RA definitiva em pacientes com UA. Adicionalmente, os efeitos de modificação de doença do tratamento com CTLA4Ig foram mantidos durante 6 meses após a terapêutica ser interrompida.

A invenção será mais totalmente entendida com referência aos seguintes exemplos. Eles não devem, no entanto, ser construídos como limitantes do âmbito da invenção que é definida pelas reivindicações.

EXEMPLO I

O produto de fármaco liofilizado (250 mg/frasco) de CTLA4Ig é um liófilo não pirogênico, estéril adequado para administração intravenosa (IV). Cada frasco de utilização única contém 250 mg de CTLA4Ig que é constituído com água estéril para injeção, USP e também diluído com injeção de cloreto de sódio a 0,9%, USP, no momento da utilização.

A fórmula de lote para um tamanho de lote de 115 litros é descrita no quadro 5 abaixo.

QUADRO 5

Fórmula de Lote	
Componente	Quantidade (kg)
Substância de fármaco de CTLA4Ig ^a	4,6
Monohidrato de maltose	9,2
Ácido clorídrico	Ajustar para pH 7,5

Hidróxido de sódio	Ajustar para pH 7,5
Água para Injeção	q.s. a 119,6 ^b
^a Substância de fármaco de CTLA4Ig: concentração proteica 50 mg/ml, fosfato de sódio a 25 mM, cloreto de sódio a 50 mM, pH de 7,5, <5% de espécies de HMW. ^b Densidade de solução de volume formulado = aprox. 1,04 g/ml.	

A quantidade necessária de substância de fármaco de CTLA4Ig é adicionada a um recipiente de composição de aço inoxidável limpo e esterilizado equipado com um misturador. A solução de substância de fármaco é misturada a 250 ± 50 rpm ao mesmo tempo que se mantém a temperatura da solução entre 5°-25 °C.

A quantidade necessária de pó de monohidrato de maltose é adicionada ao recipiente de composição. A solução é misturada durante um mínimo de 10 minutos a 15°- 25 °C.

O pH da solução é ajustado a 7,3 - 7,7, se necessário usando a anteriormente preparada solução de hidróxido de sódio a 1 N ou solução de ácido clorídrico a 1 N. O lote é trazido para o peso de lote final (q.s. final) usando água para Injeção, USP, e misturado durante um mínimo de 8 minutos. A solução de volume formulada é amostrada quanto ao pH.

A solução de volume formulada é pré-filtrada com um filtro de 0,45 µm. A solução de volume formulado após filtro de 0,45 µm é amostrada quanto à biocarga e endotoxinas bacterianas (BET).

A solução de volume formulada pré-filtrada é esterilizada por filtração com dois filtros de 0,22 µm em séries antes do carregamento.

A solução de volume formulada esterilizada por filtração é carregada e parcialmente encerrada com um tampão de butilo cinza Daikyo de 20 nm por uma máquina de carregamento/tamponamento totalmente automática. Os frascos

de vidro de tubo de sílex Tipo I de 15-cc são lavados e esterilizados/despirogenados.

Os frascos de produto de fármaco carregados e parcialmente tamponados são liofilizados. Um resumo do ciclo de secagem por congelação usado durante a liofilização do produto de fármaco de CTLA4Ig é fornecido no quadro 6 abaixo.

QUADRO 6

Ciclo de Congelação Seca para Produto de Fármaco Liofilizado de CTLA4Ig	
Parâmetro do processo	Controlo durante o processo
Temperatura de Carga	5 ± 3 °C
Congelação (Rampa de Prateleira)	De 5 °C a -45 °C em 2,5 horas
Congelação	Manter a -45 ± 3 °C durante 4 horas
Secagem Primária (Rampa de Prateleira)	De -45 °C a -19 °C em 2 horas
Secagem Primária (Vácuo)	100 ± 20 micra
Secagem Primária	Manter a -19 ± 2 °C durante 84 horas
Secagem intermediária (Rampa de Prateleira)	De -19 °C a 0 °C em 2 horas
Secagem intermediária	Manter a 0 ± 3 °C durante 8 horas
Secagem secundária (Rampa de Prateleira)	De 0 °C a 30 °C em 2,5 horas
Secagem secundária (Vácuo)	100 ± 20 micra
Secagem secundária	Manter a 30 °C durante 12 horas
Tamponamento	30 ± 3 °C
Tamponamento (Vácuo)	500 ± 100 micra
Armazenamento Antes do Descarregamento	Manter a 20 ± 3 °C durante pelo menos 4 horas

No final do ciclo de liofilização, a pressão da câmara é elevada para 500 micra usando azoto esterilizado por filtração e o tamponamento dos frascos é realizado sob vácuo. Os frascos tamponados permanecem dentro do liofilizador durante pelo menos 4 horas. Os frascos liofilizados e tamponados são selados com um selo branco destacável, de alumínio de 20-mm sob ar filtrado por HEPA pela máquina de tamponamento. Os frascos selados são enxaguados com água desionizada por uma lavadora de frascos exterior. Os frascos de produto de fármaco lavados são armazenados a 2 a 8 °C.

A composição de produto de fármaco de CTLA4Ig liofilizado (250 mg/frasco) é listada no quadro 7 abaixo.

QUADRO 7

Composição de Produto de Fármaco de CTLA4Ig Liofilizado (250 mg/frasco)	
Componente	Quantidade (mg/frasco) ^b
CTLA4Ig	262,5
Monohidrato de maltose	525
Monohidrato monobásico de fosfato de sódio ^b	18,1
Cloreto de sódio ^b	15,3
Ácido clorídrico	Ajustar para 7,5
Hidróxido de sódio	Ajustar para 7,5
^a Inclui uma carga de 5% por frasco, agulha, perda de seringa.	
^b Estes componentes estão presentes na solução de substância de fármaco de CTLA4Ig.	

EXEMPLO II

O produto de fármaco de CTLA4Ig SC, 125 mg/ml (125 mg/frasco) é formulado como uma solução pronta para utilização, não pirogênica, estéril para administração subcutânea. Um lote de produto de fármaco de CTLA4Ig SC,

125 mg/ml (125 mg/frasco) é fabricado em escala de 5 l (3.500 frascos). A fórmula de lote é descrita no quadro 8 abaixo.

QUADRO 8

Fórmula de Lote	
Componente	Quantidade (gm)
Substância de fármaco de CTLA4Ig ^a	625
Sacarose	850
Poloxâmoro 188	40
Monohidrato monobásico de fosfato de sódio	0,715
Anidro dibásico de fosfato de sódio	4,86
Água para Injeção	q.s. para 5,0 l
Tamanho de Lote Total (l)	5,0
^a Substância de fármaco de CTLA4Ig: concentração de proteína 50 mg/ml, fosfato de sódio a 25 mM, cloreto de sódio a 50 mM, pH de 7,5, <5% espécies de HMW.	

Como descrito acima no exemplo I, o processo de fabrico para produto de fármaco de CTLA4Ig SC, 125 mg/ml (125 mg/frasco) envolve a mudança de tampão da substância de fármaco de volume de fosfato de sódio a 25 mM, cloreto de sódio a 50 mM num pH de 7,5 para tampão de fosfato de sódio a 10 mM de pH 7,8, seguido pela concentração da proteína desde ~ 50 mg/ml até ~150 mg/ml por remoção de tampão. Sacarose e Poloxâmoro 188 são então dissolvidos na solução de proteína concentrada e o peso de lote final é ajustado com tampão de fosfato de sódio a 10 mM, pH 7.8. A solução de volume é filtrada por meio de filtro esterilizante de 0,22 micra e carregada em frascos de vidro de sílex Tipo I de 5-cc esterilizados e despirogenados, tamponados com tampões de borracha de 20 mm e selados com selos destacáveis de alumínio de 20 mm.

A composição de produto de fármaco de CTLA4Ig SC, 125 mg/ml (125 mg/frasco) é fornecida no quadro 9 abaixo.

QUADRO 9

Composição de Produto de Fármaco de CTLA4Ig SC, 125 mg/ml (125 mg/frasco).	
Componente	Quantidade (mg/frasco) ^c
CTLA4Ig	175
Sacarose	238
Poloxâmero 188	11.2
Monohidrato monobásico de fosfato de sódio	0.20
Anidro dibásico de fosfato de sódio	1,36
Água para injeção	q.s. para 1,4 ml
^c Inclui 40% de carga por frasco, agulha, perda da seringa.	

EXEMPLO III

A artrite reumatoide (RA) é um distúrbio autoimune que pode levar à destruição progressiva da articulação, deformidade, incapacidade física significativa, e baixa qualidade de vida. Nenhuma terapêutica foi demonstrada como prevenindo o desenvolvimento de RA. Este estudo comparará a eficácia de CTLA4Ig com placebo em prevenir o desenvolvimento de RA em indivíduos com artrite de início recente não diferenciada (UA) que estão em alto risco de desenvolvimento de RA durante o período do estudo.

Objetivo Primário

Avaliar a proporção de indivíduos com UA que desenvolvem RA como definido pelos critérios ARA de 1987 um ano após o início da medicação de estudo cego.

Objetivos Secundários

- 1) Avaliar a proporção de indivíduos com UA que desenvolvem RA como definido pelos critérios ARA de 1987 dois anos após o início da medicação de estudo

cego.

2) Avaliar o grau de sinovite e dano estrutural da articulação das mãos (articulações cárpicas, MCP e PIP) em 6, 12, e 24 meses após o início da terapêutica de estudo entre os dois grupos de tratamento usando produção de imagem por MRI.

3) Avaliar a proporção de indivíduos com sinovite clínica sintomática persistente em 6, 12, e 24 meses após o início de medicação entre os dois grupos de tratamento.

4) Avaliar o efeito farmacodinâmico de CTLA4Ig nos níveis séricos de autoanticorpos [fator reumatoide de IgM e péptido citrulinado anticíclico (anti-CCP2)].

5) Avaliar a atividade de doença em tempo prolongado entre os grupos de tratamento usando os valores médios da classificação de DAS (CRP) total.

6) Avaliar a proporção de indivíduos com uma classificação de DAS total de $<1,6$ a 6, 12, e 24 meses.

7) Avaliar a função física e qualidade de vida relacionada com a saúde usando o *Disability Index* de HAQ (HAQ) e os instrumentos SF-36, respetivamente.

8) Avaliar a segurança de CTLA4Ig nesta população de estudo, incluindo avaliação da imunogenicidade de CTLA4Ig seguindo conclusão de um curso de seis meses de tratamento.

Objetivo Terciário

1) Avaliar mudanças em componentes de núcleo da variável de compósito de ACR RA (*American College of Rheumatology Rheumatoid Arthritis*) em tempo prolongado entre os dois grupos de tratamento.

Projeto de estudo

Este é um estudo de projeto paralelo de duas direções, controlado por placebo, duplo cego, randomizado de 12 meses de duração para a finalidade primária e 24 meses para a

finalidade secundária. Indivíduos serão randomizados 1:1 para receber CTLA4Ig ou placebo durante os primeiros seis meses do estudo. Randomização será estratificada em dois grupos baseados na presença ou ausência de erosões (centralmente lido). Será permitido aos indivíduos tomar fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) ao longo do estudo. Será permitido aos indivíduos tomar um corticosteroide oral de baixa dose estável (equivalente a ≤ 10 mg de prednisona diariamente) ao longo do estudo. Até duas das seguintes medicações concomitantes de corticosteroide de alta dose podem ser utilizadas a cada seis meses: ensaio na descrição do investigador: curso oral (equivalente a 20 mg/dia de prednisona diariamente durante um máximo de duas semanas), ou uma dose IM única ou uma dose IA única. Indivíduos com artrite persistente após seis meses de medicação do estudo mas que não cumprem os critérios para RA serão observados fora da medicação do estudo e ser-lhes-á permitido tomar as medicações concomitantes descritas acima na descrição do investigador. Nenhuma dosagem subsequente com medicação de estudo será permitida.

Indivíduos que desenvolvam a finalidade primária (RA pelos critérios de ARA) em qualquer ponto durante o ensaio serão descontinuados do estudo e permitidos receber terapêutica antirreumática na descrição do investigador, incluindo terapêutica de DMARDs e/ou biológica.

Os indivíduos serão inicialmente administrados com doses com base no seu peso na visita de avaliação. Indivíduos pesando < 60 kg receberão 500 mg; indivíduos pesando entre 60 a 100 kg receberão 750 mg, e indivíduos pesando > 100 kg receberão 1 grama. CTLA4Ig serão administrados nos dias 1, 15, 29 e a cada 28 dias depois disso até um total de 8 doses. Será permitido ao indivíduo tomar um corticosteroide oral de baixas doses estável (equivalente a ≤ 10 mg de prednisona diariamente) ao longo

do estudo.

Indivíduos que foram diagnosticados com artrite inflamatória não diferenciada serão avaliados no período de avaliação para a presença ou ausência de anticorpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP2). Indivíduos que têm um teste anti-CCP2 positivo serão estratificados com base na presença ou ausência de erosões e randomizados no Período de Tratamento de Fármaco de Estudo. O Período de Tratamento de Fármaco de Estudo será de seis meses de tratamento com CTLA4Ig ou placebo. Indivíduos completando o período de tratamento que não cumprem os critérios para RA serão observados fora da medicação do estudo no Período de Observação com o cego mantido. O Período de Observação consistirá em visitas trimestrais durante 18 meses para segurança e eficácia.

População de estudo

Homens ou mulheres (não amamentando e não grávidas) de pelo menos 18 anos de idade mas não mais do que 75 anos de idade com um diagnóstico de artrite inflamatória não diferenciada (UA) que têm sinovite clínica sintomática de duas ou mais articulações e que 1) possui pelo menos um e não mais que três dos critérios de ARA de 1987 para o diagnóstico de RA, 2) não cumprem os critérios de diagnóstico para qualquer outra doença reumática (por exemplo, lúpus eritematoso), e 3) que são também positivos para autoanticorpos contra péptidos citrulinados cíclicos por ELISA (Immunoscan RA Mark 2, Euro-Diagnostica, Arnhem, Países Baixos). Duração da doença [definido como o tempo do início dos sintomas (dor de articulação, dilatação, ou rigidez significativa) de artrite inflamatória não diferenciada para envolvimento] deve ser menos que 18 meses. Nenhuma terapêutica anterior com DMARD ou terapêutica biológica é permitida antes da avaliação.

Critérios para Avaliação

O resultado primário do estudo será a proporção de

indivíduos com um diagnóstico de RA pelos critérios de ARA de 1987 em 12 meses.

Medidas de resultado de eficácia secundária incluem a proporção de indivíduos com um diagnóstico de RA pelos critérios de ARA de 1987 em 24 meses, a proporção de indivíduos com sinovite clínica sintomática persistente em 6, 12, e 24 meses, a classificação média de DAS (CRP) total em 6, 12, e 24 meses, a proporção de indivíduos com uma classificação DAS de $<1,6$ em 6, 12, e 24 meses, títulos de fator reumatoide e anticorpos anti-CCP e inflamação e dano estrutural (o grau de sinovite, erosões e osteíte) das mãos por MRI de gadolínio usando um leitor centralizado e cego para a sequência e tratamento. Os resultados relatados do indivíduo incluirão o HAQ e SF-36.

As mudanças em componentes de núcleo da variável de compósito de ACR RA serão avaliadas ao longo do tempo entre os dois grupos de tratamento como um objetivo terciário.

Análise de Eficácia

A análise de eficácia primária será avaliar as taxas para desenvolvimento de RA em 12 meses em CTLA4Ig e placebo. Estimativas de ponto e intervalo para a proporção de indivíduos com um diagnóstico de RA em 12 meses para os dois grupos de tratamento serão fornecidas. Indivíduos que são descontinuados do estudo com uma razão estabelecida de "falta de eficácia" no CRF serão considerados como um não respondedor para a finalidade primária (isto é, eles serão contados no numerador e denominador ao mesmo tempo que avaliando a proporção de indivíduos que desenvolvem RA pelos critérios de ARA). Se um indivíduo tem dados de ausência na visita do mês 12 não devido à descontinuação e uma avaliação da visita subsequente, esta avaliação será usada na análise dos 12 meses. De outro modo, os indivíduos não serão incluídos na análise. Análises semelhantes serão realizadas para avaliar taxas para desenvolvimento de RA em 24 meses.

O grau de sinovite e dano estrutural de articulação serão avaliados usando produção de imagem com MRI. O sistema de avaliação OMERACT 6 RA MRI será usado (Ostergaard, M. *et al.*, "OMERACT Rheumatoid Arthritis Magnetic Resonance Imaging Studies. Core Set of MRI Acquisitions, Joint Pathology Definitions, e the OMERACT RA-MRI Scoring System", J. Rheumatology, 30(6):1385-1386 (2003)). Alterações a partir da linha de base na erosão, edema, e sinovite serão resumidas em 6, 12, e 24 meses usando estatísticas descritivas.

A persistência de sinovite clínica sintomática será avaliada em 6, 12 e 24 meses. As taxas para sinovite persistente serão resumidas com estimativas de ponto e intervalos de confiança de 95% para os grupos CTLA4Ig e placebo.

O efeito farmacodinâmico de CTLA4Ig em níveis séricos de autoanticorpos [fator reumatoide de IgM e péptido citrulinado anticíclico (anti-CCP2)] será avaliado. A distribuição das variáveis farmacodinâmicas na linha de base, visitas no mês 12 e mês 24, juntamente com suas alterações a partir da linha de base, serão resumidas por grupo de tratamento. A proporção de indivíduos atingindo resultados positivos/negativos será resumida pelo ramo de tratamento e o estado de referência (positivo/negativo).

Alterações médias referência partir da linha de base em DAS (CRP) total, HAQ e todos os componentes de SF-36 em 6, 12 e 24 meses serão resumidos com estimativas de ponto e intervalos de confiança de 95% para os grupos CTLA4Ig e placebo em cada visita. Além disso, percentagens de indivíduos com remissão (pontuação de DAS total <1,6) serão resumidas pelo ramo de tratamento.

As mudanças em componentes de núcleo da variável de compósito de ACR RA serão avaliadas ao longo do tempo entre os dois grupos de tratamento.

Análises de Segurança

Achados do exame físico significativos e resultados de teste clínico e de laboratório serão listados. Estatísticas resumidas serão tabuladas. Distribuições de frequência e listagens individuais de todos os eventos adversos serão geradas. Alterações em resultados de teste de laboratório clínicos de referência serão listadas. Descontinuações por causa serão resumidas pelo ramo de tratamento.

Análise de Imunogenicidade

A distribuição de variáveis de imunogenicidade e suas alterações referência partir da linha base serão resumidas usando estatísticas descritivas (métodos geométricos, desvios-padrão, etc.) e intervalos de confiança de 95% das mudanças da linha de base também serão calculados. A falta de imunogenicidade é definida como a ausência de uma resposta positiva. A existência de uma resposta positiva é definida com base num valor de redução de ensaio para positividade para cada ensaio e também confirmação daquela resposta pela imunodepleção. Para o ensaio anti-CTLA4Ig, o valor é calculado dividindo a amostra OD média de soro de indivíduo pós-dose pela média da sua amostra OD de soro do indivíduo pré-dose correspondente (dia 1). Para o ensaio anti-CTLA4-T, o valor de redução é calculado dividindo a amostra OD média de soro do indivíduo pela OD média do controlo negativo na placa de amostra. O valor de redução é estabelecido durante a validação de ensaio e pode ser novamente estabelecido quando as alterações são feitas nas populações de indivíduo ou reagentes de ensaio. Se uma amostra é negativa, é designado um valor $<$ do que a diluição avaliada. Se o valor for positivo, uma diluição seriada é avaliada e é designado um valor de título correspondente ao recíproco da diluição sérica interpolada que é igual ao valor de redução estabelecido para a positividade. Taxa de resposta positiva (se existir) e seu intervalo de confiança de 95% também serão calculados.

Critérios de Seleção de Indivíduo

Para entrada no estudo, os seguintes critérios DEVEM ser cumpridos.

Critérios de Inclusão

A. Termo de Consentimento Informado Assinado

O indivíduo está disposto a participar no estudo e assinou o consentimento informado.

B. População-alvo

Os indivíduos devem ter um diagnóstico de UA. Um indivíduo com UA deve ter sinovite clínica sintomática de duas ou mais articulações e deve possuir pelo menos um e não mais que três dos critérios para classificação de RA da Associação de Reumatismo Americana (1987).

Os indivíduos não devem cumprir critérios de diagnóstico para qualquer outra doença reumática (por exemplo, lúpus eritematoso).

A duração da doença do indivíduo definida como o tempo do início dos sintomas (dor de articulação, dilatação, ou rigidez) de artrite para inscrição deve ser menos que 18 meses.

Os indivíduos devem ser positivos para autoanticorpos contra péptidos citrulinados cíclicos pelo ELISA (Immunoscan RA Mark 2, Euro-Diagnostica, Arnhem, Países Baixos).

C. Idade e Sexo

Homens e mulheres, idades de 18 a 75 anos. Homens, e mulheres de gravidez potencial são aceitáveis se são praticantes de medidas contraceptivas eficazes.

D. Medicação Concomitante

A utilização de um corticosteroide oral de baixa dose estável é permitida ao longo do estudo. O tratamento deve ter sido reduzido para o equivalente de ≤ 10 mg de prednisona diariamente durante 28 dias e estabilizado durante pelo menos 25 dos 28 dias antes do tratamento (Dia 1).

Critérios de Exclusão

A. Sexo e Estado Reprodutivo

- 1) WOCBP que não estão dispostos ou são incapazes de utilizar um método aceitável para evitar a gravidez durante todo o período de estudo e durante até 10 semanas após a última infusão de CTLA4Ig
- 2) Mulheres que estão grávidas ou amamentando
- 3) Mulheres com um teste de gravidez positivo durante a inscrição ou antes da administração do fármaco do estudo
- 4) Indivíduos do sexo masculino não dispostos ou incapazes de utilizar um método adequado de contraceção durante todo o período de tratamento do fármaco do estudo e durante até 10 semanas após a última infusão de medicação do estudo.

B. História Médica e Doenças Concomitantes

- 5) Indivíduos que estão prejudicados, incapacitados, ou incapazes de completar as avaliações relacionadas com o estudo.
- 6) Indivíduos que cumprem critérios de diagnóstico para qualquer outra doença reumática (por exemplo, lúpus eritematoso).
- 7) Duração de artrite não diferenciada maior do que 18 meses
- 8) Indivíduos que têm tratamento recebido anteriormente com uma terapêutica de RA biológica aprovada (infliximab, etanercept, anakinra, adalimumab).
- 9) Indivíduos com vasculite ativa de um sistema de órgão principal.
- 10) Sintomas atuais de doença renal, hepática, hematológica, gastrointestinal, pulmonar, cardíaca, neurológica, ou cerebral severa, progressiva, ou não controlada. Condições médicas concomitantes que, na opinião do investigador, podem colocar o indivíduo em risco inaceitável para participação neste estudo.

- 11) Indivíduos do sexo feminino, que não tiveram avaliação de cancro de mama apropriada da idade e/ou fator de risco (como definido por normas publicadas e/ou padrões locais aprovados pela sociedade de cancro nacional ou médica e/ou pelo Ministério da Saúde), ou que tiveram um estudo de avaliação de cancro de mama que está suspeito de malignidade, e em quem a possibilidade de malignidade não pode ser razoavelmente excluída seguindo avaliações clínicas adicionais, de laboratório ou outras de diagnóstico.
- 12) Indivíduos com um histórico de cancro nos últimos cinco anos (exceto cancros de célula de pele de não melanoma curados por ressecção local). Cancros de célula de pele de não melanoma existentes devem ser removidos antes da dosagem.
- 13) Indivíduos que têm abuso de fármaco ou álcool clinicamente significante.
- 14) Indivíduos com qualquer infecção bacteriana aguda grave (tal como pneumonia ou pielonefrite a menos que tratada e completamente resolvida com antibióticos).
- 15) Indivíduos com infecções bacterianas recorrentes ou crónicas severas (tal como pneumonia recorrente, bronquiectasia crónica).
- 16) Indivíduos com tuberculose ativa (TB) que necessitaram de tratamento dentro dos 3 anos anteriores. Indivíduos com um PPD positivo em avaliação não serão aceitáveis para o estudo a menos que infecção de TB ativa fosse excluída, e eles tivessem um raio X do tórax negativo na inscrição. Uma resposta de PPD que é igual a ou maior do que 10 mm deve ser considerada um teste positivo, embora um limite inferior (5 mm) possa ser aplicado como determinado pela circunstância clínica e pelo investigador de acordo com normas publicadas e/ou padrões locais aprovados pela sociedade médica.

17) Indivíduos com herpes zóster que resolveu menos do que 2 meses antes do envolvimento.

18) Indivíduos com evidência (como avaliado pelo investigador) de infecções virais ou bacterianas latentes ou ativas no momento da potencial inscrição, incluindo indivíduos com evidência de infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH).

C. Achados de Testes Laboratoriais e Físico

19) Indivíduos positivos para antigénios de superfície de hepatite B.

20) Indivíduos positivos para anticorpos de hepatite C que são também positivos para RIBA ou positivos para PCR.

21) Indivíduos com quaisquer dos seguintes valores laboratoriais:

Hgb < 8,5 g/dl.

WBC < 3.000/mm³ ($3 \times 10^9/l$)

Plaquetas < 100.000/mm³ ($100 \times 10^9/l$).

Creatinina sérica > 2 vezes o limite superior do normal.

ALT ou AST sérica > 2 vezes o limite superior do normal.

Quaisquer outros resultados de testes laboratoriais que, na opinião do investigador, podem colocar o indivíduo em risco inaceitável para participação neste estudo.

D. Terapêuticas e/ou Medicções Proibidas

22) Indivíduos que tenham em qualquer momento recebido tratamento com CTLA4Ig, ou CTLA4Ig.

23) Indivíduos que tenham recebido tratamento com qualquer fármaco investigacional dentro de 28 dias (ou menos que 5 semi-vidas terminais de eliminação) da dose do Dia 1.

24) Indivíduos atualmente recebendo tratamento com colunas de imunoadsorção (tais como colunas Prosorba), mofetilo de micofenolato (CELLCEPT®),

ciclosporina, D-Penicilamina, ou inibidores de calcineurina.

25) Tratamento anterior com DMARD antes da avaliação.

E. Outros Critérios de Exclusão

26) Prisioneiros ou indivíduos que são compulsoriamente detidos (involuntariamente encarcerados) para tratamento de uma doença psiquiátrica ou física (por exemplo, doença infecciosa) não devem ser inscritos neste estudo.

Indivíduos que Participam na Avaliação de MRI

O radiologista na instalação de MRI do local é responsável por determinar se um indivíduo está contraindicado para passar por este procedimento. A seguinte é uma lista de algumas condições comuns que podem impedir o indivíduo de realizar MRI das mãos/pulsos. No entanto, isto não deve ser usado como um substituto para padrões clínicos de cuidado locais. A decisão definitiva para realizar MRI num indivíduo individual neste estudo baseia-se no radiologista do local, no investigador, e no grupo padrão pelo Comité de Ética local.

- 1) Indivíduos que têm um histórico de claustrofobia.
- 2) Indivíduos que têm uma limitação física relacionada com o ajuste no diâmetro do íman (isto é, peso corporal em excesso de 250 libras ou 113,4 quilogramas).
- 3) Indivíduos com *eye-liner* tatuado ou tatuagens diretamente sobre a mão ou pulso (áreas da qual será produzida a imagem).
- 4) Indivíduos que têm um histórico de reação alérgica a agentes de contraste.
- 5) Indivíduos que tiveram exposição a um agente de contraste radiológico dentro das 72 horas antes do exame de MRI.
- 6) Indivíduos que têm uma articulação fundida no pulso ou substituições de articulação na mão ou pulso

que estão a ser avaliadas pelo exame de MRI.

7) Indivíduos com um marca-passo, fios de marca-passo epicárdico, próteses de válvula cardíaca incompatíveis com MRI, clips vasculares incompatíveis com MRI com menos que dois meses de idade, ou clips de aneurisma incompatíveis com MRI de qualquer idade.

8) Indivíduos com implantes cocleares incompatíveis com MRI.

9) Indivíduos com estimuladores de nervo espinhal.

10) Indivíduos com uma bomba de infusão.

11) Indivíduos com fragmentos metálicos nos olhos/órbitas ou nos arredores do cérebro ou estruturas neurovasculares principais do corpo, indivíduos com uma história de ocupação que envolve exposição a soldadura, ou indivíduos que têm fragmentos metálicos em qualquer lugar no seu corpo.

Administração de CTLA4Ig ou Placebo

Os indivíduos serão randomizados para 1 de 2 grupos de tratamento:

Grupo 1: infusões intravenosas de CTLA4Ig (N = 25).

Grupo 2: infusões intravenosas de placebo (N = 25).

Indivíduos recebendo CTLA4Ig ativo serão administrados com doses com base no seu peso na visita de avaliação. Indivíduos pesando <60 kg receberão 500 mg, indivíduos pesando 60 a 100 kg receberão 750 mg, e indivíduos pesando >100 kg receberão 1 grama. Indivíduos que são randomizados para receber placebo serão administrados com dextrose a 5% em água ou solução salina normal (NS).

As doses de infusão serão baseadas no peso corporal do indivíduo a partir da visita de avaliação imediatamente antes da visita do dia 1. O Sistema de Randomização Central confirmará o peso corporal do indivíduo e designará o número de frascos de CTLA4Ig para distribuir para a visita. Os indivíduos receberão doses de medicação de estudo em cada visita de período de tratamento (dias 1, 15, 29, 57,

85, 113, 141, e 169). Uma janela de ± 3 dias é permitida para doses nos dias 15 e 29; uma janela de ± 7 dias é permitida para doses depois disso. As infusões devem ocorrer aproximadamente ao mesmo tempo de dia em toda a duração do estudo. Todas as doses de medicação de estudo serão administradas intravenosamente em um volume fixo de 100 ml em uma taxa constante de fluxo durante aproximadamente 30 minutos. A linha IV deve ser inundada com 25 ml de solução de D5W ou NS no final da infusão. A solução de infusão deve ser fornecida ao pessoal que administra a dose em um recipiente não identificando os conteúdos a fim de manter o estudo cego. O assessor clínico deve *permanecer* cego em relação à atribuição de tratamento tendo um membro do pessoal diferente que realize a infusão da medicação de estudo. Todas as infusões intravenosas serão com o indivíduo na posição sentada. Nenhum ajuste será feito no plano ou nível de dose de tratamento. Os indivíduos serão observados quanto a eventos adversos e os sinais vitais (pressão sanguínea, frequência cardíaca, respirações, temperatura) serão monitorizados a partir do início de cada infusão (pré-dose e 60 minutos). Existe uma janela de ± 5 minutos para a recolha de sinais vitais. Os indivíduos serão observados durante um mínimo de 1 hora a partir do início da infusão. O período de observação deve ser estendido se clinicamente indicado.

Modificações de Dose na Ausência de Eventos adversos

Na ausência de eventos adversos julgados pelo menos possivelmente relacionados ao tratamento com a medicação de estudo, os indivíduos completarão as suas infusões escalonadas como prescrito por protocolo. Uma dosagem escalonada do indivíduo pode ser administrada dentro de 72 horas (± 3 dias) antes de ou após o dia alvo para ajustar para a conveniência do indivíduo e/ou do pessoal do local durante os dias 15 e 29. Uma janela de ± 7 dias é permitida para doses posteriores.

Terapêuticas Proibidas e Restritas Durante o Estudo

DMARDs (por exemplo, metotrexato, ouro oral ou parentérico, sulfasalacina, cloroquina, hidroxiclороquina, D-penicilamina, azatioprina, leflunomida, ciclosporina) ou biológicos (por exemplo, etanercept, adalimumab, anakinra) não são permitidos.

Será permitido aos indivíduos tomar fármacos anti-inflamatórios não esteroides ao longo do estudo. Será permitido aos indivíduos tomar um corticosteroide oral de baixa dose estável (equivalente a ≤ 10 mg de prednisona diariamente) por meio do estudo. Até dois dos seguintes corticosteroides de alta dose podem ser utilizados a cada seis meses da experiência na descrição do investigador: curso oral (equivalente a 20 mg/dia de prednisona diariamente durante um máximo de duas semanas), ou uma dose única IM (intramuscular) ou uma dose única IA (intra-articular).

A utilização de fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), incluindo aspirina (ASA), é permitida durante este período.

Injeções IA e IM de corticosteroides devem ser evitadas. Nenhuma injeção IA ou IM de esteroides de alta dose é permitida dentro de um mês da avaliação de eficácia chave (isto é, dia 169, mês 12, e mês 24).

As seguintes medicações podem ser usadas, exceto 12 horas antes da avaliação de uma articulação:

acetaminofeno (paracetamol)

produtos de combinação incluindo acetaminofeno e analgésicos narcóticos (por exemplo, acetaminofeno com fosfato de codeína, acetaminofeno com napsilato de propoxifeno, acetaminofeno com cloridrato de oxicodona, acetaminofeno com bitartrato de hidrocodona, etc.), tramadol.

QUADRO 10

Procedimentos de Estudo e Observações								
A. Fase de Tratamento de Fármaco de Estudo Duplamente Cego								
Dia de Visita	Dia 1 ^a	Dia 15 (+/- 3 dias)	Dia 29 (+/- 3 dias)	Dia 57 (+/- 7 dias)	Dia 85 (+/- 7 dias)	Dia 113 (+/- 7 dias)	Dia 141 (+/- 7 dias)	Dia 169 (+/- 7 dias)
Randomizar e estratificar indivíduos (Contactar Centro de Randomização Central)	X							
Avaliações de Eficácia								X
Radiografias de Mãos e Pés								X
MRI de gadolínio de Mão-Pulso (Locais europeus apenas)								X
Contagem de articulação sensível ^b	X	X	X	X	X	X	X	X
Contagem de articulação dilatada	X	X	X	X	X	X	X	X
Avaliação de dor do indivíduo	X	X	X	X	X	X	X	X

Avaliação do indivíduo da atividade de doença	X	X	X	X	X	X	X	X
Avaliação global do médico da atividade da doença	X	X	X	X	X	X	X	X
Avaliação da função física do indivíduo (HAQ)	X	X	X	X	X	X	X	X
SF-36	X		X		X			X
Resposta dos indivíduos à terapêutica					X			
Estimativas de Segurança								
Monitorização do Evento Adverso	X	X	X	X	X	X	X	X
Exame Físico Provisório	X	X	X	X	X	X	X	X
ECG								X
Sinais Vitais	X	X	X	X	X	X	X	X
Labs								
CBC	X	X	X	X	X	X	X	X
Painel bioquímico	X	X	X	X	X	X	X	X
Urianálise								X

Teste de gravidez urina/soro (WOCBP apenas) ^c	X	X	X	X	X	X	X	X
CRP	X	X	X	X	X	X	X	X
IgM RF	X							X
Biomarcadores (IL-6, TNF α , IL-1 beta, MMP-3)	X							X
Tipagem de HLA	X							
Imunogenicidade	X							X
Anti-CCP2								X
Dosagem	X	X	X	X	X	X	XX	
^a Todas as avaliações e resultados devem ser revistas antes de contatar o Centro de Randomização Central. Todas as avaliações devem ser realizadas antes da dosagem. ^b Uma avaliação de contagem de 68/66 será feita. ^c Um teste de gravidez negativo deve ser feito dentro 48 horas antes da visita.								

B. Observação duplamente cega pós-tratamento

Dia de Visita (+/- 7 dias permitidos para os meses 9, 15, 18, e 21; +/- 30 dias permitidos para os meses 12 e 24)	Mês 9 (Dia 253)	Mês 12 (Dia 365) ^a	Mês 15 (Dia 449)	Mês 18 (Dia 533)	Mês 21 (Dia 617)	Mês 24 (Dia 729)	Início

Avaliações de Eficácia							
Radiografias de Mãos e Pés ^b		X					X
MRI de gadolínio de Mão-Pulso (Locais europeus apenas)		X					X
Contagem de articulação sensível ^c	X	X	X	X	X	X	X
Contagem de articulação dilatada	X	X	X	X	X	X	X
Avaliação de dor do indivíduo	X	X	X	X	X	X	X
Avaliação do indivíduo da atividade de doença	X	X	X	X	X	X	X
Avaliação global do médico da atividade da doença	X	X	X	X	X	X	X
Avaliação da função física do indivíduo (HAQ)	X	X	X	X	X	X	X
SF-36	X	X	X	X	X	X	X
Resposta dos indivíduos à terapêutica	X	X	X	X	X	X	X
Estimativas de Segurança							
Monitorização do Evento Adverso	X	X	X	X	X	X	X

Exame Físico Provisório	X	X	X	X	X	X	X
Exame Físico Completo							
Peso						X	X
Sinais Vitais	X	X	X	X	X	X	X
Labs							
CBC	X	X	X	X	X	X	X
Painel bioquímico	X	X	X	X	X	X	X
Urianálise						X	X
Teste de gravidez urina/soro (WOCBP apenas)	X ^d	X	X	X	X	X	X
Rastreamento de cancro da mama							
Anual/de Aniversário (mulheres apenas)		X				X	X
CRP	X	X	X	X	X	X	X
IgM RF		X				X	
Biomarcadores (IL-6, TNF α , IL-1 Beta, MMP-3)		X					X
Imunogenicidade	X	X					
Anti-CCP2		X				X	

- ^a Se o indivíduo não vem à clínica para a visita do mês 12, todas as avaliações exigidas no mês 12 serão feitas na visita clínica seguinte.
- ^b Se as radiografias são feitas entre os meses 6 e 12 e o indivíduo descontinua, as radiografias devem ser levadas para a leitora central para a avaliação da classificação de Sharp modificada por Genant.
- ^c Uma avaliação de articulação de contagem 68/66 será feita.
- ^d Um teste de gravidez negativo deve ser feito dentro 48 horas antes da visita.

Avaliações de Segurança

Todos os indivíduos que recebem uma dose de fármaco de estudo serão avaliados para o teste de segurança e imunogenicidade. Os resultados de segurança incluem eventos adversos, alterações clinicamente resultantes em sinais vitais, e anormalidades em teste laboratoriais. O investigador determinará a gravidade de cada evento adverso como sendo leve, moderado, grave, ou muito grave. Os achados laboratoriais que o investigador sente que são clinicamente relevantes com base nas Normas de Laboratório devem ser registados como eventos adversos. Além disso, o investigador determinará a ligação do evento adverso com a administração do fármaco de estudo.

Exames físicos completos e/ou provisórios podem ser realizados por um médico clínico (MD), médico de osteopatia (DO), assistente de médico (PA), ou enfermeiro clínico (NP). Ao mesmo tempo em que o exame físico provisório pode não ser tão completo quanto o exame completo inicial, aspetos essenciais do exame provisório devem avaliar sistemas corporais importantes como clinicamente indicado. Estes sistemas corporais podem incluir nódulos linfáticos, fígado, baço, e mama, na descrição do examinador. Um exame físico provisório pode observar quaisquer mudanças na condição do indivíduo (sistemas corporais) desde a última avaliação e não impede o exame de quaisquer dos sistemas corporais como clinicamente indicado.

Um raio X do tórax na visita de avaliação é necessário se não anteriormente realizado dentro de seis meses da obtenção do consentimento informado escrito ou se a documentação não estiver em arquivo.

Um eletrocardiograma de 12 derivações (ECG) é necessário se não anteriormente realizado dentro de seis meses da obtenção do consentimento informado escrito ou se a documentação não estiver em arquivo. O ECG será repetido no final do período de tratamento (dia 169) ou 28 dias após a descontinuação se o indivíduo terminar o período de tratamento precocemente.

Para identificar indivíduos com tuberculose latente (TB), um teste de PPD (teste de pele de tuberculina derivado de proteína purificada) é necessário se não realizado dentro de seis meses da avaliação ou se a documentação de testagem dentro de seis meses não estiver em arquivo. Todos os indivíduos incluindo aqueles com vacinação de BCG anterior devem ser avaliados quanto a TB latente.

Teste de pele PPD deve ser realizado de acordo com as normas publicadas que fornecem recomendações para teste e interpretação de PPD em indivíduos com artrite reumatoide que estão a ser considerados para o tratamento com 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(Supp.):ii62-ii63 (2002) e locais Ex US, normas locais aprovadas por sociedades médicas sobre a testagem de PPD em indivíduos com RA sendo tratados com biológicos podem também se aplicar), indivíduos que são imunossupressivos ("Targeted Tuberculin Testing and Latent Treatment of Tuberculosis Infection", *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 161:S221-S247 (2000) e "Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children", *Am. J. Respir. Crit.*

Care Med., 161:1376-1395 (2000)) e indivíduos com uma história anterior de vacinações de BCG.

Indivíduos com um PPD positivo na avaliação não serão aceitáveis para o estudo a menos que a infecção de TB ativa tenha sido excluída e eles tenham um raio X de tórax negativo na inscrição. Uma resposta a PPD que é igual a, ou maior do que 10 mm deve ser considerada um teste positivo, embora um limite inferior (5 mm) possa ser aplicado como determinada pela circunstância clínica e investigador de acordo com normas publicadas e/ou padrões locais aprovados pela sociedade médica.

Antes de entrar neste estudo exige-se que indivíduos do sexo feminino tenham avaliação de cancro de mama apropriada para a idade e/ou fator de risco. A avaliação do cancro de mama deve ser realizada de acordo com as normas publicadas e/ou padrões locais aprovados pelo National Cancer or Medical Society e/ou pelo Ministry of Health. Além disso, as normas de avaliação de cancro de mama utilizadas pelo local investigacional devem ser tornadas disponíveis para os IRB/Comités de Ética locais e explicadas no consentimento informado do indivíduo.

A avaliação de cancro de mama documentada realizada dentro de seis meses da avaliação será aceite como atendendo a este requisito. No entanto, a avaliação será necessária se a documentação da instalação de avaliação não estiver em arquivo ou um exame de avaliação tenha sido realizado há mais do que 6 meses antes da entrada no estudo.

Com base nos critérios de entrada no estudo para avaliação de cancro de mama, exige-se que indivíduos do sexo feminino tenham uma avaliação de cancro de mama de repetição anual ou de aniversário.

Radiografias vulgares de mãos/pulsos e pés devem ser realizadas nas avaliações para indivíduos aceitáveis. As radiografias conduzidas em indivíduos aceitáveis (após

confirmação de um teste anti-CCP2 positivo) serão enviadas para uma leitora central para avaliações quanto à presença ou ausência de erosões. A informação sobre erosões será usada para estratificação no estudo. Radiografias vulgares de mãos/pulsos e pés serão também tomadas em 6, 12, e 24 meses e avaliadas por uma leitora central para a pontuação de Sharp modificada por Genant. Se as radiografias forem tomadas entre os meses 6 e 12 e o indivíduo descontinuado, as radiografias devem ser enviadas para a leitora central para avaliação.

Uma MRI de gadolínio da mão/pulso (um lado do corpo apenas) deve ser realizada antes da randomização para todos os indivíduos em lugares Europeus apenas aqueles que têm um teste anti-CCP2 positivo e sinovite clínica sintomática de duas mais articulações da mão ou pulso. A MRI será avaliada por uma leitora central. Uma MRI de acompanhamento da mesma mão/pulso também será realizada em 6, 12, e 24 meses e avaliadas por uma leitora central. Nenhuma MRI será realizada dos pés.

Testes de gravidez de urina ou soro serão realizados dentro de 48 horas antes de cada visita até todos os WOCCBP. Se qualquer indivíduo do sexo feminino engravidar, será imediatamente excluído do estudo.

MRI de Gadolínio de Mão e Pulso

Um estudo de MRI de gadolínio da mão e pulso (apenas um lado) será realizado em todos os indivíduos em lugares Europeus, apenas aqueles que têm um teste anti-CCP2 positivo e sinovite clínica sintomática de duas ou mais articulações da mão ou pulso dentro de duas semanas antes da primeira dose de medicação de estudo (dia 14 ao dia 1) usando uma máquina 1,5 Tesla e repetido no ponto do tempo de 6, 12 e 24 meses. Os dados de imagem de MR serão interpretados por radiologistas numa instalação central de acordo com o método OMERACT 6 da seguinte maneira:

Classificação de erosão/edema no pulso e mão

Erosões e edema da medula óssea serão classificados separadamente de acordo com o esquema de graduação de OMERACT 6. Cada osso no pulso e mão (ossos cárpicos, rádio distal, ulna distal, bases metacárpicas e os ossos compreendendo as articulações de MCP) é classificado separadamente numa escala de 0 a 10, como determinado pela proporção de osso descartado e volume de edema (separadamente classificados) em comparação com o volume de osso avaliado. A escala de classificação é determinada em 10% de incrementos com uma classificação de 10 representando >90% de comprometimento do osso avaliado por erosões ou edema.

Classificação de Sinovite no Pulso e Mão

A sinovite é avaliada em múltiplas regiões do pulso (a articulação radioulnar distal, a articulação radiocárpica, as articulações intercárpicas e carpometacárpicas bem como as articulações da 2^a a 5^a de MCP) numa escala de 0 a 3. Uma classificação de 3 representa um grau grave com o volume de tecido realçado de gadolínio compreendendo >2/3 do compartimento sinovial avaliado.

Todas as imagens de MR para todos os indivíduos com dados de imagem tanto de referência quanto de 12 meses disponíveis serão lidas por uma leitora central treinada cega para a atribuição e sequência do tratamento.

Tipagem de HLA

A todos os indivíduos a serem randomizados será removido sangue periférico para tipagem de HLA no dia 1 para determinar a presença ou ausência dos alelos que são associados com suscetibilidade/gravidade de RA (os alelos de "epítipo compartilhado" HLA-DR0401 e 0404). Os indivíduos randomizados serão caracterizados como nulos, heterozigóticos, homozigóticos, ou duplamente heterozigóticos para estes alelos. Esta informação também caracterizará o risco de desenvolvimento de RA grave dos indivíduos do estudo.

Avaliações de Teste Laboratoriais

Amostras de sangue e/ou urina serão obtidas antes de infusão em todas as visitas de cada indivíduo que entrou no presente estudo. Qualquer resultado de teste laboratorial que o investigador considere clinicamente relevante deve ser registrado na página de Evento Adverso apropriada do CRF.

A. Hematologia

Contagem de WBC Total, Hematócrito, Hemoglobina, incluindo contagem diferencial de de plaquetas e RBC.

B. Bioquímica

Sódio, creatinina, potássio, azoto ureico sanguíneo (BUN), Cloro, Bilirrubina total, Proteína total, Alanina aminotransferase (ALT), Albumina, Aspartato aminotransferase (AST), Cálcio, Gama-glutamilttransferase (GGT), Fósforo, Fosfatase alcalina, Ácido úrico, Glucose.

C. Urinálise

pH, Proteína, Glucose, Sangue, Exame microscópico do sedimento da urina se sangue, proteína ou glucose são positivos na tira de urina.

D. Análise de Hepatite

(realizada na visita de avaliação apenas). Antigénio de superfície de hepatite B (se positivo, anticorpo de núcleo), anticorpo de hepatite C (se positivo, RIBA ou PCR).

E. Testes de Gravidez

Testes de gravidez de urina ou soro (sensibilidade mínima 25 UI/l de HCG) devem ser realizados para todos os WOCBP dentro de 48 horas antes de cada visita até a visita do mês 9. Se qualquer indivíduo do sexo feminino engravidar, será excluído do estudo. Os testes de gravidez serão processados localmente.

F. Testes farmacodinâmicos (PD)

IgM RF, Proteína C reativa (CRP), Citocinas inflamatórias (IL-6, TNF α , IL-1 beta), Metaloproteinase de

Matriz 3 (MMP-3), Anti-CCP2.

G. Determinação de imunogenicidade

Anticorpo anti-CTLA4Ig.

H. Outros

Antígenos de Leucócitos Humanos (HLA)

Além disso, o investigador obterá amostras para testes laboratoriais adicionais se considerado necessário para monitorizar a segurança do indivíduo.

Imunogenicidade

O potencial imunogénico de CTLA4Ig será avaliado com base nos níveis de anticorpos anti-CTLA4Ig.

Os indivíduos que completam a fase de tratamento de fármaco de estudo terão amostras de soro obtidas nos dias de visita 1, 169, 253 e dia 365 para serem testadas quanto à presença de anticorpos anti-CTLA4Ig.

Os indivíduos que não completam a fase de tratamento de fármaco do estudo terão uma amostra de soro recolhida: nos dias 1 e nos dias 28, 56 e 85 após a última dose de medicação de estudo. As amostras serão testadas quanto à presença de anticorpos anti-CTLA4Ig.

Métodos de ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA), sensíveis e validados serão usados para medir os títulos tanto de anticorpos anti-CTLA4Ig em soro quanto de anti CCP-2 em soro.

Avaliações da Eficácia

A. Raios X de Mãos e Pés

Os raios X de mãos e pés serão realizados em todos os indivíduos com um teste anti-CCP2 positivo na Avaliação, dia 169, mês 12, e mês 24. Todos os centros necessitaram atender aos requisitos técnicos. As radiografias das mãos e pés serão padronizadas para assegurar suficiente qualidade de imagem para a avaliação de progressão radiográfica de artrite reumatoide. Instalações e pessoal de radiologia serão qualificados para participação na experiência com base nas capacidades técnicas do equipamento e experiência

e licenciamento dos tecnologistas de raio X. A técnica radiográfica será harmonizada por meio do uso de um manual de procedimento radiográfico escrito e treino de tecnologistas de raio X. Além disso, o sistema *film-screen* será padronizado para assegurar suficiente resolução para a avaliação de erosões e estreitamento do espaço articular. As radiografias recolhidas para a experiência serão enviadas para uma instalação de leitura central para controlo de qualidade e avaliação central (de uma maneira cega) por um radiologista treinado e experiente na classificação de artrite reumatoide pelo esquema de graduação de Sharp modificado por Genant. Uma leitora primária e leitora de reserva serão designadas. As leitoras serão certificadas para o estudo por meio da avaliação de um grupo de casos de teste e avaliação de concordância entre as leitoras. As leitoras serão cegas para a ordem dos pontos de tempos.

B. MRI realçada por gadolínio de mão/pulso

Uma MRI realçada por gadolínio da mão/pulso será realizado em todos os indivíduos randomizados com um teste anti-CCP2 positivo que têm sinovite clínica sintomática das mãos em avaliação, dia 169, mês 12, e mês 24. A mão/pulso do indivíduo com mais sinovite por avaliação clínica deve ser selecionada inicialmente e utilizada para todas as avaliações subsequentes. A MRI de referência (e todos os estudos de MRI de acompanhamento) não deve ser realizada se a mão/pulso for assintomática ou se não existir nenhuma sinovite por avaliação clínica.

O exame de MRI será padronizado para assegurar suficiente qualidade de imagem para a avaliação da progressão radiográfica de artrite reumatoide. As instalações e pessoal de radiologia serão qualificados para participação na experiência com base nas capacidades técnicas do equipamento e experiência e licenciamento dos tecnologistas. As técnicas radiográficas serão harmonizadas

por meio do uso de um manual de procedimento radiográfico escrito e treino de tecnologistas. Os dados de MRI recolhidos para a experiência serão enviados para uma instalação de leitura central para controlo de qualidade e avaliação central. As avaliações de eficácia serão realizadas apenas pela leitora central.

C. Avaliações de contagem articular

As medidas de respostas serão revistas e discutidas com o pessoal de investigação no Investigator Meeting ou outro fórum como um método de padronização da graduação entre o pessoal de investigação. O treino e instrução sobre a avaliação de contagem articular serão discutidos no Investigator's Meeting ou em seminários.

As avaliações de contagem articular podem ser realizadas pelo seguinte pessoal: MD, DO, PA, NP ou RN. Idealmente, a contagem articular deve ser realizada antes de qualquer outra avaliação ou procedimento ser realizado.

Todo o esforço deve ser feito para assegurar que o (s) mesmo(s) avaliador(es) completará(ão) a avaliação para cada indivíduo. As visitas devem ser escalonadas com a disponibilidade do(s) avaliador(es) considerado(s). Se o(s) avaliador(es) forem incapazes de completar a avaliação, então o indivíduo qualificado, com experiência de sobreposição pode realizar a avaliação. A documentação de quem realizou a avaliação deve ser registada em notas de fonte.

D. Avaliações Clínicas

As avaliações clínicas de resposta devem ser realizadas pelo(s) mesmo(s) assessor(es) e em aproximadamente o mesmo tempo do dia durante toda a duração do estudo. O(s) assessor(es) clínico(s) deve(m) ser uma pessoa diferente daquela que está a administrar a infusão de medicação de estudo.

Os assessores clínicos completarão as páginas de avaliações globais e contagem articular dos CRFs na sua

própria caligrafia. Estas páginas serão documentos fonte para o presente estudo.

Os indivíduos completarão as páginas HAQ e SF-36 do CRF na sua própria caligrafia. Estas páginas serão documentos fonte para este estudo.

As CRP obtidas a partir do laboratório central serão utilizadas para calcular o DAS total.

E. Avaliações farmacodinâmicas

Os dados farmacodinâmicos recolhidos neste estudo incluirão valores de laboratório consistindo em variáveis contínuas. Biomarcadores para imunomodulação ou inflamação na artrite reumatoide, incluindo IgM RF, CRP, e anti-CCP2, serão recolhidos.

CRP serão recolhidas em cada visita durante a fase de de tratamento de fármaco de estudo duplamente cega, a fase de observação duplamente cega pós-tratamento, bem como término precoce em ambas as fases.

Fator reumatoide (IgM RF) e biomarcadores serão recolhidos no dia -21, dia 1, dia 169, e meses 12 e 24.

Anti-CCP2 será recolhida na avaliação, dia 169, mês 12, e mês 24.

Adicionalmente, uma porção do soro recolhido em cada visita será armazenada e os seguintes biomarcadores serão analisados: pró-citocinas inflamatórias (IL-6, TNF α , e IL-1 beta) e a Metaloproteinase de Matriz 3 (MMP-3).

Avaliações de pesquisa de resultados

A. Função física

A função física será avaliada usando a sessão de incapacidade do *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) (Fries, J.F. et al., "Measurement of subject Outcome in Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 23:137-145 (1980)). Esta sessão inclui 20 questões para avaliar funções físicas em 8 domínios: vestir-se, levantar-se, alimentar-se, andar, higiene, alongar-se, segurar-se e atividades comuns. As questões são avaliadas em uma escala de 4 pontos: 0 = sem

qualquer dificuldade, 1 = com alguma dificuldade, 2 = com muita dificuldade, e 3 = incapazes de fazer. Pontuações maiores indicam maior disfunção. Um índice de incapacidade será calculado somando-se as piores pontuações em cada domínio e dividindo pelo número de domínios respondidos.

B. Qualidade de vida relacionada com a saúde

O SF-36 será usado para avaliar a qualidade de vida relacionada com a saúde (Birrell, F.N. *et al.*, "How does the Short Form 36 Health Questionnaire (SF-36) in Rheumatoid Arthritis (RA) Relate to RA Outcome Measures and SF-36 Population Values? A Cross-Sectional Study", *Clin. Rheumatol.*, 19:195-199 (2000); Keller, S.D. *et al.*, "The SF-36 Arthritis-Specific Health Index (ASHI): II. Tests of validity in four clinical trials", *Med. Care*, 37(5 Suppl.):MS51-60 (Maio de 1999); Ware, J.E. *et al.*, "The SF-36 Arthritis-Specific Health Index (ASHI): I. Development and cross-validation of scoring algorithms", *Med. Care*, 37(5 Suppl.):MS40-50 (Maio de 1999); e Kosinski, M. *et al.*, "The SF-36 Health Survey as a generic outcome measure in clinical trials of subjects with osteoarthritis e rhematoid arthritis: relative validity of scales in relation to clinical measures of arthritis severity", *Med. Care*, 37(5 Suppl.):MS23-39 (Maio de 1999)). Pontuações de subescala individual e duas pontuações de sumários serão calculadas: (1) sumário de componente físico (PCS) que inclui funcionamento físico, papel físico, dor corporal, e saúde geral; (2) sumário de componente mental (MCS) que inclui vitalidade, funcionamento social, papel emocional, e saúde mental. O SF-36 foi recomendado pela FDA como um instrumento validado para avaliar a qualidade de vida relacionada com a saúde em indivíduos com RA (Guidance for Industry, Clinical Development Programs for Drugs, Devices, and Biological Products for the Treatment of Rheumatoid Arthritis (RA), U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Evaluation and Research (fev.

1999)).

Informação do Produto de Fármaco

Um farmacêutico ou pessoa qualificada no local, não de outro modo associado com a condução do estudo, reconstituirá o fármaco para administração intravenosa (IV).

Todas as reconstituições e diluições devem ser realizadas usando seringas não siliconizadas de polipropileno (Norm-Ject fabricada por Henke Sass Wolf na Alemanha).

NOTA: Uma agulha e seringa separadas DEVEM ser usadas para cada frasco reconstituído.

Os frascos são selados a vácuo. Se quaisquer frascos forem encontrados sem este vácuo, eles devem ser segregados e não utilizados. Estes frascos devem ser retidos até reconciliação pelo seu Monitor de Fármaco de Estudo.

NOTA: O frasco não deve ser aberto antes da reconstituição. Para evitar a formação de espuma após a adição de SWFI, o frasco deve ser suavemente agitado até os conteúdos serem completamente dissolvidos. Na completa dissolução do pó liofilizado, o frasco deve então ser aberto com uma agulha para dissipar qualquer espuma que possa estar presente.

Cada frasco de produto de fármaco de CTLA4Ig para injeção, 250 mg/frasco, deve ser reconstituído com 10 ml de SWFI (sem agente bacteriostático) para produzir uma concentração de 25 mg/mL. A fim de minimizar a produção de espuma, a corrente de SWFI deve ser direcionada para os lados do frasco.

Um excesso suficiente de produto de fármaco de CTLA4Ig é incorporado em cada frasco para compensar as perdas da remoção de modo que 10 mL da solução reconstituída contendo 250 mg possam ser retirados para administração parentérica. Após reconstituição do produto a solução deve ser diluída também com D5W ou cloreto de sódio a 0,9% (NS = solução

salina "Normal").

A solução de infusão contínua deve ser filtrada aquando da administração utilizando um filtro de ligação de baixa proteína, não pirogénico, estéril, em linha, com um tamanho de poro de 1,2 µm. Esta infusão deve ser administrada durante um período de aproximadamente 30 minutos. Qualquer porção não utilizada da solução de infusão não deve ser armazenada para reutilização.

Nenhum dado está disponível sobre a compatibilidade do produto de fármaco de CTLA4Ig com outras substâncias intravenosas. O produto de fármaco de CTLA4Ig deve ser administrado numa linha intravenosa separada quando possível e não misturado com outras medicações. Deve-se assegurar uma lavagem adequada e apropriada entre quaisquer outras substâncias de fármaco se outros fármacos forem administrados através da mesma linha sequencialmente.

Nenhuma incompatibilidade foi observada com frascos de vidro ou bolsas e conjuntos de administração de cloreto de polivinilo.

Deve ser tomado cuidado para assegurar a esterilidade da solução preparada, quando o produto de fármaco não contém quaisquer conservantes antimicrobianos ou agentes bacteriostáticos.

Os frascos do produto de fármaco de CTLA4Ig para Injeção, 250 mg/frasco, devem ser armazenados sob refrigeração (2-8 °C) e protegidos de exposição à luz a longo prazo. Frascos intatos são estáveis durante pelo menos um ano sob estas condições. Todas as diluições do produto de fármaco de CTLA4Ig para injeção devem ser usadas dentro de 12 horas após a reconstituição do frasco original.

As normas de estabilidade específicas para cada diluição são conforme se segue:

O produto de fármaco de CTLA4Ig reconstituído para Injeção, 25 mg/ml, pode ser armazenado em temperaturas de

15-25 °C e luz ambiente ou em refrigeração (2-8 °C) durante não mais de 6 horas num frasco original.

Diluições de produto de fármaco de CTLA4Ig reconstituído para Injeção 10 mg/ml em NS em cloreto de polivinilo (PVC) ou bolsas de não PVC IV podem ser armazenadas em temperaturas de 15-25 °C e luz ambiente ou em refrigeração (2-8 °C) durante não mais do que 12 horas a partir do momento de reconstituição inicial.

As soluções diluídas do produto de fármaco de CTLA4Ig para Injeção são compatíveis com as séries de infusão de PVC IV padrão.

Resultados

Uma análise provisória planeada foi feita após todos os indivíduos randomizados terem completado a visita do mês 12 ou terem sido descontinuados prematuramente para observar a finalidade da eficácia primária para o desenvolvimento de RA. 51/56 pacientes randomizados foram avaliados (idade média: 45 anos; duração média dos sintomas: 7 meses [variação 1 a 18 meses]; nível de CRP médio: 1,1 mg/dl); 80% tinham oligoartrite, 50% tinham erosões. Em 1 ano, 12/27 (44%) pacientes tratados com CTLA4Ig desenvolveram RA contra 16/24 (67%) pacientes tratados com Pbo (23% de diferença; 95% de intervalo de confiança -6 a +48). O tempo para descontinuação devido ao desenvolvimento de RA é mostrado na figura 2.

Conclusão

CTLA4Ig atrasa a progressão para RA definitiva em pacientes com UA. Os efeitos modificadores da doença de tratamento com CTLA4Ig foram mantidos durante 6 meses após a terapêutica ser interrompida.

EXEMPLO IV

Os dados de 2 anos para o estudo descrito no exemplo III são apresentados abaixo. Os dados incluem dados de atividade de marcador de eficácia, segurança, e farmacodinâmica (PD) para adultos com UA que receberam até

6 meses de tratamento duplamente cego com CTLA4Ig ou placebo. Indivíduos com UA persistente após 6 meses de tratamento com estudo duplamente cego, porém que não alcançaram os critérios para RA, foram monitorizados sem a medicação de estudo quanto ao desenvolvimento subsequente de RA até 18 meses adicionais.

População de Estudo

Um total de 184 indivíduos foram avaliados, dos quais 57 foram inscritos e randomizados numa relação de 1:1 para tratamento duplamente cego com CTLA4Ig (N = 29) ou placebo (N = 28). A falha em alcançar os critérios de elegibilidade do estudo foi a razão mais frequente para que os indivíduos tenham sido avaliados porém não randomizados.

Todos menos 1 dos indivíduos randomizados receberam pelo menos 1 dose de medicação de estudo. Um indivíduo designado para o grupo de CTLA4Ig, foi retirado devido à presença de erosões detetadas após randomização mas antes da administração de qualquer fármaco de estudo. Deste modo, um total de 56 indivíduos, 28 em cada grupo de tratamento, foi randomizado e receberam pelo menos 1 dose de fármaco de estudo.

Entre os indivíduos que foram atribuídos para tratamento de forma aleatória, 39 (22 CTLA4Ig, 17 placebos) completaram o período de tratamento com o fármaco de estudo de 6 meses e entraram no período de observação de 18 meses. Destes, 28 retiraram-se prematuramente antes da conclusão do período de observação (15 no grupo de CTLA4Ig, 13 no grupo de placebo). Dezasseis (16) destes 28 indivíduos (8 em cada grupo de tratamento) descontinuaram antes do mês 12. Um total de 7 (25,0%) indivíduos no grupo de CTLA4Ig e 4 indivíduos (14,3%) no grupo de placebo completaram o estudo de 24 meses.

A falta de eficácia foi a razão mais frequente para descontinuação prematura durante o período de tratamento com o fármaco de estudo, com mais do que duas vezes o

número de indivíduos no grupo de placebo (n=8, 28,5%) em comparação com o grupo de CTLA4Ig (n=3, 10,7%) a descontinuarem por esta razão. A falta de eficácia foi também a razão mais comum para retirada do período de observação. Durante este período de 18 meses a proporção de indivíduos que entrou no período de observação que foram descontinuados por esta razão foi novamente maior para o grupo de placebo (12/17, 70,6%) do que para o grupo de CTLA4Ig (11/22, 50,0%). Entre os 23 indivíduos que foram descontinuados devido à falta de eficácia durante o período de observação, 14 (7 CTLA4Ig, 7 placebos) foram retirados antes do mês 12.

Eventos adversos levaram à descontinuação prematura de 1 indivíduo no grupo de CTLA4Ig durante o período de tratamento com o fármaco do estudo e 1 indivíduo no grupo de placebo durante o período de observação.

Os grupos de CTLA4Ig e placebo foram equilibrados com respeito às características demográficas de idade, peso, distribuição de género e distribuição racial. A idade média dos 56 indivíduos randomizados e tratados foi 44,8 anos (faixa: 23 a 74 anos). A maioria dos indivíduos eram de raça branca (85,7%) e do sexo feminino (71,4%). Enquanto a maioria de indivíduos em ambos grupos de tratamento foi inscrita em lugares na Europa (60,7% para o grupo de CTLA4Ig, 75,0% para o grupo de placebo), uma maior percentagem de indivíduos no grupo de CTLA4Ig foi inscrita em lugares na América do Sul (17,9% contra 7,1% para o grupo de placebo).

Os grupos de CTLA4Ig e placebo foram geralmente equilibrados com respeito às características da doença de base. Todos além de 5 indivíduos tiveram doença envolvendo pelo menos 2 articulações; 2 indivíduos em cada grupo de tratamento tiveram doença envolvendo apenas 1 articulação, e um indivíduo no grupo de CTLA4Ig não teve nenhuma sinovite em avaliação ou linha de base (Dia 1). Este último

indivíduo foi inscrito porque alcançou 3 critérios diagnósticos para RA (critérios ARA 1987), porém foi excluído da análise de eficácia primária para esta divergência de protocolo relevante. Os indivíduos restantes alcançaram entre 1 e 3 critérios diagnósticos para RA, com a maioria de indivíduos (58,9%) cumprindo 3 critérios. Através de todos os indivíduos, a duração média de artrite inflamatória (IA) foi 7,9 meses e foi um tanto mais longa no grupo de CTLA4Ig (8,8 meses) do que no grupo de placebo (7,1 meses). O nível de CRP médio foi semelhante nos grupos de CTLA4Ig e placebo (11,2 mg/l e 10,7 rag/l, respetivamente), assim como foi a percentagem de indivíduos com evidência radiográfica de erosões na referência (53,5% e 57,1%, respetivamente).

Descobertas históricas médicas gerais foram compatíveis com doença inflamatória ativa e foram geralmente semelhantes para os 2 grupos. A maioria dos indivíduos (>75%) em ambos grupos de tratamento estava a receber uma medicação antirreumática no Dia 1 (78,6% em CTLA4Ig, 89,3% de placebo), com os AINEs sendo a medicação antirreumática mais comumente utilizada.

Catorze (14) indivíduos, incluindo 9 atribuídos para o grupo de CTLA4Ig e 5 atribuídos para o grupo de placebo, estavam a receber um fármaco corticosteroide oral ou injetável no dia 1. Para 4 indivíduos (14,3%) atribuídos para o grupo de CTLA4Ig e 2 indivíduos (7,1%) atribuídos para o grupo de placebo, o tratamento concomitante no dia 1 consistiu numa dose de corticosteroide oral baixa (≤ 10 mg/dia de equivalente de prednisona).

Extensão de Exposição

Apesar da maior taxa de descontinuação prematura do período de tratamento com o fármaco de estudo no grupo de placebo, a maioria dos indivíduos nos grupos de CTLA4Ig e placebo (89,3% e 75,0%, respetivamente) recebeu 6 meses de tratamento e recebeu as 8 infusões de fármaco de estudo

escalonadas (75,0% e 71,4%, respectivamente). Um (1) indivíduo no grupo de CTLA4Ig (3,6%) e 5 indivíduos no grupo de placebo (17,9%) receberam 3 ou menos infusões de fármaco de estudo. Nenhum indivíduo recebeu mais do que 8 infusões de fármaco de estudo ou teve mais do que 6 meses de tratamento de estudo.

A maioria dos indivíduos no todo da população de análise tratada não falhou uma infusão escalonada de CTLA4Ig (85,7%) ou placebo (92,9%) durante o período de tratamento com o fármaco de estudo, e nenhum indivíduo em qualquer grupo de tratamento falhou mais do que 1 infusão escalonada.

O uso de corticosteroides de baixa dose durante o período de tratamento com o fármaco do estudo foi baixo e semelhante para os grupos de CTLA4Ig e placebo na população de análise ITT, ambos em termos da percentagem de indivíduos utilizando estes fármacos (n=5, 17,9% em cada grupo) e a dose de corticosteroide média nestes pontos do tempo. O mesmo foi verdadeiro para o período de observação, onde 5 dos 22 indivíduos que entraram neste período no grupo de CTLA4Ig, e 7 dos 17 indivíduos no grupo de placebo, tiveram tratamento com corticosteroides de baixa dose.

O número de cursos de uso de corticosteroide de dose alta durante o período de tratamento com o fármaco do estudo para a população de análise *Intent to Treat* (ITT) foi também semelhante para os 2 grupos: 3 cursos no grupo de CTLA4Ig (em 2 indivíduos) e 4 cursos no grupo de placebo (em 4 indivíduos). O uso de corticosteroide de dose alta durante o período de tratamento com o fármaco do estudo consistiu em corticosteroides intramusculares (IM) ou intra-articulares (IA); nenhum indivíduo em qualquer grupo recebeu uma dose de corticosteroide oral de ≥ 10 mg/dia durante o período de tratamento com o fármaco de estudo.

Durante o período de observação de 18 meses, o número

de cursos de corticosteroides de dose alta foi 9 no grupo de CTLA4Ig e 6 no grupo de placebo. Para 2 indivíduos em cada grupo de tratamento, corticosteroides de dose alta consistiram em doses orais ≥ 10 mg/dia. Nenhum indivíduo em qualquer grupo de tratamento recebeu mais do que 2 cursos de corticosteroides de dose alta durante os períodos de tratamento com o fármaco de estudo ou observação.

Todos os indivíduos no grupo de CTLA4Ig e a maioria dos indivíduos (96,4%) no grupo de placebo receberam pelo menos 1 medicação concomitante durante o período de observação de fármaco de estudo. Os analgésicos, acetaminofeno e diclofenaco, foram as medicações concomitantes mais frequentemente usadas, cada tomada por 7 (25,0%) indivíduos no grupo de CTLA4Ig e 9 (32,1%) indivíduos no grupo de placebo.

Resultados de Eficácia

Os resultados deste estudo mostram que 6 meses de tratamento com CTLA4Ig atrasam a progressão para RA definitiva em indivíduos com UA. No mês 12, 12 de 26 indivíduos (46,2%) com UA no grupo de CTLA4Ig desenvolveram RA em comparação com 16 de 24 indivíduos (66,7%) com UA no grupo de placebo. A CI de 95% circunjacente à diferença de grupo de tratamento de 20,5% em favor de CTLA4Ig para a finalidade de eficácia primária foi -47,4, 7,8. A proporção de indivíduos com UA que desenvolveram RA no mês 24 foi também menor no grupo de CTLA4Ig (17/23, 73,9%) em comparação com o grupo de placebo (21/24, 87,5%), embora a magnitude da diferença de tratamento (-13,6%; CI de 95%: -37,6, 10,8) fosse menor do que observado no mês 12.

A eficácia de CTLA4Ig no atraso da progressão para RA definitiva pareceu mais pronunciada no subgrupo de indivíduos que tiveram evidência radiográfica de erosões na referência em comparação com o subgrupo sem erosões de referência.

A proporção de indivíduos com UA que desenvolveram RA,

de acordo com os critérios de ARA de 1987, dentro de 1 ano de início da medicação de estudo, foi menor para o grupo de CTLA4Ig (12/26, 46,2%) em comparação com o grupo de placebo (16/24, 66,7%) (diferença de -20,5%; CI de 95%: -47,4, 7,8).

A análise de sensibilidade pré-especificada da finalidade de eficácia primária que incluiu cada dos 55 indivíduos randomizados e tratados incluídos na população de análise ITT de eficácia forneceu resultados semelhantes favorecendo CTLA4Ig. Na análise de sensibilidade, a proporção de indivíduos com UA que desenvolveram RA dentro de 1 ano de início da medicação de estudo foi 42,9% para o grupo de CTLA4Ig (12/28 indivíduos) em comparação com 59,3% (16/27 indivíduos) para o grupo de placebo (diferença do grupo de tratamento de -16,4%, CI de 95%: -42,3, 11,0).

Menos indivíduos com UA que foram atribuídos de forma aleatória para 6 meses de tratamento com CTLA4Ig (17/23, 73,9%) desenvolveram RA, definidos usando os critérios de ARA de 1987, no mês 24 em comparação com os indivíduos atribuídos para tratamento com placebo (21/24, 87,5%). A diferença de grupo de tratamento no desenvolvimento de RA no mês 24 foi -13,6% (CI de 95%: -37,6, 10,8). Embora o tratamento de estudo não fosse administrado após o mês 6, indivíduos e investigadores permaneceram cegos para a identidade do tratamento de estudo que foi administrado através do fim do período de observação de 18 meses (Mês 24).

O estudo mostra menos progressão estrutural, baseado em radiografias dos pés e mãos, no grupo de CTLA4Ig em comparação com o grupo de placebo no mês 12, como refletido por mudanças médias menores em erosão e pontuações de JSN. Além disso, imagens de MR realçadas com gadolínio dos pulsos e mãos num subgrupo de 21 indivíduos indicaram evidência mínima de progressão de doença no grupo de CTLA4Ig no final do período de tratamento com o fármaco de

estudo, enquanto mudanças médias de referência no mês 6 em pontuações de erosão, edema e sinovite de MRI no grupo de placebo foram indicativas de pioria da doença. A diferença de grupo de tratamento em pontuações de MRI persistiu durante 6 meses após o tratamento de estudo ter terminado.

A presença de sinovite foi exigida nos pontos de tempo da avaliação ou dia 1 para serem inscritos no estudo. A proporção de indivíduos com UA tendo sinovite clínica sintomática persistente no mês 6 foi menor entre os indivíduos tratados com CTLA4Ig (4/5, 80%) em comparação com o placebo (12/12, 100%). A diferença na proporção de indivíduos tendo sinovite clínica sintomática persistente entre os grupos de estudo foi -20,0% (CI de 95%: -71,5, 15,21). No mês 12, a proporção de indivíduos com sinovite clínica persistente foi 10 de 11 indivíduos para o grupo de CTLA4Ig e 7 de 7 indivíduos para o grupo de placebo.

Um total de 11 indivíduos no grupo de CTLA4Ig e 10 no grupo de placebo tiveram avaliações por MRI realçada com gadolínio das mãos e pulsos; por modelo de protocolo, MRIs foram apenas realizadas para indivíduos envolvidos em lugares de investigação na Europa. Mudanças médias de referência em pontuações de erosão óssea e sinovite de MRI das mãos e pulsos no final do período de tratamento com o fármaco de estudo (Mês 6) indicaram progressão da doença mínima no grupo de CTLA4Ig (mudanças médias de 0,45 e 0,27, respectivamente), enquanto as mudanças foram maiores e indicativas de pioria da doença no grupo de placebo (mudanças médias de 1,20 e 1,60, respectivamente). As mudanças médias de referência em pontuações de edema de MRI no mês 6 indicaram uma melhoria com CTLA4Ig (mudança média de -1,64), porém pioria com placebo (mudança média de 1,40).

Um padrão semelhante de resultados com respeito a pontuações de MRI foi observado no mês 12, onde 9 e 6 indivíduos nos grupos de CTLA4Ig e placebo, respectivamente,

tiveram uma MRI realizada tanto na linha de base quanto após 1 ano no estudo. No mês 12, mudança pequena em pontuações de erosão óssea, edema, e sinovite de MRI foi observada relativa aos valores de linha de base no grupo de CTLA4Ig (mudanças médias de 0,0, 0,22, e 0,22, respetivamente), enquanto progressão da doença contínua foi evidente no grupo de placebo (mudanças médias de 5,00, 6,67, e 2,33, respetivamente).

Apenas 7 indivíduos (5 CTLA4Ig, 2 placebo) tiveram avaliações de MRI na linha de base e mês 24. Neste pequeno subgrupo de indivíduos europeus que não progrediram para RA e desse modo permaneceram neste estudo, pontuações de MRI de linha de base médias foram pequenas (tipicamente <1,0), e mostraram mudança pequena no mês 24.

No final do período de tratamento com o fármaco de estudo (mês 6), indivíduos com UA no grupo de CTLA4Ig tiveram reduções em atividade de doença (pontuações de DAS 28 [CRP]) e melhoras em função física (pontuações de HAQ-DI) e qualidade de vida relacionada com a saúde (pontuações de PCS e MCS de SF-36) relativas à linha de base, enquanto pontuações médias destas variáveis de eficácia foram inalterados no grupo de placebo. Diferenças do grupo de tratamento foram menores nos meses 12 e 24 do período de observação não tratado.

No final do período de tratamento com o fármaco de estudo, a atividade da doença, como avaliado usando a pontuação de DAS 28 (CRP), foi reduzida relativa à linha de base no grupo de CTLA4Ig (mudança média, -1,13) porém foi inalterada no grupo de placebo (mudança média, 0,01). No mês 6, uma melhoria clinicamente significativa (reduzida pelo menos num valor de 1,2 a partir da linha de base na pontuação de DAS 28) foi observada em 8 dos 20 indivíduos (40%) com pontuações de linha de base e mês 6 no grupo de CTLA4Ig em comparação com 4 dos 20 indivíduos (20%) com pontuações de linha de base e mês 6 no grupo de placebo.

Compatíveis com estes achados, taxas maiores de atividade de doença baixa (pontuação de DAS 28 $\leq 3,2$) ou remissão de doença (pontuação de DAS 28 $< 2,6$) no mês 6 foram observadas no grupo de CTLA4Ig (81,0% e 71,4%, respectivamente) em comparação com o grupo de placebo (45,0% e 35,0%, respectivamente).

Avaliações de dados de DAS 28 (CRP) nos meses 12 e 24 continuaram a mostrar melhorias maiores em atividade da doença para o grupo de CTLA4Ig em comparação com o grupo de placebo, porém as diferenças de grupo de tratamento foram menores durante o período de observação não tratado. Entre os 18 indivíduos no grupo de CTLA4Ig com pontuações de DAS 28 de referência e mês 12, a pontuação de mudança média foi -0,50 no mês 12 e cerca de dois terços (68,4%) de indivíduos tiveram atividade da doença baixa. Entre os 13 indivíduos no grupo de placebo com dados de DAS 28 em ambos pontos do tempo, não existiu virtualmente nenhuma mudança em atividade da doença no mês 12 comparado à linha de base (mudança média, -0,05), e 53,9% de indivíduos tiveram atividade da doença baixa. Dos 11 indivíduos que tiveram pontuações de DAS 28 no mês 24, a remissão de doença foi observada em 4 dos 7 indivíduos de CTLA4Ig e 2 dos 4 indivíduos de placebo.

Durante o período de tratamento com o fármaco de estudo, melhorias maiores em atividade da doença, como refletido por mudanças médias maiores referência partir da linha de base e percentagem de indivíduos com melhoria, foram evidentes para o grupo de CTLA4Ig em comparação com o grupo de placebo tão cedo quanto o dia 29.

A proporção de indivíduos com uma melhoria clinicamente significativa na função física (definida como redução $\geq 0,3$ a partir da linha de base na pontuação de HAQ-DI) foi maior para o grupo de CTLA4Ig do que para o grupo de placebo nos meses 6, 12, e 24. No final do período de tratamento com o fármaco de estudo, 61,5% de indivíduos

randomizados e tratados no grupo de CTLA4Ig em comparação com 24,0% daqueles no grupo de placebo tiveram uma melhoria clinicamente significativa em HAQ-DI (diferença de grupo de tratamento de 37,5% [IC de 95%: 9,9, 61,4]). A proporção de indivíduos no grupo de CTLA4Ig que tiveram uma melhoria clinicamente significativa após 6 e 12 meses de seguimento não tratado (36,0% no mês 12 e 14,3% no mês 24) foi menor do que aquela observada após 6 meses de tratamento, mas no entanto, foi ainda numericamente maior do que as proporções com uma melhoria clinicamente significativa no grupo de placebo nos meses 12 e 24 (12,0% e 4,2%, respetivamente).

Melhorias médias maiores referência partir da linha de base nas medidas de sumário de componente físico e mental do SF-36 foram observadas para o grupo de CTLA4Ig nos meses 6, 12, e 24 em comparação com o grupo de placebo. A melhoria média referência partir da linha de base no final do período de tratamento com o fármaco de estudo (Mês 6) foi 10,23 para a pontuação de PCS e 2,54 para a pontuação de MCS no grupo de CTLA4Ig. Mudanças médias nas pontuações de sumário de componente físico (PCS) e sumário de componente mental (MCS) no mês 6 no grupo de placebo foram pequenas (1,95 e -0,30, respetivamente).

Entre os indivíduos no grupo de CTLA4Ig que permaneceram no estudo durante o período de observação não tratado, as melhorias médias nos meses 12 e 24 foram 3,83 e 2,46, respetivamente, para a pontuação de PCS e 2,50 e 3,75, respetivamente, para a pontuação de MCS. No grupo de placebo, pontuações de PCS e MCS pioraram durante o período de observação não tratado de 18 meses, como refletido por mudança média negativa média de valores de linha de base nos meses 12 e 24 para estas finalidades.

Pontuações radiográficas de linha de base indicaram erosão óssea mínima ou estreitamento do espaço articular entre os indivíduos randomizados, compatível com os critérios de elegibilidade do estudo que os indivíduos não

tenham um diagnóstico de RA na entrada do estudo. Durante o período de tratamento com o fármaco de estudo de 6 meses, existiu mudança pequena em erosão radiográfica, JSN, ou pontuações totais relativas à linha de base, como refletido por pontuações de mudança média no mês 6 para todas 3 finalidades de $\leq 0,13$ no CTLA4Ig e de $\leq 0,47$ no grupo de placebo. Existiu uma sugestão de menos progressão estrutural no grupo de CTLA4Ig em comparação com o grupo de placebo no mês 12, onde a mudança média na pontuação total foi 0,02 no grupo de CTLA4Ig e 1,11 no grupo de placebo.

Resultados de análise de pontuações de erosão radiográfica e JSN imputada mostraram mudanças médias menores, indicativas de menor progressão estrutural, após 6 e 12 meses após o fim do período de tratamento com o fármaco de estudo (isto é, meses 12 e 24) no grupo de CTLA4Ig (mudança média em pontuações totais de 0,29 e 0,02) em comparação com o grupo de placebo (1,21 e 2,13).

Indivíduos no grupo de CTLA4Ig mostraram melhorias percentuais médias nos componentes de ACR individuais durante o período de tratamento com o fármaco de estudo. No mês 6, as melhorias percentuais médias em avaliações de articulações frágeis, articulações inchadas, e dor avaliada pelo indivíduo foram 64,91%, 57,34%, e 70,03%, respetivamente. Em comparação, indivíduos no grupo de placebo mostraram uma pioria em componentes núcleo individuais de ACR durante o período de tratamento com o fármaco de estudo, com mudanças percentuais médias em taxas de articulações frágeis, articulações inchadas, e dor avaliada pelo indivíduo de -63,3%, -10,5%, e -83,4%, respetivamente.

As melhorias percentuais médias nos componentes núcleo de ACR observadas para o grupo de CTLA4Ig durante o período de tratamento com o fármaco do estudo não foram mantidas uma vez que o tratamento de estudo foi interrompido entre os indivíduos que permaneceram no estudo.

As finalidades de eficácia primária e secundária relacionada, bem como as características da doença de base e demográficas, foram examinados separadamente para subgrupos definidos com base na presença ou ausência de erosões na entrada do estudo (isto é, estratos de randomização).

As características demográficas foram semelhantes entre o subgrupo de 31 indivíduos com evidência radiográfica de erosão na linha de base e o subgrupo de 25 indivíduos sem evidência radiográfica de erosão na linha de base. As características da doença de base foram também similares para estes 2 subgrupos, exceto que a pontuação de erosão radiográfica mediana e média foi maior para o subgrupo com erosões de linha de base do que no subgrupo sem erosões de linha de base.

Entre o subgrupo de indivíduos com evidência radiográfica de erosão na linha de base, a proporção de indivíduos com UA que desenvolveram RA, de acordo com os critérios de ARA de 1987, dentro de 1 ano de início da medicação de estudo, foi menor para o grupo de CTLA4Ig (4/13, 30,8%) do que para o grupo de placebo (9/14, 64,3%). Entre o subgrupo de indivíduos sem evidência radiográfica de erosões na linha de base, 61,5% de indivíduos no grupo de CTLA4Ig (8/13) e 70,0% de indivíduos no grupo de placebo (7/10) desenvolveram RA no mês 12.

A proporção de indivíduos com UA que desenvolveram RA no mês 24 foi menor para o grupo de CTLA4Ig do que para o grupo de placebo apenas entre os indivíduos que tiveram evidência radiográfica de erosões na linha de base (50,0% [6/12 indivíduos] para CTLA4Ig; 85,7% [12/14 indivíduos] para placebo). Entre o subgrupo de indivíduos que não tiveram nenhuma evidência radiográfica de erosões na linha de base, 100% de indivíduos no grupo de CTLA4Ig (11/11) e 90% de indivíduos no grupo de placebo (9/10) desenvolveram RA no mês 24.

Segurança

CTLA4Ig, administrado IV mensalmente numa dose ligada ao peso de 10 mg/kg durante até 6 meses, foi geralmente bem tolerado no tratamento de adultos com UA. Nenhuma morte foi relatada durante o estudo. Durante o período de tratamento com o fármaco de estudo, SAEs foram relatadas para 1 indivíduo no grupo de CTLA4Ig (carcinoma de célula basal) e 1 indivíduo no grupo de placebo (ciática). Ambas SAEs foram avaliadas pelo investigador como não relacionadas ao tratamento de estudo. Um (1) indivíduo cada nos grupos de CTLA4Ig e placebo foi descontinuado do tratamento durante o período de tratamento com o fármaco do estudo devido a uma AE. AEs infusionais agudas (relatadas dentro de 1 hora do início da infusão de fármaco de estudo) foram relatadas para 1 indivíduo em cada grupo de tratamento; a AE infusional aguda no grupo de CTLA4Ig (dispneia) ocorreu durante a primeira infusão e resultou em descontinuação do tratamento. Infecções ou infestações foram relatadas durante o período de tratamento com o fármaco do estudo numa percentagem semelhante de indivíduos nos grupos de CTLA4Ig (35,7%) e placebo (39,3%). Nenhuma das infecções relatadas no grupo de CTLA4Ig foi grave em intensidade. Durante o período de tratamento com o fármaco de estudo, AEs foram reportadas para uma percentagem semelhante de indivíduos nos grupos de CTLA4Ig (64,3%) e placebo (71,4%). Todas AEs no grupo de CTLA4Ig foram ligeiras ou moderadas em intensidade. Nenhum resultado de segurança emergiu dos dados de avaliação de laboratório ou sinal vital.

Globalmente, AEs foram relatadas para 18 (64,3%) indivíduos tratados com CTLA4Ig e 20 (71,4%) indivíduos tratados com placebo durante o período de tratamento com o fármaco do estudo ou dentro de 56 dias da última infusão de medicação de estudo. As frequências de eventos adversos foram geralmente semelhantes para os grupos de CTLA4Ig e placebo. As AEs mais frequentemente relatadas por classe de

órgão de sistema (SOC) foram infecções e infestações (35,7% de CTLA4Ig; 39,3% de placebo), gastrointestinais (21,4% de CTLA4Ig; 25,0% de placebo), e respiratórias, distúrbios torácicos e mediastinais (17,9% de CTLA4Ig; 21,4% de placebo). Eventos adversos relatados por pelo menos 10% de indivíduos em qualquer grupo de tratamento durante o período de tratamento de estudo foram diarreia (14,3% de CTLA4Ig; 10,7% de placebo), cefaleia (10,7% de CTLA4Ig; 7,1% de placebo), nasofaringite (10,7% de CTLA4Ig; 7,1% de placebo), infecção do trato urinário (7,1% de CTLA4Ig; 10,7% de placebo), dor faringolaríngea (3,6% de CTLA4Ig; 14,3% de placebo), e gastroenterite (0% de CTLA4Ig; 10,7% de placebo). Nenhum distúrbio autoimune foi relatado durante o período de tratamento de estudo em qualquer grupo de tratamento.

A proporção de indivíduos no grupo de placebo com AEs de intensidade grave foi 10,7% (AEs graves únicas de ciático, infecção viral, edema faríngeo). Nenhum indivíduo no grupo de CTLA4Ig teve uma AE durante o período de tratamento com o fármaco do estudo que foi considerada de grave a muito grave em intensidade de acordo com o investigador.

A frequência de AEs relacionadas foi 50% (n=14) para o grupo de CTLA4Ig e 35,7% (n=10) para o grupo de placebo durante o período de tratamento com o fármaco de estudo. A AE relacionada individual mais comum foi cefaleia, relatada para 3 indivíduos (10,7%) no grupo de CTLA4Ig e 2 indivíduos (7,1%) para o grupo de placebo. Eczema foi a única outra AE relacionada relatada por >1 indivíduo tratado com CTLA4Ig, e foi relatada para 2 indivíduos (7,1%).

Os dados laboratoriais clínicos foram geralmente não notáveis, e nenhum resultado de segurança foi identificado nesta população com UA.

Durante o período de tratamento com o fármaco de

estudo, a frequência de parâmetros hematológicos e bioquímicos que alcançaram os critérios de anormalidade marcada (MA) definida pelo responsável foi pequena e semelhante nos grupos de CTLA4Ig e placebo. Para cada parâmetro de hematologia e bioquímica, MAs foram identificadas para 2 ou menos indivíduos em qualquer grupo de tratamento.

Mudanças pequenas a partir da linha de base (dia 1) em parâmetros hematológicos e bioquímicos foram observadas durante os períodos de tratamento com o fármaco de estudo e observação, e estas mudanças mostraram variação considerável e nenhum padrão compatível através de 2 grupos.

Adicionalmente, níveis de neutrófilos, ALT e AST sanguíneos permaneceram estáveis após o tratamento com CTLA4Ig durante a totalidade do período de estudo. Nenhum indivíduo em qualquer grupo de tratamento teve um valor de ALT ou AST que foi $> 3 \times \text{ULN}$ (limite superior do normal) em qualquer ponto do tempo de medição, ou um valor de contagem de neutrófilos que foi $< 0,5 \times 10^9$ células/L ou $> 15 \times 10^9$ células/L.

Dois indivíduos tiveram anormalidades de laboratório relatadas como uma AE durante o período de tratamento com o fármaco de estudo. Enzimas hepáticas aumentadas foram relatadas como uma AE num indivíduo no grupo de CTLA4Ig no Dia 141, e persistiram durante 120 dias antes da resolução, nenhum valor de enzima hepática neste indivíduo alcançou os critérios de MA. Trombocitopenia foi relatada como uma AE num indivíduo no grupo de placebo e levou à descontinuação de tratamento de estudo. Valores de contagem de plaquetas para este indivíduo foram 284×10^{-9} c/L na linha de base e diminuíram de forma estável durante o estudo, e foram 86×10^{-9} c/l no Dia 169 e 22×10^{-9} c/l no último valor registrado no dia 319.

Valores médios para todos os parâmetros de sinal vital

permaneceram estáveis durante todo o período de tratamento com o fármaco de estudo nos grupos de CTLA4Ig e placebo.

A maioria dos indivíduos em ambos os grupos de tratamento teve um ECG normal na linha de base e novamente no final do período de tratamento com o fármaco de estudo. A proporção de indivíduos cujo ECG foi normal na referência porém anormal no Dia 169 (ou no momento de término precoce) foi semelhante para os grupos de CTLA4Ig (1/24, 4,2%) e placebo (2/23, 8,7%).

Resultados Farmacodinâmicos

O tratamento com CTLA4Ig foi associado com reduções médias a partir da linha de base no mês 6 em IL-6 (-4,49 pg/ml), TFN- α (-1,70 pg/ml), IL-1 β (-0,12 pg/ml), e MMP-3 (-2,29 ng/ml). Em comparação, aumentos médios pequenos ou nenhuma mudança relativos à linha de base foram observados no grupo de placebo no mês 6 quanto a IL-6 (1,08 pg/ml), TFN- α (0,07 pg/ml), IL-1 β (-0,09 pg/ml), e MMP-3 (14,34 ng/ml).

Após 6 meses sem nenhum tratamento de estudo, o grupo de CTLA4Ig ainda tinha diminuições médias maiores para a maioria destas citocinas comparado ao grupo de placebo. No mês 12, mudanças médias a partir da linha de base para os grupos de CTLA4Ig e placebo foram -0,14 e 6,37 pg/ml, respectivamente, para IL-6; -0,50 e -0,10 pg/ml, respectivamente, para TFN- α ; e -2,55 e 25,34 ng/ml, respectivamente, para MMP-3. Nenhuma diferença foi observada entre os 2 grupos na mudança média de referência para IL-1 β no mês 12 (-0,09 e -0,24 pg/ml); no entanto, o número de indivíduos com dados de referência e mês 12 foi pequeno (n=7 em grupo de placebo e n=13 em grupo de CTLA4Ig).

Apenas 5 indivíduos no grupo de CTLA4Ig e 3 no grupo de placebo tinham dados de citocina de referência e mês 24. Uma diminuição média em IL-6 e TFN- α foi ainda evidente neste pequeno subgrupo de indivíduos tratados com CTLA4Ig que não desenvolveram RA (-3,44 pg/mL e -0,82 pg/mL,

respetivamente).

Todos os indivíduos foram positivos para anticorpos anti-CCP2 no Dia 1, compatíveis com os critérios de elegibilidade de estudo. No grupo de placebo, todos os indivíduos com dados avaliáveis permaneceram positivos nos meses 6, 12, e 24. Em comparação, a percentagem de indivíduos com UA que foram positivos para anticorpos anti-CCP2 diminuiu no grupo de CTLA4Ig para 90,9% (20/22 indivíduos) no mês 6, 86,7% (13/15 indivíduos) no mês 12, e 83,3% (5/6 indivíduos) no mês 24.

Estes dados são compatíveis com os resultados para níveis séricos de anticorpos anti-CCP2. No grupo de CTLA4Ig, reduções médias a partir da linha de base foram observadas em anticorpos anti-CCP2 no mês 6 (-94,5 U/L) e mês 12 (-6,46 U/L). No grupo de placebo, os níveis de anticorpos anti-CCP2 foram aumentados em relação aos valores de referência no mês 6 (mudança média, 16,32 U/l) e mês 12 (149,5 U/l). Apenas 6 indivíduos no grupo de CTLA4Ig e 3 no grupo de placebo tinham dados anti-CCP2 de linha de base e mês 24. Um (1) destes indivíduos de CTLA4Ig foi negativo para anticorpos anti-CCP2.

Na linha de base (Dia 1), 85,7% de indivíduos no grupo de CTLA4Ig e 71,4% de indivíduos no grupo de placebo foram RF positivos. No grupo de CTLA4Ig, esta percentagem diminuiu para 59,1% no final do período de tratamento com o fármaco de estudo (Mês 6). Após 6 e 18 meses de seguimento não tratado, a proporção de indivíduos que permaneceram no estudo que foram positivos para RF foi 11 de 15 (73,3%) no mês 12 e 3 de 6 (50,0%) no mês 24. Em comparação, a proporção de indivíduos no grupo de placebo que foram positivos para RF aumentou durante o estudo de 24 meses (14 de 20 [70,0%] no mês 6 para 3 de 3 [100%] no mês 24).

Nenhum indivíduo no grupo de CTLA4Ig teve uma seroconversão para positivo a RF no mês 6, 12, ou 24. No grupo de placebo, 2 dos 7 indivíduos avaliados que foram RF

negativos na linha de base foram positivos no mês 6, e 1 dos 2 indivíduos avaliáveis que foram RF negativos na linha de base foi positivo no mês 12.

Na linha de base (Dia 1), a percentagem de indivíduos para os quais o alelo de epítopo compartilhado HLA-DRB10401, HLA-DRB10404, e HLA-DRB10101 foi detetado, foi semelhante para os grupos de CTLA4Ig (46,4% [13/28]) e placebo (39,3% [11/28]).

Imunogenicidade

Os dados de imunogenicidade foram disponíveis de um total de 23 dos 28 indivíduos randomizados e tratados no grupo de CTLA4Ig. Nenhum indivíduo foi seropositivo para anticorpos anti-CTLA4Ig (específicos para a porção IgG da molécula) em qualquer momento durante o período de estudo de 24 meses.

Quatro (4) dos 23 indivíduos (17,4%) foram seropositivos no ensaio anti-CTLA4-T (Tip). Nestes 4 indivíduos, anticorpos anti-CTLA4-T não foram detetados em 3 meses após a última dose (amostra do mês 9) porém foram detetados 6 meses após a última dose (amostra do mês 12). Os títulos nestes indivíduos foram baixos (faixa: 65 a 98; a sensibilidade do ensaio é 25). Destas 4 amostras, 2 continham anticorpos neutralizantes e 2 não continham.

A presença de uma resposta de seroconversão de anticorpo positiva não pareceu afetar a segurança. Nenhuma AE foi relatada no indivíduo ou em proximidade temporal à resposta de seroconversão positiva nos indivíduos. Num indivíduo, tenossinovite foi relatada com um início no Dia 384, aproximadamente 6 meses após a última dose de fármaco de estudo (CTLA4Ig) e próxima ao momento da resposta de seroconversão positiva. Esta AE foi avaliada como improvavelmente relacionada ao tratamento de estudo e moderada em intensidade, e foi relatada como persistindo.

Conclusões Gerais

Resultados para finalidades de eficácia primária e

secundária essencial relacionada neste estudo sugerem que CTLA4Ig, administrado como monoterapêutica durante 6 meses numa dose ligada ao peso de 10 mg/kg IV, atrasa a progressão para RA definitiva em indivíduos com UA, e os efeitos de CTLA4Ig modificadores da doença foram observados 6 e 18 meses após o fármaco ser interrompido. Em indivíduos com UA, maiores melhorias na função física, atividade da doença relatada pelo médico, e qualidade de vida relacionada com a saúde foram observadas seguindo 6 meses de tratamento com CTLA4Ig do que com placebo. Avaliações radiográficas das mãos e pés indicaram mínima progressão da doença durante o período de tratamento com fármaco do estudo entre indivíduos recebendo CTLA4Ig; a progressão de dano estrutural foi também menos de 6 meses após o fármaco ser interrompido no grupo de CTLA4Ig do que no grupo de placebo. Avaliações de MRI dos pulsos e mãos foram mais limitadas, porém mostraram uma tendência semelhante. Em comparação com o placebo, o tratamento com CTLA4Ig foi associado com uma maior redução nos níveis séricos de anticorpos anti-CCP2 e um decréscimo na percentagem de indivíduos que foram positivos para anticorpos anti-CCP2 e RF. CTLA4Ig numa dose ligada ao peso de 10 mg/kg administrada IV mensalmente durante 6 meses foi bem tolerado por indivíduos com UA. A taxa de imunogenicidade (seroconversão positiva induzida por fármaco) foi baixa, e a presença de anticorpos para CTLA4Ig ou CTLA4-T não se correlacionou com quaisquer achados de segurança clínica neste estudo exploratório.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Bristol-Myers Squibb Company Vratsanos, George

<120> MÉTODO DE PREVENIR O DESENVOLVIMENTO DE ARTRITE REUMATOIDE EM INDIVÍDUOS COM ARTRITE NÃO DIFERENCIADA

<130> 11268 NP

<150> 61/050,336 <151> 05-05-2008

<160> 2

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 1223

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (11) .. (1159)

<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

```

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		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	Val	Phe	Leu	Phe		180	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
			175								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	
					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	cgg	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	

EP2279206B1

	370	375	380	
	ggt aaa tgagtgcgac ggccggcaag ccccgctccc cgggctctcg cggtcgcacg			1209
	Gly Lys			
	aggatgcttc taga			1223

<210> 2
<211> 383
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

EP2279206B1

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

	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				

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 2005196402 A [0012]
- US 20040022787 A [0012] [0037] [0086]
- US 7094874 B [0037]
- US 20030083246 A [0037] [0086]
- US 20050019859 A [0061]
- US 7332303 B [0061]
- US 752267 P [0068]
- US 2006049074 W [0068]
- US 75215005 P [0070]
- US 2006062297 W [0070]
- US 752150 P [0070]
- US 61050336 B [0298]

Documentos de não patente citados na descrição

- **WOLFE, F.** The epidemiology of drug treatment failure in rheumatoid arthritis. *Baillieres Clin. Rheuma-tol.*, November 1995, vol. 9 (4), 619-632 [0002]
- **HOCHBERG, M.C. et al.** Epidemiology of rheumatoid arthritis: update. *Epidemiol. Rev.*, 1990, vol. 12, 247-252 [0002]
- **MARKENSON, J.A.** Worldwide trends in the socio-economic impact and long-term prognosis of rheumatoid arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.*, October 1991, vol. 21 (2), 4-12 [0002]

- **SPECTOR, T.D.** Rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, August 1990, vol. 16 (3), 513-537
[0002]
- Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis.
ZVAIFLER, N.J. Arthritis and Allied Conditions. Lea & Febiger, 1993, 723-736 [0002]
- **EMERY, P.** The Optimal Management of Early Rheumatoid Disease: The Key to Preventing Disability. *Br. J. Rheum.*, 1994, vol. 33, 765-768 [0003]
- **MCGONAGLE, D. et al.** The relationship between synovitis and bone changes in early untreated rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1999, vol. 42, 1706-1711
[0003]
- **WAKEFIELD, R.J. et al.** The value of sonography in the detection of bone erosion in patients with rheumatoid arthritis: A comparative study with conventional radiography. *Arthritis Rheum.*, 2000, vol. 43, 2761-2770
[0003]
- **VAN GAALEN, F.A. et al.** Autoantibodies to Cyclic Citrullinated Peptides Predict Progression to Rheumatoid Arthritis in Patients with Undifferentiated Arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2004, vol. 50 (3), 709-715
[0004] [0097]
- **KONTTINEN, Y.T. et al.** Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates. *Arthritis Rheum.*, January 1981, vol. 24 (1), 71-79 [0005] [0006]
- **FORRE, O. et al.** 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.*, February 1982, vol. 15 (2), 227-231 [0006]
- **VAN-BOXEL, J.A. et al.** Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes. *N. Engl. J. Med.*,

September 1975, vol. 293 (11), 517-520 [0006]

- **KIDD, B.L. et al.** Immunohistological features of synovitis in ankylosing spondylitis: a comparison with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, February 1989, vol. 48 (2), 92-98 [0006]
- **CUSH, J.J. et al.** Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from subjects with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, October 1988, vol. 31 (10), 230-238 [0006]
- **LAFFON, A. et al.** Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, August 1991, vol. 88 (2), 546-552 [0006]
- **KLARESKOG, L. et al.** Relationship between HLA DR expressing cells and T lymphocytes of different subsets in rheumatoid synovial tissue. *Scand. J. Immunol.*, May 1981, vol. 15 (5), 501-507 [0006]
- **FIRESTEIN, G.S. et al.** How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?. *Arthritis Rheum.*, June 1990, vol. 33 (6), 768-773 [0006]
- **FIRESTEIN, G.S. et al.** Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid. *J. Immunol.*, 01 May 1990, vol. 144 (9), 3347-3353 [0006]
- **ZVAIFLER, N.J. et al.** Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, June 1994, vol. 37 (6), 783-789 [0007]
- **BALSA, A. et al.** Differential expression of the costimulatory molecules B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) in rheumatoid synovial tissue. *Br. J. Rheumatol.*, January 1996, vol. 35 (1), 33-37 [0008]
- **LIU, M.F. et al.** The presence of costimulatory molecules CD86 and CD28 in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum.*, January 1996, vol. 39 (1), 110-114 [0008]
- **RANHEIM, E.A. et al.** Elevated expression of CD80 (B7/BB1) and other accessory molecules on synovial fluid

mononuclear cell subsets in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, November 1994, vol. 37 (11), 1637-1646 [0008]

- **SFIKAKIS, P.P. et al.** Expression of CD28, CTLA4, CD80, and CD86 molecules in subjects with autoimmune rheumatic diseases: implications for immuno-therapy. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, June 1997, vol. 83 (3), 195-198 [0008]

- **THOMAS, R. et al.** Functional differentiation of dendritic cells in rheumatoid arthritis: role of CD86 in the synovium. *J. Immunol.*, 15 April 1996, vol. 156 (8), 3074-3086 [0008]

- **REDLICH, K. et al.** Rheumatoid Arthritis Therapy After Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Blockade. *Arthritis Rheum.*, 2003, vol. 40 (12), 3308-3319 [0009]

- **HARRISON, B.J. et al.** Natural remission in inflammatory polyarthritis: issues of definition and prediction. *Br. J. Rheumatol.*, 1996, vol. 35, 1096-1100 [0009]

- Evaluation and management of early inflammatory polyarthritis. **QUINN, M.A. et al.** *Rheumatology*. Elsevier Limited, 2003, 885-891 [0009]

- **SALEEM, B. et al.** *Rheumatology*, Academic Unit of Musculoskeletal Disease, Leeds. *United Kingdom, Ann. Rheum. Dis.*, 2007, vol. 66 (II), 186 [0010]

- **FRIES, J.F. et al.** *J. Rheumatology*, 1982, vol. 9, 789-793 [0021] [0083]

- **FELSON, D.T. et al.** *Arthritis Rheum.*, 1993, vol. 36, 729-740 [0024]

- **FELSON, D.T. et al.** *Arthritis Rheum.*, 1995, vol. 38, 1-9 [0024]

- **VAN DER MERWE, P. et al.** *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 185 (3), 393-404 [0042]

- **CHANG et al.** *Nature*, 1977, vol. 198, 1056 [0045]

- **GOEDDEL et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0045]

- **SHIMATAKE et al.** *Nature*, 1981, vol. 292, 128 [0045]
- **COHEN.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, vol. 69, 2110 [0047]
- *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press, 1989 [0047]
- **CHASIN et al.** *Som. Cell. Molec. Genet.*, 1986, vol. 12, 555-556 [0048]
- **KOLKEKAR.** *Biochemistry*, vol. 36, 10901-10909 [0048]
- **FIERS et al.** *Nature*, 1973, vol. 273, 113 [0050]
- **KARIN et al.** *Nature*, 1982, vol. 299, 797-802 [0050]
- **BROACH.** *Meth. Enzymol.*, 1983, vol. 101, 307 [0054]
- **STINCHCOMB et al.** *Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0054]
- **TSCHEMPER et al.** *Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0054]
- **CLARKE et al.** *Meth. Enzymol.*, 1983, vol. 101, 300 [0054]
- **HESS et al.** *J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7, 149 [0055]
- **HOLLAND et al.** *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0055]
- **TOYAMA et al.** *FEBS*, 1990, vol. 268, 217-221 [0055]
- **HITZEMAN et al.** *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 2073 [0055]
- *Guidance for Industry: Clinical Development Programs for Drugs, Devices, and Biological products for the Treatment of Rheumatoid Arthritis*, February 1999 [0083]
- **OSTERGAARD, M. et al.** OMERACT Rheumatoid Arthritis Magnetic Resonance Imaging Studies. Core Set of MRI Acquisitions, Joint Pathology Definitions, and the OMERACT RA-MRI Scoring System. *J. Rheumatology*, 2003, vol. 30 (6), 1385-1386 [0135]
- Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2000, vol. 161, 5221-5247 [0172]
- Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am. J. Respir. Crit.*

Care Med., 2000, vol. 161, 1376-1395 [0172]

- **FRIES, J.F. et al.** Measurement of Subject Outcome in Arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1980, vol. 23, 137-145

[0214]

- **BIRRELL, F.N. et al.** How does the Short Form 36 Health Questionnaire (SF-36) in Rheumatoid Arthritis (RA) Relate to RA Outcome Measures and SF-36 Population Values? A Cross-Sectional Study. *Clin. Rheumatol.*, 2000, vol. 19, 195-199 [0215]

- **KELLER, S.D et al.** The SF-36 Arthritis-Specific Health Index (ASHI): n. Tests of validity in four clinical trials. *Med. Care*, May 1999, vol. 37 (5), MS51-60

[0215]

- **WARE, J.E. et al.** The SF-36 Arthritis-Specific Health Index (ASHI): I. Development and cross-validation of scoring algorithms. *Med. Care*, May 1999, vol. 37 (5), MS40-50 [0215]

- **KOSINSKI, M. et al.** 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*, May 1999, vol. 37 (5), MS23-39 [0215]

- Guidance for Industry, Clinical Development Programs for Drugs, Devices, and Biological Products for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. U.S. Department of Health and Human Services, February 1999 [0215]

Lisboa, 18 de Junho de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Uma molécula de CTLA4, em que a molécula de CTLA4 se liga a CD80 e/ou CD86 e compreende um domínio extracelular de CTLA4 como mostrado em SEQ ID NO:2 começando com alanina na posição 26 ou metionina na posição 27 e terminando com ácido aspártico na posição 150, para utilização no tratamento de artrite não diferenciada (UA).
2. A molécula para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a molécula de CTLA4 compreende adicionalmente uma sequência de aminoácidos que altera a solubilidade ou afinidade da molécula de CTLA4.
3. A molécula para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a sequência de aminoácidos que altera a solubilidade ou afinidade compreende uma imunoglobulina.
4. A molécula para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que a imunoglobulina é uma região constante de imunoglobulina ou porção da mesma.
5. A molécula para utilização de acordo com a reivindicação 4, em que uma região constante de imunoglobulina ou porção da mesma é mutada para reduzir a função efetora.
6. A molécula para utilização de acordo com a reivindicação 4, em que uma região constante de imunoglobulina ou porção da mesma compreende uma articulação, regiões CH2 e CH3 de uma molécula de imunoglobulina humana ou de macaco.
7. A molécula para utilização de acordo com a reivindicação 5, em que uma região constante de imunoglobulina ou porção da mesma compreende regiões de dobradiça, CH2 e CH3 de uma molécula de imunoglobulina humana ou de macaco.

8. A molécula para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a molécula de CTLA4 compreende:

- (a) uma sequência de aminoácido começando com metionina na posição 27 e terminando com lisina na posição 383 de SEQ ID NO:2, ou
- (b) uma sequência de aminoácido começando com alanina na posição 26 e terminando com lisina na posição 383 de SEQ ID NO:2.

9. A molécula para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 8, para reduzir um sintoma de UA.

10. A molécula para utilização de acordo com a reivindicação 9, em que o sintoma é selecionado do grupo consistindo em inchaço da articulação, sensibilidade da articulação, inflamação, rigidez matinal e dor.

11. A molécula para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que a molécula de CTLA4 é uma molécula de fusão CTLA4 solúvel que é para ser administrada a um indivíduo numa quantidade de 10 mg/kg de peso do indivíduo.

12. A molécula para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 8, para inibir dano estrutural.

13. A molécula para utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o dano estrutural é selecionado a partir do grupo que consiste em erosão no pulso e mão, edema da medula óssea no pulso e mão, sinovite no pulso e mão.

Lisboa, 18 de Junho de 2015

FIG. 1

1 AGCTTCACCA ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG
 M G V L L T Q R T L
 ↳ Sequência de Sinal de Oncostatina M →
 41 CTC AGT CTG GTC CTT GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG
 L S L V L A L L F P S M A

 80 AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC CAG CCT GCT GTG GTA CTG
 S M A M H V A Q P A V V L
 ↳ CTLA4 Humana →
 119 GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT GTG TGT GAG TAT
 A S S R G I A S F V C E Y

 158 GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG ACA GTG
 A S P G K A T E V R V T V

 197 CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG
 L R Q A D S Q V T E V C A

 236 GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT
 A T Y M M G N E L T F L D

 275 GAT TCC ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG
 D S I C T G T S S G N Q V

 314 AAC CTC ACT ATC CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA
 N L T I Q G L R A M D T G

 353 CTC TAC ATC TGC AAG GTG GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA
 L Y I C K V E L M Y P P P

 392 TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA ACC CAG ATT TAT GTA
 Y Y L G I G N G T Q I Y V

 431 ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAT CAG GAG CCC
 I D F E P C P D S D Q E P

 470 AAA TCT TCT GAC AAA ACT CAC ACA TCC CCA CCG TCC CCA
 K S S* D K T H T S* P P S* P
 ↳ Dobradiça de IgG₁ Humana →
 509 GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA TCG TCA GTC TTC CTC TTC
 A P E L L G G S* S V F L F
 ↳ Domínio C_H2 de IgG₁ Humana →
 548 CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CCG ACC
 P P K P K D T L M I S R T

FIG. 2

