



DYN
NOV

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

07-100286

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII)

CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K31/00//A61K39/395
A61P37/06

71. SOLICITANTE GENENTECH, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C. 26

SS

PETITORIO

AS: 105.255



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-100286-00000-0000

Fecha: 2007-09-26 16:47:00
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 270

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

15/11/2007

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **GENENTECH, INC.**

Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco,
California 94080-4990, Estados Unidos de América
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de
América
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América
Teléfono: Fax:
E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**

Dirección: Cra. 7 No. 71-21 Torre B – Piso 4,
Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 80.410.337 TP 57492

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: **Sheila GUJRATHI.**

Dirección: 682 Clipper Street, San Francisco, California 94114, Estados Unidos de
América.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/013780

Fecha 13-04-2006

Publicación Internacional No. WO 2006/113308 A1

Fecha 26-10-2006

6 Título (54): TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII)

7 Clasificación Internacional (51): A61K31/00 // A61K39/395 // A61P37/06

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

15-04-2005

(31) Número de Solicitud

60/671,902

9 Comprobante de pago No. 07- 72, 601

Fecha 26-09-2007

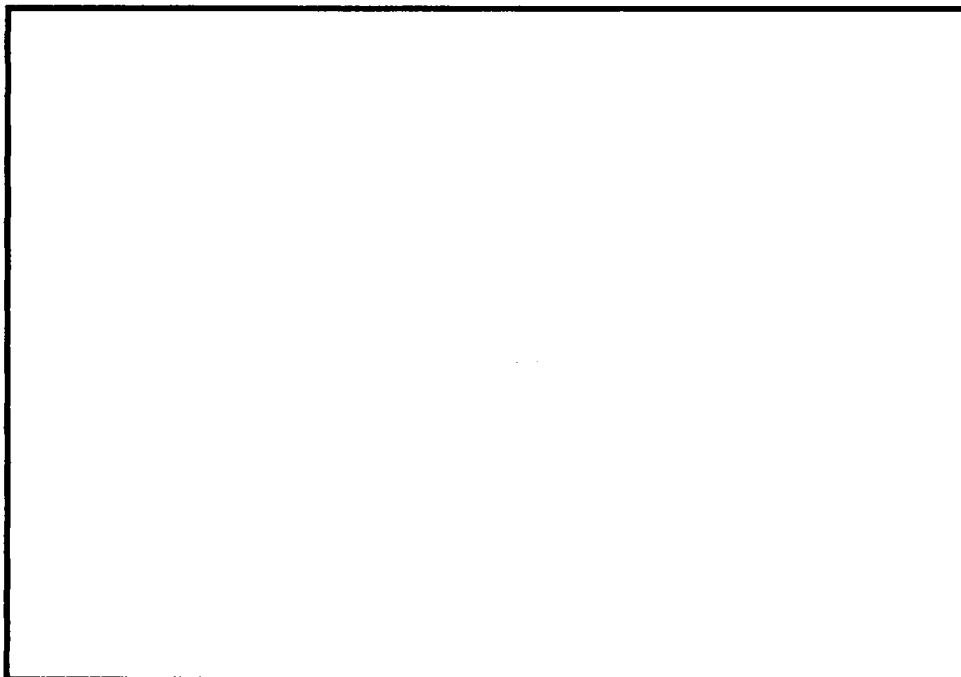
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$482,000
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: Tarjeta de Propietarios
Listado de Secuencias
Documentos PCT

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:

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

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

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-100286- -00000-0000

Fecha: 2007-09-26 16:47:00 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 270RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 72,601
FECHA : SEPTIEMBRE 10 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	59040581	10/09/2007	2,430,000.00
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	62762483	10/09/2007	32,280,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

1

1. The first part of the report is a summary of the work done during the year.

2. The second part is a detailed account of the work done during the year.

3. The third part is a summary of the work done during the year.

4. The fourth part is a summary of the work done during the year.

5. The fifth part is a summary of the work done during the year.

6. The sixth part is a summary of the work done during the year.

7. The seventh part is a summary of the work done during the year.

8. The eighth part is a summary of the work done during the year.

9. The ninth part is a summary of the work done during the year.

10. The tenth part is a summary of the work done during the year.

11

12. The twelfth part is a summary of the work done during the year.

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 October 2006 (26.10.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/113308 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number:

PCT/US2006/013780

(22) International Filing Date: 13 April 2006 (13.04.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/671,902 15 April 2005 (15.04.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENEN-
TECH, INC. [US/US]; 1 Dna Way, Ms 49, South San Fran-
cisco, California 94080 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): GUJRATHI, Sheila
[US/US]; 682 Clipper Street, San Francisco, California
94114 (US).

(74) Agents: LEE, Wendy, M. et al.; c/o GENENTECH, INC.,
1 Dna Way, MS 49, South San Francisco, CA 94080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

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

Published:

— with international search report

(48) Date of publication of this corrected version:

18 January 2007

(15) Information about Correction:

see PCT Gazette No. 03/2007 of 18 January 2007

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

(54) Title: METHOD FOR TREATING INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD) BY AN ANTI-CD20 ANTIBODY

(57) Abstract: The present invention concerns treatment of IBD, especially ulcerative colitis (UC), with an antibody that binds to CD20.

WO 2006/113308 A1

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
26 October 2006 (26.10.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/113308 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2006/013780

(22) International Filing Date: 13 April 2006 (13.04.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/671,902 15 April 2005 (15.04.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 Dna Way, Ms 49, South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): GUJRATHI, Sheila [US/US]; 682 Clipper Street, San Francisco, California 94114 (US).

(74) Agents: LEE, Wendy, M. et al.; c/o GENENTECH, INC., 1 Dna Way, MS 49, South San Francisco, CA 94080 (US).

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

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

Published:

— with international search report

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

(54) Title: METHOD FOR TREATING INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD) BY AN ANTI-CD20 ANTIBODY

(57) Abstract: The present invention concerns treatment of IBD, especially ulcerative colitis (UC), with an antibody that binds to CD20.

WO 2006/113308 A1

**METHOD FOR TREATING INFLAMMATORY BOWEL DISEASE
(IBD) BY AN ANTI-CD20 ANTIBODY**

This is a non-provisional application claiming priority under 35 USC §119 to provisional application no. 60/671,902 filed April 15, 2005, the entire disclosure of which is hereby incorporated by reference.

Field of the Invention

The present invention concerns treatment of IBD, especially ulcerative colitis (UC), with an antibody that binds to CD20.

Background of the Invention

Inflammatory Bowel Disease (IBD)

Inflammatory bowel disease (IBD) is the name of a group of disorders that cause the intestines to become inflamed. Symptoms of IBD include abdominal cramps and pain, diarrhea, weight loss and intestinal bleeding. The current consensus opinion regarding the pathogenesis of IBD centers on the role of genetically determined dysregulation in the host immune response toward the resident bacterial flora (Pallone *et al.*, The immune system in inflammatory bowel disease. In: Satsangi J, Sutherland LR, editors. *Inflammatory Bowel Disease*. Spain: Churchill Livingstone, 85-93 (2003)).

Crohn's disease and ulcerative colitis (UC) are the most common forms of IBD.

Crohn's disease usually causes ulcers along the length of the small and large intestines. Crohn's disease generally either spares the rectum, or causes inflammation or infection with drainage around the rectum.

Almost without exception, UC involves the rectum and spreads proximally to contiguous portions or to all of the colon. Disease activity is usually intermittent, with relapses and periods of quiescence. The sigmoidoscopic or colonoscopic picture is characteristic. In mild disease, the colonic mucosa appears hyperemic and granular. In more severe disease, tiny punctuate ulcers are present and the mucosa is characteristically friable and may bleed spontaneously. Histologically, the inflammatory cell infiltrate in active disease usually includes neutrophils, often invading crypts as well as being associated with epithelial damage and crypt distortion. An increased number of lymphocytes in the lamina propria and basal plasmacytosis are usually present.

Between 500,000 and 700,000 patients suffer from UC in the United States (Loftus, *Gastroenterology* 126:1504-1517(2004)). Extra-colonic manifestations of UC include arthritis, uveitis, aphthous stomatitis, pyoderma gangrenosum, and erythema nodosum. Initial therapy for patients with mild to moderate disease is usually an aminosalicylate. In controlled trials, disease improvement by various criteria occurred in up to 30% of subjects in the placebo groups; thus, no specific treatment may be an option for patients with very mild disease. Distal left-sided UC involving the rectum and sigmoid colon may be efficaciously treated with 5-aminosalicylate (5-ASA) enema formulations. In patients with active

UC who do not respond to standard 5-ASA treatment and in those with more severe disease, oral corticosteroids have been the mainstay of acute symptomatic therapy. However, corticosteroids are not effective in long-term maintenance of remission in patients with UC given that their use is associated with significant toxicity over time (Lennard-Jones *et al.*, *Lancet* 1:188-189 (1965)).

Patients who do not respond to 5-ASA drugs and corticosteroids for disease exacerbations have limited therapeutic options available. Many of these patients are treated with immunosuppressive agents, most commonly 6-mercaptopurine (6-MP) or azathioprine, which may have a significant delay in onset of therapeutic effect in active disease. In patients with severe disease who have not responded to high-dose IV corticosteroids and who are awaiting colectomy, significant short-term efficacy with IV cyclosporine has been observed in one small placebo-controlled study (Lichtiger *et al.*, *N Engl J Med* 330:1841-1845 (1994)). Ultimately, colectomy is necessary in 25%-40% of patients. A clear unmet need exists for a safe and effective therapeutic agent that can provide rapid control of active disease and induce prolonged disease remission.

Although the pathogenesis of UC is not fully understood, there is increasing evidence that UC may be an autoimmune disorder, with B cells playing a role in disease pathophysiology. B cells, as well as T cells, are present in basal lymphoid aggregates, a histopathologic feature considered indicative of UC and seen in histologic sections from patients with active UC (Yeung *et al.*, *Gut* 47:212-227(2000)). In evaluating clinical and histologic parameters that might predict relapse in patients with quiescent UC, the presence of increased numbers of plasma cells in the basal portion of the mucosa was found to be an independent predictor of relapse (Bitton *et al.*, *Gastroenterology* 120:1320 (2001)). Whereas mucosal inflammation in UC is thought to be driven by activated T cells, these patients have a T-helper-2 (Th2) cytokine expression pattern profile (Monteleone *et al.*, *Gut* 50(Suppl III)64 (2002)). As Th2 cytokines classically drive B-cell immune responses and antibody production, a central role for B cell may be postulated in UC.

Increased amounts of IgG, IgM, and IgA and plasma cells, as well as increased production of antibodies against intestinal luminal antigens and autoantigens, have been found in the lamina propria of inflamed colonic mucosa in patients with UC (MacDermott *et al.*, *Gastroenterology* 81:844-852 (1981)). In addition, data are accumulating on the presence of autoantibodies in patients with UC, although a definite role for these antibodies in the pathogenesis of UC is not certain. Approximately two-thirds of UC patients have a circulating antibody known as perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA), which is directed against components of neutrophil leukocytes (Quinton *et al.*, *Gut* 42:788-791 (1998)). It has recently been shown that the p-ANCA that occurs in some forms of vasculitis, and which is directed against a different neutrophil component (myeloperoxidase), is itself the cause of vasculitis and tissue damage in experimental animal models of vasculitis (Xiao *et al.*, *J Clin Invest* 110:955-963 (2002)).

Another marker of autoimmunity is the colonic mucosal B-cell response against human tropomyosin isoform 5 (hTM5), a putative autoantigen in UC. The colonic mucosa of patients with UC had a highly statistically significantly increase in the number of lamina propria B cells that produce IgG against

hTM5 compared with patients with Crohn's colitis and non-IBD patients, suggesting an important, distinct role for anti-hTM5 antibodies in UC (Onuma *et al.*, *Clin Exp Immunol* 121:466-471 (2000)). Similarly, the number of anti-hTM5 IgG immunocytes was significantly higher in patients with UC compared with non-IBD controls, with 21 of 23 patients (91%) having IgG-producing immunocytes, irrespective of clinical activity (Onuma *et al.*, *Clin Exp Immunol* 121:466-471 (2000)). In addition, the anti-hTM5 antibody has been detected in sera of patients with UC and primary sclerosing cholangitis (Sakimaki *et al.*, *Gut* 47:236-241 (2000)). It has been demonstrated that anti-colon antibodies in the sera from patients with UC can react with surface antigens in colonic epithelial cells or colonic mucin in goblet cells (Inoue *et al.*, *Gastroenterology* 121:1523 (2001)). These antibodies may contribute to the destruction of colonic mucosa through antibody-dependent cell-mediated cytotoxic mechanisms against colonic epithelial cells.

In one study, the spontaneous chronic colitis that occurs in mice deficient in T-cell receptor (TCR) α was observed to be more severe in the absence of mature B cells. TCR α -deficient mice with chronic colitis that are crossed with $\alpha\mu$ knockout mice have offspring that develop a more severe form of colitis than the TCR α -deficient mice. In this study, the increased severity of colitis was not due to pathogenic flora, but to the complete absence of B cells. In the $\alpha\mu$ knockout mice, chronic colitis was markedly attenuated after adoptive transfer of peripheral B cells from the TCR α -deficient mice to 3- to 4-week-old $\alpha\mu$ -deficient mice prior to the onset of colitis. This suggests a suppressive role for B cells in the development of colitis in these murine models (Mizoguchi *et al.*, *Int Immunol* 12:597-605 (2000)).

CD20 Antibodies and Therapy Therewith

Lymphocytes are one of many types of white blood cells produced in the bone marrow during the process of hematopoiesis. There are two major populations of lymphocytes: B lymphocytes (B cells) and T lymphocytes (T cells). The lymphocytes of particular interest herein are B cells.

B cells mature within the bone marrow and leave the marrow expressing an antigen-binding antibody on their cell surface. When a naïve B cell first encounters the antigen for which its membrane-bound antibody is specific, the cell begins to divide rapidly and its progeny differentiate into memory B cells and effector cells called "plasma cells". Memory B cells have a longer life span and continue to express membrane-bound antibody with the same specificity as the original parent cell. Plasma cells do not produce membrane-bound antibody, but instead produce the antibody in a form that can be secreted. Secreted antibodies are the major effector molecules of humoral immunity.

The CD20 antigen (also called human B-lymphocyte-restricted differentiation antigen, Bp35) is a hydrophobic transmembrane protein with a molecular weight of approximately 35 kD located on pre-B and mature B lymphocytes. Valentine *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264(19):11282-11287 (1989) and Einfeld *et al.*, *EMBO J.* 7(3):711-717 (1988). The antigen is also expressed on greater than 90% of B-cell non-Hodgkin's lymphomas (NHL) (Anderson *et al. Blood* 63(6):1424-1433 (1984)), but is not found on hematopoietic stem cells, pro-B cells, normal plasma cells, or other normal tissues (Tedder *et al. J. Immunol.* 135(2):973-979 (1985)). CD20 regulates an early step(s) in the activation process for cell cycle

initiation and differentiation (Tedder *et al.*, *supra*), and possibly functions as a calcium- ion channel.

Tedder *et al.*, *J. Cell. Biochem.* 14D:195 (1990).

Given the expression of CD20 in B-cell lymphomas, this antigen can serve as a candidate for “targeting” of such lymphomas. In essence, such targeting can be generalized as follows: antibodies specific to the CD20 surface antigen of B cells are administered to a patient. These anti-CD20 antibodies specifically bind to the CD20 antigen of (ostensibly) both normal and malignant B cells; the antibody bound to the CD20 surface antigen may lead to the destruction and depletion of neoplastic B cells. Additionally, chemical agents or radioactive labels having the potential to destroy the tumor can be conjugated to the anti-CD20 antibody such that the agent is specifically “delivered” to the neoplastic B cells. Irrespective of the approach, a primary goal is to destroy the tumor; the specific approach can be determined by the particular anti-CD20 antibody that is utilized, and thus, the available approaches to targeting the CD20 antigen can vary considerably.

The rituximab (RITUXAN®) antibody is a genetically engineered chimeric murine/human monoclonal antibody directed against the CD20 antigen. Rituximab is the antibody called “C2B8” in US Patent No. 5,736,137 issued April 7, 1998 (Anderson *et al.*). Rituximab is indicated for the treatment of patients with relapsed or refractory low-grade or follicular, CD20-positive, B-cell non-Hodgkin’s lymphoma. *In vitro*, rituximab has been demonstrated to mediate complement-dependent cytotoxicity (CDC) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and to induce apoptosis (Reff *et al.*, *Blood* 83(2):435-445 (1994); Maloney *et al.*, *Blood* 88:637a (1996); Manches *et al.*, *Blood* 101:949-954 (2003)). Synergy between rituximab and chemotherapies and toxins has also been observed experimentally. In particular, rituximab sensitizes drug-resistant human B-cell lymphoma cell lines to the cytotoxic effects of doxorubicin, CDDP, VP-16, diphtheria toxin, and ricin (Demidem *et al.*, *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12(3):177-186 (1997)). *In vivo* preclinical studies have shown that rituximab depletes B cells from the peripheral blood, lymph nodes, and bone marrow of cynomolgus monkeys. Reff *et al.*, *Blood* 83:435-445 (1994).

Rituximab has also been studied in a variety of non-malignant autoimmune disorders, in which B cells and autoantibodies appear to play a role in disease pathophysiology. Edwards *et al.*, *Biochem Soc. Trans.* 30:824-828 (2002). Rituximab has been reported to potentially relieve signs and symptoms of, for example, rheumatoid arthritis (RA) (Leandro *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.* 61:883-888 (2002); Edwards *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9): S46 (2002); Stahl *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 62 (Suppl. 1): OP004 (2003); Emery *et al.*, *Arthritis Rheum.* 48(9): S439 (2003)), lupus (Eisenberg, *Arthritis. Res. Ther.* 5:157-159 (2003); Leandro *et al.*, *Arthritis Rheum.* 46: 2673-2677 (2002); Gorman *et al.*, *Lupus*, 13: 312-316 (2004)), immune thrombocytopenic purpura (D’Arena *et al.*, *Leuk. Lymphoma* 44:561-562 (2003); Stasi *et al.*, *Blood*, 98: 952-957 (2001); Saleh *et al.*, *Semin. Oncol.*, 27 (Supp 12):99-103 (2000); Zaia *et al.*, *Haematologica*, 87: 189-195 (2002); Ratanatharathorn *et al.*, *Ann. Int. Med.*, 133: 275-279 (2000)), pure red cell aplasia (Auner *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 116: 725-728 (2002)); autoimmune anemia (Zaja *et al.*, *Haematologica* 87:189-195 (2002) (erratum appears in *Haematologica* 87:336 (2002)), cold agglutinin

disease (Layios *et al.*, *Leukemia*, 15: 187-8 (2001); Berentsen *et al.*, *Blood*, 103: 2925-2928 (2004); Berentsen *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 115: 79-83 (2001); Bauduer, *Br. J. Haematol.*, 112: 1083-1090 (2001); Damiani *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 114: 229-234 (2001)), type B syndrome of severe insulin resistance (Coll *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 350: 310-311 (2004), mixed cryoglobulinemia (DeVita *et al.*, *Arthritis Rheum.* 46 Suppl. 9:S206/S469 (2002)), myasthenia gravis (Zaja *et al.*, *Neurology*, 55: 1062-63 (2000); Wylam *et al.*, *J. Pediatr.*, 143: 674-677 (2003)), Wegener's granulomatosis (Specks *et al.*, *Arthritis & Rheumatism* 44: 2836-2840 (2001)), refractory pemphigus vulgaris (Dupuy *et al.*, *Arch Dermatol.*, 140:91-96 (2004)), dermatomyositis (Levine, *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9):S1299 (2002)), Sjogren's syndrome (Somer *et al.*, *Arthritis & Rheumatism*, 49: 394-398 (2003)), active type-II mixed cryoglobulinemia (Zaja *et al.*, *Blood*, 101: 3827-3834 (2003)), pemphigus vulgaris (Dupay *et al.*, *Arch. Dermatol.*, 140: 91-95 (2004)), autoimmune neuropathy (Pestronk *et al.*, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74:485-489 (2003)), paraneoplastic opsoclonus-myoclonus syndrome (Pranzatelli *et al.* *Neurology* 60(Suppl. 1) PO5.128:A395 (2003)), and relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). Cross *et al.* (abstract) "Preliminary results from a phase II trial of rituximab in MS" Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis, 20-21 (2003).

A Phase II study (WA16291) has been conducted in patients with rheumatoid arthritis (RA), providing 48-week follow-up data on safety and efficacy of rituximab. Emery *et al.* *Arthritis Rheum* 48(9):S439 (2003); Szczepanski *et al.* *Arthritis Rheum* 48(9):S121 (2003); Edwards *et al.*, *N Engl. J. Med.* 350:2572-82 (2004). A total of 161 patients were evenly randomized to four treatment arms: methotrexate, rituximab alone, rituximab plus methotrexate, and rituximab plus cyclophosphamide (CTX). The treatment regimen of rituximab was one gram administered intravenously on days 1 and 15. Infusions of rituximab in most patients with RA were well tolerated by most patients, with 36% of patients experiencing at least one adverse event during their first infusion (compared with 30% of patients receiving placebo). Overall, the majority of adverse events was considered to be mild to moderate in severity and was well balanced across all treatment groups. There were a total of 19 serious adverse events across the four arms over the 48 weeks, which were slightly more frequent in the rituximab/CTX group. The incidence of infections was well balanced across all groups. The mean rate of serious infection in this RA patient population was 4.66 per 100 patient-years, which is lower than the rate of infections requiring hospital admission in RA patients (9.57 per 100 patient-years) reported in a community-based epidemiologic study. Doran *et al.*, *Arthritis Rheum.* 46:2287-2293 (2002).

The reported safety profile of rituximab in a small number of patients with neurologic disorders, including autoimmune neuropathy (Pestronk *et al.*, *supra*), opsoclonus-myoclonus syndrome (Pranzatelli *et al.*, *supra*), and RRMS (Cross *et al.*, *supra*), was similar to that reported in oncology or RA. In an ongoing investigator-sponsored trial (IST) of rituximab in combination with interferon- β (IFN- β) or glatiramer acetate in patients with RRMS (Cross *et al.*, *supra*), 1 of 10 treated patients was admitted to the hospital for overnight observation after experiencing moderate fever and rigors following the first infusion of rituximab, while the other 9 patients completed the four-infusion regimen without any reported adverse

events.

Patent publications concerning CD20 antibodies and CD20 binding molecules include US Patent Nos. 5,776,456, 5,736,137, 5,843,439, 6,399,061, and 6,682,734, as well as US 2002/0197255, US 2003/0021781, US 2003/0082172, US 2003/0095963, US 2003/0147885 (Anderson *et al.*); US Patent No. 6,455,043, US 2003/0026804, and WO 2000/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO 2000/27428 (Grillo-Lopez and White); WO 2000/27433 and US 2004/0213784 (Grillo-Lopez and Leonard); WO 2000/44788 (Braslawsky *et al.*); WO 2001/10462 (Rastetter, W.); WO01/10461 (Rastetter and White); WO 2001/10460 (White and Grillo-Lopez); US 2001/0018041, US 2003/0180292, WO 2001/34194 (Hanna and Hariharan); US 2002/0006404 and WO 2002/04021 (Hanna and Hariharan); US 2002/0012665 and WO 2001/74388 (Hanna, N.); US 2002/0058029 (Hanna, N.); US 2003/0103971 (Hariharan and Hanna); US 2002/0009444 and WO 2001/80884 (Grillo-Lopez, A.); WO 2001/97858 (White, C.); US 2002/0128488 and WO 2002/34790 (Reff, M.); WO 2002/060955 (Braslawsky *et al.*); WO 2002/096948 (Braslawsky *et al.*); WO 2002/079255 (Reff and Davies); US Patent No. 6,171,586 and WO 1998/56418 (Lam *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); WO 1999/22764 (Raju, S.); WO 1999/51642, US Patent No. 6,194,551, US Patent No. 6,242,195, US Patent No. 6,528,624 and US Patent No. 6,538,124 (Idusogie *et al.*); WO 2000/42072 (Presta, L.); WO 2000/67796 (Curd *et al.*); WO 2001/03734 (Grillo-Lopez *et al.*); US 2002/0004587 and WO 2001/77342 (Miller and Presta); US 2002/0197256 (Grewal, I.); US 2003/0157108 (Presta, L.); WO 04/056312 (Lowman *et al.*); US 2004/0202658 and WO 2004/091657 (Benyunes, K.); WO 2005/000351 (Chan, A.); US 2005/0032130A1 (Beresini *et al.*); US 2005/0053602A1 (Brunetta, P.); US Patent Nos. 6,565,827, 6,090,365, 6,287,537, 6,015,542, 5,843,398, and 5,595,721, (Kaminski *et al.*); US Patent Nos. 5,500,362, 5,677,180, 5,721,108, 6,120,767, and 6,652,852 (Robinson *et al.*); US Pat No. 6,410,391 (Raubitschek *et al.*); US Patent No. 6,224,866 and WO00/20864 (Barbera-Guillem, E.); WO 2001/13945 (Barbera-Guillem, E.); WO 2000/67795 (Goldenberg); US 2003/0133930 and WO 2000/74718 (Goldenberg and Hansen); US 2003/0219433 and WO 2003/68821 (Hansen *et al.*); WO2004/058298 (Goldenberg and Hansen); WO 2000/76542 (Golay *et al.*); WO 2001/72333 (Wolin and Rosenblatt); US Patent No. 6,368,596 (Ghetie *et al.*); US Patent No. 6,306,393 and US 2002/0041847 (Goldenberg, D.); US 2003/0026801 (Weiner and Hartmann); WO 2002/102312 (Engleman, E.); US 2003/0068664 (Albitar *et al.*); WO 2003/002607 (Leung, S.); WO 2003/049694, US2002/0009427, and US 2003/0185796 (Wolin *et al.*); WO 2003/061694 (Sing and Siegall); US 2003/0219818 (Bohen *et al.*); US 2003/0219433 and WO 2003/068821 (Hansen *et al.*); US 2003/0219818 (Bohen *et al.*); US2002/0136719 (Shenoy *et al.*); WO 2004/032828 (Wahl *et al.*); WO 2002/56910 (Hayden-Ledbetter); US 2003/0219433 A1 (Hansen *et al.*); WO 2004/035607 (Teeling *et al.*); US 2004/0093621 (Shitara *et al.*); WO 2004/103404 (Watkins *et al.*); WO 2005/000901 (Tedder *et al.*); US 2005/0025764 (Watkins *et al.*); WO2005/016969 and US 2005/0069545 A1 (Carr *et al.*); and WO 2005/014618 (Chang *et al.*). See also US Patent No. 5,849,898 and EP 330,191 (Seed *et al.*); EP332,865A2 (Meyer and Weiss); US Patent No. 4,861,579 (Meyer *et al.*); US2001/0056066 (Bugelski *et al.*); and WO 1995/03770 (Bhat *et al.*);

Publications concerning therapy with rituximab include: Perotta and Abuel, "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to rituximab" Abstract # 3360 *Blood* 10(1)(part 1-2): p. 88B (1998); Perotta *et al.*, "Rituxan in the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)", *Blood*, 94: 49 (abstract) (1999); Matthews, R., "Medical Heretics" *New Scientist* (7 April, 2001); Leandro *et al.*, "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response" *Arthritis and Rheumatism* 44(9): S370 (2001); Leandro *et al.*, "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", *Arthritis and Rheumatism*, 46:2673-2677 (2002), wherein during a 2-week period, each patient received two 500-mg infusions of rituximab, two 750-mg infusions of cyclophosphamide, and high-dose oral corticosteroids, and wherein two of the patients treated relapsed at 7 and 8 months, respectively, and have been retreated, although with different protocols; Weide *et al.*, "Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy" *Lupus*, 12: 779-782 (2003), wherein a patient was treated with rituximab (375 mg/m² x 4, repeated at weekly intervals) and further rituximab applications were delivered every 5-6 months and then maintenance therapy was received with rituximab 375 mg/m² every three months, and a second patient with refractory SLE was treated successfully with rituximab and is receiving maintenance therapy every three months, with both patients responding well to rituximab therapy; Edwards and Cambridge, "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" *Rheumatology* 40:205-211 (2001); Cambridge *et al.*, "B lymphocyte depletion in patients with rheumatoid arthritis: serial studies of immunological parameters" *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9): S1350 (2002); Edwards *et al.*, "Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 46(9): S197 (2002); Pavelka *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.* 63: (S1):289-90 (2004); Emery *et al.*, *Arthritis Rheum.* 50 (S9):S659 (2004); Levine and Pestronk, "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab" *Neurology* 52: 1701-1704 (1999); DeVita *et al.*, "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheum* 46:2029-2033 (2002); Hidashida *et al.* "Treatment of DMARD-refractory rheumatoid arthritis with rituximab." Presented at the *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology*; Oct 24-29; New Orleans, LA (2002); Tuscano, J. "Successful treatment of infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" Presented at the *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology*; Oct 24-29; New Orleans, LA (2002); "Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic" Martin and Chan, *Immunity* 20:517-527 (2004); Silverman and Weisman, "Rituximab Therapy and Autoimmune Disorders, Prospects for Anti-B Cell Therapy" *Arthritis and Rheumatism* 48: 1484-1492 (2003); Kazkaz and Isenberg, "Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases" *Current opinion in pharmacology* 4: 398-402 (2004); Virgolini and Vanda, "Rituximab in autoimmune diseases" *Biomedicine & pharmacotherapy* 58: 299-309(2004); Klemmer *et al.*, "Treatment of antibody mediated autoimmune disorders with an antiCD20 monoclonal antibody Rituximab" *Arthritis And Rheumatism* 48(9):S624-S624 (2003); Kneitz *et al.*, "Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases"

Immunobiology 206: 519-527 (2002); Arzoo *et al.*, "Treatment of refractory antibody mediated autoimmune disorders with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab)" *Annals of the Rheumatic Diseases* 61(10):922-4 (2002) Looney, R., "Treating human autoimmune disease by depleting B cells" *Ann Rheum Dis.* 61: 863-866 (2002); Lake and Dionne, "Future Strategies in Immunotherapy" in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (2003 by John Wiley & Sons, Inc.) Article Online Posting Date: January 15, 2003 (Chapter 2 " Antibody-Directed Immunotherapy"); Liang and Tedder, *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, Section: CD20 as an Immunotherapy Target, article online posting date: 15 January, 2002 entitled "CD20"; Appendix 4A entitled "Monoclonal Antibodies to Human Cell Surface Antigens" by Stockinger *et al.*, eds: Coligan *et al.*, in *Current Protocols in Immunology* (2003 John Wiley & Sons, Inc) Online Posting Date: May, 2003; Print Publication Date: February, 2003; Penichet and Morrison, "CD Antibodies/molecules: Definition; Antibody Engineering" in *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine* Section: Chimeric, Humanized and Human Antibodies; posted online 15 January, 2002; Specks *et al.* "Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy" *Arthritis & Rheumatism* 44:2836-2840 (2001); online abstract submission and invitation Koegh *et al.*, "Rituximab for Remission Induction in Severe ANCA-Associated Vasculitis: Report of a Prospective Open-Label Pilot Trial in 10 Patients", American College of Rheumatology, Session Number: 28-100, Session Title: Vasculitis, Session Type: ACR Concurrent Session, Primary Category: 28 Vasculitis, Session 10/18/2004 (<http://www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp>); Eriksson, "Short-term outcome and safety in 5 patients with ANCA-positive vasculitis treated with rituximab", *Kidney and Blood Pressure Research*, 26: 294 (2003); Jayne *et al.*, "B-cell depletion with rituximab for refractory vasculitis" *Kidney and Blood Pressure Research*, 26: 294 (2003); Jayne, poster 88 (11th International Vasculitis and ANCA workshop), 2003 American Society of Nephrology; Stone and Specks, "Rituximab Therapy for the Induction of Remission and Tolerance in ANCA-associated Vasculitis", in the Clinical Trial Research Summary of the 2002-2003 Immune Tolerance Network, <http://www.immunetolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html>; and Leandro *et al.*, "B cell repopulation occurs mainly from naïve B cells in patient with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus" *Arthritis Rheum.*, 48 (Suppl 9): S1160 (2003).

Summary of the Invention

In a first aspect, the invention concerns a method for treating moderate-severe inflammatory bowel disease (IBD) in a human subject comprising administering to the subject an effective amount of a CD20 antibody, wherein administration of the antibody results in a clinical response or disease remission in the subject.

In another aspect, the invention concerns a method for treating inflammatory bowel disease (IBD) in a human subject with active IBD comprising administering only one or two doses of a CD20 antibody to the subject, wherein disease remission or clinical response is achieved upon administration of the one or two doses of the CD20 antibody.

The invention further provides a method for treating inflammatory bowel disease (IBD) in a human subject with active IBD comprising administering to the subject an effective amount of a CD20 antibody and further comprising administering to the subject an effective amount of a second medicament selected from the group consisting of an aminosalicylate, an oral corticosteroid, 6-mercaptopurine (6-MP) and azathioprine.

In yet a further aspect, the invention relates to a method for reducing a disease activity index (DAI) score in a human subject with active ulcerative colitis (UC) comprising administering a CD20 antibody to the subject in an amount effective to reduce DAI score.

In yet a further aspect, the invention relates to an article of manufacture comprising:

- i. a container comprising a CD20 antibody; and
- ii. a package insert with instructions for treating inflammatory bowel disease (IBD) in a human subject, wherein the instructions indicate that an effective amount of the CD20 antibody is administered to the human subject.

Brief Description of the Drawings

FIG. 1A is a sequence alignment comparing the amino acid sequences of the variable light domain (V_L) of each of murine 2H7 (SEQ ID NO:1), humanized 2H7.v16 variant (SEQ ID NO:2), and the human kappa light chain subgroup I (SEQ ID NO:3). The CDRs of V_L of 2H7 and hu2H7.v16 are as follows: CDR1 (SEQ ID NO:4), CDR2 (SEQ ID NO:5), and CDR3 (SEQ ID NO:6).

FIG. 1B is a sequence alignment comparing the amino acid sequences of the variable heavy domain (V_H) of each of murine 2H7 (SEQ ID NO:7), humanized 2H7.v16 variant (SEQ ID NO:8), and the human consensus sequence of the heavy chain subgroup III (SEQ ID NO:9). The CDRs of V_H of 2H7 and hu2H7.v16 are as follows: CDR1 (SEQ ID NO:10), CDR2 (SEQ ID NO:11), and CDR3 (SEQ ID NO:12).

In FIG. 1A and FIG. 1B, the CDR1, CDR2 and CDR3 in each chain are enclosed within brackets, flanked by the framework regions, FR1-FR4, as indicated. 2H7 refers to murine 2H7 antibody. The asterisks in between two rows of sequences indicate the positions that are different between the two sequences. Residue numbering is according to Kabat *et al. Sequences of Immunological Interest*, 5th Ed.

Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), with insertions shown as a, b, c, d, and e.

FIG. 2 shows an alignment of the mature 2H7.v16 and 2H7.v511 light chains (SEQ ID Nos. 13 and 15, respectively), with Kabat variable domain residue numbering and Eu constant domain residue numbering.

FIG. 3 shows an alignment of the mature 2H7.v16 and 2H7.v511 heavy chains (SEQ ID Nos. 14 and 16, respectively), with Kabat variable domain residue numbering and Eu constant domain residue numbering.

FIG. 4 depicts study schema for the protocol in Example 1.

Detailed Description of the Preferred Embodiments

I. Definitions

"Inflammatory bowel disease" or "IBD" refers to the group of disorders that cause the intestines to become inflamed, generally manifested with symptoms including abdominal cramps and pain, diarrhea, weight loss and intestinal bleeding. The main forms of IBD are ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease.

"Ulcerative colitis" or "UC" is a chronic, episodic, inflammatory disease of the large intestine and rectum characterized by bloody diarrhea. Ulcerative colitis is characterized by chronic inflammation in the colonic mucosa and can be categorized according to location: "proctitis" involves only the rectum, "proctosigmoiditis" affects the rectum and sigmoid colon, "left-sided colitis" encompasses the entire left side of the large intestine, "pancolitis" inflames the entire colon.

"Crohn's disease," also called "regional enteritis," is a chronic autoimmune disease that can affect any part of the gastrointestinal tract but most commonly occurs in the ileum (the area where the small and large intestine meet). Crohn's disease, in contrast to ulcerative colitis, is characterized by chronic inflammation extending through all layers of the intestinal wall and involving the mesentery as well as regional lymph nodes. Whether or not the small bowel or colon is involved, the basic pathologic process is the same.

Ulcerative Colitis and Crohn's disease can be distinguished from each other clinically, endoscopically, pathologically, and serologically in more than 90% of cases; the remainder are considered to be indeterminate IBD (Harrison's Principles of Internal medicine, 12th edition, p. 1271 (1991)).

"Moderate-severe" IBD is IBD where the signs or symptoms of disease in the subject are greater than mild. Such subjects can be identified by a skilled gastroenterologist. The subject with moderate-severe IBD may have been treated with oral corticosteroids for UC within 2 years prior to screening, and/or treatment intensity may have been equal to or greater than a prednisone equivalent dose of 20 mg/day for at least 2 weeks' duration. Such subjects may be steroid refractory and/or steroid-dependent. A subject with moderate-severe UC may be selected based on DAI score, for example, where a DAI score ≥ 6 , ≥ 2 rectal bleeding score, and/or ≥ 2 flexible sigmoidoscopy score indicates the subject has moderate-severe UC. Alternatively, or additionally, the criteria for assessment of mild, moderate, and severe disease as in Truelove and Witts *Br Med J.* 2:1041-1048 (1955) (see Table 1 below) may be used to identify such subjects. Subjects with fulminant or toxic colitis usually have more than 10 bowel movements per day, continuous bleeding, abdominal distention

and tenderness, and radiologic evidence of edema and possibly bowel dilation.

Table 1:		
Criteria of Trulove and Witts for Assessing Disease Activity in Ulcerative Colitis		
Daily bowel movements (no.)	< or = to 5	> 5
Hematochezia	Small amounts	Large amounts
Temperature	< 37.5°C	> or = to 37.5°C
Pulse	< 90/min	> or = 90/min
Erythrocyte sedimentation rate	< 30 mm/h	> or = to 30 mm/h
Hemoglobin	> 10 g/dl	< or = to 10 g/dl
Subjects with fewer than all 6 of the above criteria for severe activity have moderately active disease.		

A “subject” herein is a human subject.

A subject with “active” IBD is experiencing at least one symptom of IBD at the time of screening or initial treatment.

“Steroid-refractory” IBD is IBD which progresses, or worsens, even though steroid is being administered to the subject with IBD.

A subject with “steroid-dependent” IBD is dependent on steroid use, and can not taper or withdraw steroid administration due to persistent symptoms.

A “symptom” of IBD is a morbid phenomenon or departure from the normal in structure, function, or sensation, experienced by the subject and indicative of IBD.

“Mucosa” is moist tissue that lines particular organs and body cavities throughout the body, including the gastrointestinal tract. Glands along the mucosa secrete mucus (a thick fluid).

“Colon” is the division of the large intestine extending from the cecum to the rectum.

“Colonic” mucosa is mucosa that lines the colon.

“Peyer’s patches” are aggregated lymphatic follicles found throughout the body, especially in the mucous linings of the digestive and respiratory tracts.

By “disease remission” is intended substantially no evidence of the symptoms of disease. Remission may be achieved within a specified time frame, such as within or at about 8 weeks, from the start of treatment with, or from the initial dose of, the antagonist or antibody. Remission may also be sustained for a period of time, such as for ≥24 weeks, or ≥48 weeks. Disease remission may be defined as defined as a sigmoidoscopy

score of 0 or 1 and/or rectal bleeding score of 0.

A "sigmoidoscopy" is an inspection, through an endoscope, of the interior of the sigmoid colon.

A "sigmoidoscopy score" refers to a score assigned by a clinician based on a sigmoidoscopy. The preferred sigmoidoscopy scoring system is as follows:

0 = normal or inactive disease

1 = mild disease (erythema, decreased vascular pattern, mild friability)

2 = moderate disease (marked erythema, absent vascular pattern, friability, erosions)

3 = severe disease (spontaneous bleeding, ulceration)

"Rectal bleeding" refers to any bleeding in or from the rectum.

A "rectal bleeding score" is the score or grade assigned for the extent, if any, of rectal bleeding. A daily bleeding score represents the most severe bleeding of the day. The preferred rectal bleeding scoring system is:

0 = no blood seen

1 = streaks of blood with stool less than half the time

2 = obvious blood with stool most of the time

3 = blood alone passed.

By "clinical response" is meant an improvement in the symptoms of disease. The clinical response may be achieved within a certain time frame, for example, within or at about 8 weeks from the start of treatment with, or from the initial dose of, the antagonist or antibody. Clinical response may also be sustained for a period of time, such as for ≥ 24 weeks, or ≥ 48 weeks. Clinical response may be evaluated in terms of a reduction in disease activity index (DAI) score, for example, the DAI score may be reduced by greater than or equal to 3 points.

A "disease activity index (DAI)" scoring system is a method for quantitatively assessing UC activity. The preferred DAI scoring system is shown in Table 2 below.

Table 2

DAI Scoring System for Assessment of UC Activity

Stool frequency (each subject serves as his/her own control to establish the degree of abnormality of the stool frequency)

0 = normal number of stools for this subject

1 = 1-2 stools more than normal

2 = 3-4 stools more than normal

3 = 5 or more stools more than normal

Rectal bleeding (the daily bleeding score represented the most severe bleeding of the day)

0 = no blood seen

1 = streaks of blood with stool less than half the time

2 = obvious blood with stool most of the time

3 = blood alone passed.

Findings of flexible protosigmoidoscopy

0 = normal or inactive disease

1 = mild disease (erythema, decreased vascular pattern)

2 = moderate disease (marked erythema, absent vascular pattern, friability, erosions)

3 = severe disease (spontaneous bleeding, ulceration)

Physician's global assessment (acknowledges the 3 other criteria, the subject's daily record of abdominal discomfort and general sense of well-being, and other observations, such as physical findings and the subject's performance status)

0 = normal

1 = mild disease

2 = moderate disease

3 = severe disease

An "autoantibody" is an antibody raised by a subject and directed against a subject's own antigen.

A "tropomyosin" is fibrous protein extractable from muscle. There are 8 known human tropomyosin isoforms. In colon epithelial cells, human tropomyosin isoform 5 (hTM5) is the predominant isoform, with lesser amounts of isoform 4 (hTM4).

By "anti-hTM5 antibody" is intended autoantibody raised by a subject and directed against that subject's hTM5.

"Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA)" refers to autoantibody raised by a subject and directed against components of that subject's neutrophil leukocytes. "Perinuclear" refers to the staining pattern of such autoantibodies.

By "atypical" autoantibody level, is meant a level of such autoantibody that exceeds the normal level. Such normal or typical autoantibody level may be the level found in colonic tissue or mucosa of a normal subject, or subject who is not suffering from IBD.

A "B cell" is a lymphocyte that matures within the bone marrow, and includes a naïve B cell, memory B cell, or effector B cell (plasma cells). The B cell herein may be a normal or non-malignant B cell.

A "B-cell surface marker" or "B-cell surface antigen" herein is an antigen expressed on the surface of a B cell that can be targeted with an antagonist or antibody that binds thereto. Exemplary B-cell surface markers include the CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 and CD86 leukocyte surface markers (for descriptions, see *The Leukocyte Antigen Facts Book*, 2nd Edition, 1997, ed. Barclay *et al.* Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Other B-cell surface markers include RP105, FcRH2, B-cell CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, and 239287. The B-cell

surface marker of particular interest is preferentially expressed on B cells compared to other non-B-cell tissues of a subject and may be expressed on both precursor B cells and mature B cells.

The "CD20" antigen, or "CD20," is an about 35-kDa, non-glycosylated phosphoprotein found on the surface of greater than 90% of B cells from peripheral blood or lymphoid organs. CD20 is present on both normal B cells as well as malignant B cells, but is not expressed on stem cells. Other names for CD20 in the literature include "B-lymphocyte-restricted antigen" and "Bp35". The CD20 antigen is described in Clark *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:1766 (1985), for example.

A "B-cell surface marker antagonist" is a molecule that, upon binding to a B-cell surface marker on B cells, destroys or depletes B cells in a subject and/or interferes with one or more B cell functions, *e.g.* by reducing or preventing a humoral response elicited by the B cell. The antagonist preferably is able to deplete B cells (*i.e.* reduce circulating B cell levels) in a subject treated therewith. Such depletion may be achieved via various mechanisms such antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and/or complement dependent cytotoxicity (CDC), inhibition of B cell proliferation and/or induction of B cell death (*e.g.* via apoptosis). Antagonists included within the scope of the present invention include antibodies, synthetic or native-sequence peptides, immunoadhesins, and small-molecule antagonists that bind to a B-cell surface marker such as CD20, optionally conjugated with or fused to a cytotoxic agent. The preferred antagonist comprises an antibody.

A "CD20 antibody antagonist" herein is an antibody that, upon binding to CD20 on B cells, destroys or depletes B cells in a subject and/or interferes with one or more B-cell functions, *e.g.*, by reducing or preventing a humoral response elicited by the B cell. The antibody antagonist preferably is able to deplete B cells (*i.e.*, reduce circulating B-cell levels) in a subject treated therewith. Such depletion may be achieved via various mechanisms such antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and/or complement-dependent cytotoxicity (CDC), inhibition of B-cell proliferation and/or induction of B-cell death (*e.g.*, via apoptosis).

The term "antibody" herein is used in the broadest sense and specifically covers monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, multispecific antibodies (*e.g.* bispecific antibodies) formed from at least two intact antibodies, and antibody fragments so long as they exhibit the desired biological activity.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably comprising the antigen binding region thereof. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

An "intact antibody" herein is one which comprises two antigen binding regions, and an Fc region. Preferably, the intact antibody has a functional Fc region.

Examples of CD20 antibodies include: "C2B8," which is now called "rituximab" ("RITUXAN®") (US Patent No. 5,736,137); the yttrium-[90]-labelled 2B8 murine antibody designated "Y2B8" or "Ibritumomab Tiuxetan" (ZEVALIN®) commercially available from IDEC Pharmaceuticals, Inc. (US Patent No. 5,736,137; 2B8 deposited with ATCC under accession no. HB11388 on June 22,

1993); murine IgG2a "B1," also called "Tositumomab," optionally labelled with ^{131}I to generate the "131I-B1" or "iodine I131 tositumomab" antibody (BEXXARTM) commercially available from Corixa (see, also, US Patent No. 5,595,721); murine monoclonal antibody "1F5" (Press *et al.* *Blood* 69(2):584-591 (1987) and variants thereof including "framework patched" or humanized 1F5 (WO 2003/002607, Leung, S.; ATCC deposit HB-96450); murine 2H7 and chimeric 2H7 antibody (US Patent No. 5,677,180); humanized 2H7 (WO 2004/056312, Lowman *et al.*, and as set forth below); 2F2 (HuMax-CD20), a fully human, high-affinity antibody targeted at the CD20 molecule in the cell membrane of B-cells (Genmab, Denmark; see, for example, Glennie and van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003) and Cragg *et al.*, *Blood* 101: 1045-1052 (2003); WO 2004/035607; US2004/0167319); the human monoclonal antibodies set forth in WO 2004/035607 and US2004/0167319 (Teeling *et al.*); the antibodies having complex N-glycoside-linked sugar chains bound to the Fc region described in US 2004/0093621 (Shitara *et al.*); monoclonal antibodies and antigen-binding fragments binding to CD20 (WO 2005/000901, Tedder *et al.*) such as HB20-3, HB20-4, HB20-25, and MB20-11; CD20 binding molecules such as the AME series of antibodies, *e.g.*, AME 33 antibodies as set forth in WO 2004/103404 and US2005/0025764 (Watkins *et al.*, Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME); CD20 binding molecules such as those described in US 2005/0025764 (Watkins *et al.*); A20 antibody or variants thereof such as chimeric or humanized A20 antibody (cA20, hA20, respectively) (US 2003/0219433, Immunomedics); CD20-binding antibodies, including epitope-depleted Leu-16, 1H4, or 2B8, optionally conjugated with IL-2, as in US 2005/0069545A1 and WO 2005/16969 (Carr *et al.*); bispecific antibody that binds CD22 and CD20, for example, hLL2xhA20 (WO2005/14618, Chang *et al.*); monoclonal antibodies L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 or NU-B2 available from the International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al.*, In: *Leukocyte Typing* III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)); 1H4 (Haisma *et al.* *Blood* 92:184 (1998)). The preferred CD20 antibodies herein are chimeric, humanized, or human CD20 antibodies, more preferably rituximab, humanized 2H7, 2F2 (Hu-Max-CD20) human CD20 antibody (Genmab), and humanized A20 antibody (Immunomedics).

The terms "rituximab" or "RITUXAN®" herein refer to the genetically engineered chimeric murine/human monoclonal antibody directed against the CD20 antigen and designated "C2B8" in US Patent No. 5,736,137, including fragments thereof which retain the ability to bind CD20.

Purely for the purposes herein and unless indicated otherwise, a "humanized 2H7" antibody is a humanized variant of murine 2H7 antibody, wherein the antibody is effective to reduce circulating B cells *in vivo*.

In one embodiment, the humanized 2H7 antibody comprises one, two, three, four, five or six of the following CDR sequences:

CDR L1 sequence RASSSVSYXH wherein X is M or L (SEQ ID NO. 21), for example SEQ ID NO:4 (Fig. 1A),

CDR L2 sequence of SEQ ID NO:5 (Fig. 1A),

CDR L3 sequence QQWXFNPPT wherein X is S or A (SEQ ID NO. 22), for example SEQ ID NO:6 (Fig.

1A),

CDR H1 sequence of SEQ ID NO:10 (Fig. 1B),

CDR H2 sequence of AIYPGNGXTSYNQKFKG wherein X is D or A (SEQ ID NO. 23), for example SEQ ID NO:11 (Fig. 1B), and

CDR H3 sequence of VVYYSSXXYWYFDV wherein the X at position 6 is N, A, Y, W or D, and the X at position 7 is S or R (SEQ ID NO. 24), for example SEQ ID NO:12 (Fig. 1B).

The CDR sequences above are generally present within human variable light and variable heavy framework sequences, such as substantially the human consensus FR residues of human light chain kappa subgroup I (V_LKI), and substantially the human consensus FR residues of human heavy chain subgroup III (V_HIII). See also WO 2004/056312 (Lowman *et al.*).

The variable heavy region may be joined to a human IgG chain constant region, wherein the region may be, for example, IgG1 or IgG3, including native sequence and variant constant regions.

In a preferred embodiment, such antibody comprises the variable heavy domain sequence of SEQ ID NO:8 (v16, as shown in Fig. 1B), optionally also comprising the variable light domain sequence of SEQ ID NO:2 (v16, as shown in Fig. 1A), which optionally comprises one or more amino acid substitution(s) at positions 56, 100, and/or 100a, *e.g.* D56A, N100A or N100Y, and/or S100aR in the variable heavy domain and one or more amino acid substitution(s) at positions 32 and/or 92, *e.g.* M32L and/or S92A, in the variable light domain. Preferably, the antibody is an intact antibody comprising the light chain amino acid sequences of SEQ ID NOs. 13 or 15, and heavy chain amino acid sequences of SEQ ID NO. 14, 16, 17 or 20.

A preferred humanized 2H7 antibody is ocrelizumab (Genentech).

The antibody herein may further comprise at least one amino acid substitution in the Fc region that improves ADCC activity, such as one wherein the amino acid substitutions are at positions 298, 333, and 334, preferably S298A, E333A, and K334A, using Eu numbering of heavy chain residues. See also US Patent No. 6,737,056B1, Presta.

Any of these antibodies may comprise at least one substitution in the Fc region that improves FcRn binding or serum half-life, for example a substitution at heavy chain position 434, such as N434W. See also US Patent No. 6,737,056B1, Presta.

Any of these antibodies may further comprise at least one amino acid substitution in the Fc region that increases CDC activity, for example, comprising at least a substitution at position 326, preferably K326A or K326W. See also US Patent No. 6,528,624B1 (Idusogie *et al.*).

Some preferred humanized 2H7 variants are those comprising the variable light domain of SEQ ID NO:2 and the variable heavy domain of SEQ ID NO:8, including those with or without substitutions in an Fc region (if present), and those comprising a variable heavy domain with alteration N100A; or D56A and N100A; or D56A, N100Y, and S100aR; in SEQ ID NO:8 and a variable light domain with alteration M32L; or S92A; or M32L and S92A; in SEQ ID NO:2.

M34 in the variable heavy domain of 2H7.v16 has been identified as a potential source of antibody

stability and is another potential candidate for substitution.

In a summary of some various preferred embodiments of the invention, the variable region of variants based on 2H7.v16 comprise the amino acid sequences of v16 except at the positions of amino acid substitutions that are indicated in Table 3 below. Unless otherwise indicated, the 2H7 variants will have the same light chain as that of v16.

Table 3
Exemplary Humanized 2H7 Antibody Variants

2H7 Version	Heavy chain (V _H) changes	Light chain (V _L) changes	Fc changes
16 for reference			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L
588	-		S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR		S298A, E333A, K334A, K326A

One preferred humanized 2H7 comprises 2H7.v16 variable light domain sequence:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:2);

and 2H7.v16 variable heavy domain sequence:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSS (SEQ
ID NO:8).

Where the humanized 2H7.v16 antibody is an intact antibody, it may comprise the light chain amino acid sequence:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT
HQLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13);

and the heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO. 14 or:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT

VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLS
 PG (SEQ ID NO:17).

Another preferred humanized 2H7 antibody comprises 2H7.v511 variable light domain sequence:
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:18)

and 2H7.v511 variable heavy domain sequence:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGAT
 SYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSRYWYFDVWGQGTLLTV
 SS (SEQ ID NO. 19).

Where the humanized 2H7.v511 antibody is an intact antibody, it may comprise the light chain
 amino acid sequence:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
 CLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
 HQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:15)

and the heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO. 16 or:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQK
 FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSRYWYFDVWGQGTLLTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNAALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLS
 PG (SEQ ID NO. 20).

"Growth-inhibitory" antibodies are those that prevent or reduce proliferation of a cell expressing
 an antigen to which the antibody binds. For example, the antibody may prevent or reduce proliferation of
 B cells *in vitro* and/or *in vivo*.

Antibodies that "induce apoptosis" are those that induce programmed cell death, *e.g.* of a B cell, as
 determined by standard apoptosis assays, such as binding of annexin V, fragmentation of DNA, cell
 shrinkage, dilation of endoplasmic reticulum, cell fragmentation, and/or formation of membrane vesicles
 (called apoptotic bodies).

"Native antibodies" are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons, composed
 of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy
 chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies among the heavy

chains of different immunoglobulin isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (V_H) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (V_L) and a constant domain at its other end; the constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light chain and heavy chain variable domains.

The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three segments called hypervariable regions both in the light chain and the heavy chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the framework regions (FRs). The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FRs, largely adopting a β -sheet configuration, connected by three hypervariable regions, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β -sheet structure. The hypervariable regions in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the hypervariable regions from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, whose name reflects its ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an $F(ab')_2$ fragment that has two antigen-binding sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment that contains a complete antigen-recognition and antigen-binding site. This region consists of a dimer of one heavy chain and one light chain variable domain in tight, non-covalent association. It is in this configuration that the three hypervariable regions of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the V_H - V_L dimer. Collectively, the six hypervariable regions confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three hypervariable regions specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. Fab' fragments differ from Fab fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear at least one free thiol group. $F(ab')_2$ antibody fragments originally were produced as

pairs of Fab' fragments that have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

The "light chains" of antibodies (immunoglobulins) from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequences of their constant domains.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their "heavy chains," (if present) antibodies can be assigned to different classes. There are five major classes of intact antibodies: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), *e.g.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2. The heavy chain constant domains that correspond to the different classes of antibodies are called α , δ , ϵ , γ , and μ , respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

Unless indicated otherwise, herein the numbering of the residues in an immunoglobulin heavy chain is that of the EU index as in Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), expressly incorporated herein by reference. The "EU index as in Kabat" refers to the residue numbering of the human IgG1 EU antibody.

The term "Fc region" herein is used to define a C-terminal region of an immunoglobulin heavy chain, including native sequence Fc regions and variant Fc regions. Although the boundaries of the Fc region of an immunoglobulin heavy chain might vary, the human IgG heavy chain Fc region is usually defined to stretch from an amino acid residue at position Cys226, or from Pro230, to the carboxyl-terminus thereof. The C-terminal lysine (residue 447 according to the EU numbering system) of the Fc region may be removed, for example, during production or purification of the antibody, or by recombinantly engineering the nucleic acid encoding a heavy chain of the antibody. Accordingly, a composition of intact antibodies may comprise antibody populations with all K447 residues removed, antibody populations with no K447 residues removed, and antibody populations having a mixture of antibodies with and without the K447 residue.

A "functional Fc region" possesses an "effector function" of a native sequence Fc region. Exemplary "effector functions" include C1q binding; complement dependent cytotoxicity; Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (*e.g.* B cell receptor; BCR), etc. Such effector functions generally require the Fc region to be combined with a binding domain (*e.g.* an antibody variable domain) and can be assessed using various assays as herein disclosed, for example.

A "native sequence Fc region" comprises an amino acid sequence identical to the amino acid sequence of an Fc region found in nature. Native sequence human Fc regions include a native sequence human IgG1 Fc region (non-A and A allotypes); native sequence human IgG2 Fc region; native sequence human IgG3 Fc region; and native sequence human IgG4 Fc region; as well as naturally occurring variants of any of the above.

A "variant Fc region" comprises an amino acid sequence which differs from that of a native sequence Fc region by virtue of at least one amino acid modification, preferably one or more amino acid substitution(s). Preferably, the variant Fc region has at least one amino acid substitution compared to a native sequence Fc

region or to the Fc region of a parent polypeptide, *e.g.* from about one to about ten amino acid substitutions, and preferably from about one to about five amino acid substitutions in a native sequence Fc region or in the Fc region of the parent polypeptide. The variant Fc region herein will preferably possess at least about 80% homology with a native sequence Fc region and/or with an Fc region of a parent polypeptide, and most preferably at least about 90% homology therewith, more preferably at least about 95% homology therewith.

"Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity" and "ADCC" refer to a cell-mediated reaction in which nonspecific cytotoxic cells that express Fc receptors (FcRs) (*e.g.* Natural Killer (NK) cells, neutrophils, and macrophages) recognize bound antibody on a target cell and subsequently cause lysis of the target cell. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express FcγRIII only, whereas monocytes express FcγRI, FcγRII and FcγRIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). To assess ADCC activity of a molecule of interest, an *in vitro* ADCC assay, such as that described in US Patent No. 5,500,362 or 5,821,337 may be performed. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, *e.g.*, in a animal model such as that disclosed in Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Human effector cells" are leukocytes that express one or more FcRs and perform effector functions. Preferably, the cells express at least FcγRIII and carry out ADCC effector function. Examples of human leukocytes that mediate ADCC include peripheral blood mononuclear cells (PBMC), natural killer (NK) cells, monocytes, cytotoxic T cells and neutrophils; with PBMCs and NK cells being preferred.

The terms "Fc receptor" or "FcR" are used to describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The preferred FcR is a native-sequence human FcR. Moreover, a preferred FcR is one that binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the FcγRI, FcγRII, and FcγRIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. FcγRII receptors include FcγRIIA (an "activating receptor") and FcγRIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor FcγRIIA contains an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its cytoplasmic domain. Inhibiting receptor FcγRIIB contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain. (see Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341 (1995). Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term "FcR" herein. The term also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus and immunoglobulin homeostasis (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

"Complement dependent cytotoxicity" or "CDC" refers to the ability of a molecule to lyse a target in the presence of complement. The complement activation pathway is initiated by the binding of the first component of the complement system (C1q) to a molecule (*e.g.* an antibody) complexed with a cognate

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE ☒ PCT/US2006/013780
MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

SOLICITANTE/S. RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES GENENTECH, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

TITULO TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII)

CLASIFICACION _____

EXPEDIENTE No. _____ FECHA DE SOLICITUD _____ ROLLO MICROFILM _____

CERTIFICADO No. _____ FECHA DE CONCESION _____ VIGENCIA DESDE _____ HASTA _____

PRORROGA _____ CAMBIO DE NOMBRE _____

TRASPASO A _____

INVENTOR (ES) SHEILA GUJRATHI.

OTROS _____

antigen. To assess complement activation, a CDC assay, *e.g.* as described in Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), may be performed.

"Single-chain Fv" or "scFv" antibody fragments comprise the V_H and V_L domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Preferably, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains that enables the scFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of scFv see Plückthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) in the same polypeptide chain (V_H - V_L). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical and/or bind the same epitope(s), except for possible variants that may arise during production of the monoclonal antibody, such variants generally being present in minor amounts. Such monoclonal antibody typically includes an antibody comprising a polypeptide sequence that binds a target, wherein the target-binding polypeptide sequence was obtained by a process that includes the selection of a single target binding polypeptide sequence from a plurality of polypeptide sequences. For example, the selection process can be the selection of a unique clone from a plurality of clones, such as a pool of hybridoma clones, phage clones or recombinant DNA clones. It should be understood that the selected target binding sequence can be further altered, for example, to improve affinity for the target, to humanize the target binding sequence, to improve its production in cell culture, to reduce its immunogenicity *in vivo*, to create a multispecific antibody, *etc.*, and that an antibody comprising the altered target binding sequence is also a monoclonal antibody of this invention. In contrast to polyclonal antibody preparations which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody of a monoclonal antibody preparation is directed against a single determinant on an antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibody preparations are advantageous in that they are typically uncontaminated by other immunoglobulins. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by a variety of techniques, including, for example, the hybridoma method (*e.g.*, Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), recombinant DNA methods (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,816,567), phage display technologies (see, *e.g.*, Clackson *et al.*,

Nature, 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); and Lee *et al.* *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), and technologies for producing human or human-like antibodies in animals that have parts or all of the human immunoglobulin loci or genes encoding human immunoglobulin sequences (see, *e.g.*, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); U.S. Patent Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,591,669 (all of GenPharm); 5,545,807; WO 1997/17852; U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016; Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); and Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies (immunoglobulins) in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Chimeric antibodies of interest herein include "primatized" antibodies comprising variable domain antigen-binding sequences derived from a non-human primate (*e.g.* Old World Monkey, such as baboon, rhesus or cynomolgus monkey) and human constant region sequences (US Pat No. 5,693,780).

"Humanized" forms of non-human (*e.g.*, murine) antibodies are chimeric antibodies that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman primate having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence, except for FR substitution(s) as noted above. The humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region, typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et*

al., *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

The term "hypervariable region" when used herein refers to the amino acid residues of an antibody that are responsible for antigen binding. The hypervariable region comprises amino acid residues from a "complementarity determining region" or "CDR" (e.g. residues 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in the light chain variable domain and 31-35 (H1), 50-65 (H2) and 95-102 (H3) in the heavy chain variable domain; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) and/or those residues from a "hypervariable loop" (e.g. residues 26-32 (L1), 50-52 (L2) and 91-96 (L3) in the light chain variable domain and 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) in the heavy chain variable domain; Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). "Framework" or "FR" residues are those variable domain residues other than the hypervariable region residues as herein defined.

A "naked antibody" is an antibody (as herein defined) that is not conjugated to a heterologous molecule, such as a cytotoxic moiety or radiolabel.

An "intact antibody" herein is one which comprises two antigen binding regions, and an Fc region. Preferably, the intact antibody has a functional Fc region.

An "isolated" antibody is one that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

An "affinity matured" antibody is one with one or more alterations in one or more hypervariable regions thereof which result an improvement in the affinity of the antibody for antigen, compared to a parent antibody which does not possess those alteration(s). Preferred affinity matured antibodies will have nanomolar or even picomolar affinities for the target antigen. Affinity matured antibodies are produced by procedures known in the art. Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describes affinity maturation by VH and VL domain shuffling. Random mutagenesis of CDR and/or framework residues is described by: Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

"Treatment" of a subject herein refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. Those in need of treatment include those already with a IBD as well as those in

which the IBD is to be prevented. Hence, the subject may have been diagnosed as having the IBD or may be predisposed or susceptible to the IBD. The term "treating", "treat" or "treatment" as used herein includes preventative (e.g., prophylactic), palliative and curative treatment.

The term "immunosuppressive agent" as used herein for adjunct therapy refers to substances that act to suppress or mask the immune system of the subject being treated herein. This would include substances that suppress cytokine production, down-regulate or suppress self-antigen expression, or mask the MHC antigens. Examples of such agents include 2-amino-6-aryl-5-substituted pyrimidines (see U.S. Pat. No. 4,665,077); non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs); ganciclovir; tacrolimus; glucocorticoids such as cortisol or aldosterone; anti-inflammatory agents such as a cyclooxygenase inhibitor; a 5-lipoxygenase inhibitor; or a leukotriene receptor antagonist; purine antagonists such as azathioprine or mycophenolate mofetil (MMF); alkylating agents such as cyclophosphamide; bromocryptine; danazol; dapsone; glutaraldehyde (which masks the MHC antigens, as described in U.S. Pat. No. 4,120,649); anti-idiotypic antibodies for MHC antigens and MHC fragments; cyclosporine; 6-mercaptopurine; steroids such as corticosteroids or glucocorticosteroids or glucocorticoid analogs, e.g., prednisone, methylprednisolone, including SOLU-MEDROL[®] methylprednisolone sodium succinate, and dexamethasone; dihydrofolate reductase inhibitors such as methotrexate (oral or subcutaneous); anti-malarial agents such as chloroquine and hydroxychloroquine; sulfasalazine; leflunomide; cytokine or cytokine receptor antibodies or antagonists including anti-interferon-alpha, -beta, or -gamma antibodies, anti-tumor necrosis factor(TNF)-alpha antibodies (infliximab (REMICADE[®]) or adalimumab), anti-TNF-alpha immunoadhesin (etanercept), anti-TNF-beta antibodies, anti-interleukin-2 (IL-2) antibodies and anti-IL-2 receptor antibodies, and anti-interleukin-6 (IL-6) receptor antibodies and antagonists; anti-LFA-1 antibodies, including anti-CD11a and anti-CD18 antibodies; anti-L3T4 antibodies; heterologous anti-lymphocyte globulin; pan-T antibodies, preferably anti-CD3 or anti-CD4/CD4a antibodies; soluble peptide containing a LFA-3 binding domain (WO 90/08187 published 7/26/90); streptokinase; transforming growth factor-beta (TGF-beta); streptodornase; RNA or DNA from the host; FK506; RS-61443; chlorambucil; deoxyspergualin; rapamycin; T-cell receptor (Cohen *et al.*, U.S. Pat. No. 5,114,721); T-cell receptor fragments (Offner *et al.*, *Science*, 251: 430-432 (1991); WO 90/11294; Ianeway, *Nature*, 341: 482 (1989); and WO 91/01133); BAFF antagonists such as BAFF or BR3 antibodies or immunoadhesins and zTNF4 antagonists (for review, see Mackay and Mackay, *Trends Immunol.*, 23:113-5 (2002) and see also definition below); biologic agents that interfere with T cell helper signals, such as anti-CD40 receptor or anti-CD40 ligand (CD154), including blocking antibodies to CD40-CD40 ligand (e.g., Durie *et al.*, *Science*, 261: 1328-30 (1993); Mohan *et al.*, *J. Immunol.*, 154: 1470-80 (1995)) and CTLA4-Ig (Finck *et al.*, *Science*, 265: 1225-7 (1994)); and T-cell receptor antibodies (EP 340,109) such as T10B9.

The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (e.g. At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² and radioactive isotopes of Lu), chemotherapeutic agents, and toxins such as small-molecule toxins or enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant

or animal origin, or fragments thereof.

A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide (CYTOXAN®); alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, trietylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide and trimethylolomelamine; acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachone; lapachol; colchicines; betulinic acid; a camptothecin (including the synthetic analogue topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetylcamptothecin, scoplectin, and 9-aminocamptothecin); bryostatin; callystatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin and bizelesin synthetic analogues); podophyllotoxin; podophyllinic acid; teniposide; cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin (including the synthetic analogues, KW-2189 and CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; a sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, and ranimustine; antibiotics such as the enediyne antibiotics (*e. g.*, calicheamicin, especially calicheamicin gamma1I and calicheamicin omega1I (see, *e.g.*, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dynemicin, including dynemicin A; an esperamicin; as well as neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein enediyne antiobiotic chromophores), aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, carabacin, carminomycin, carzinophilin, chromomycinis, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin (including ADRIAMYCIN®, morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin, doxorubicin HCl liposome injection (DOXIL®) and deoxydoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins such as mitomycin C, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate, gemcitabine (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabine (XELODA®), an epothilone, and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; eniluracil; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium acetate; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidainine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone; mitoxantrone; mopidanmol; nitraerine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; losoxantrone; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK® polysaccharide complex (JHS Natural Products, Eugene, OR);

razoxane; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2''-trichlorotriethylamine; trichothecenes (especially T-2 toxin, verracurin A, roridin A and anguidine); urethan; vindesine (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); thiotepa; taxoids, *e.g.*, paclitaxel (TAXOL®), albumin-engineered nanoparticle formulation of paclitaxel (ABRAXANE™), and doxorubicin (TAXOTERE®); chloranbucil; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine (VELBAN®); platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitoxantrone; vincristine (ONCOVIN®); oxaliplatin; leucovorin; vinorelbine (NAVELBINE®); novantrone; edatrexate; daunomycin; aminopterin; ibandronate; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoids such as retinoic acid; pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above; as well as combinations of two or more of the above such as CHOP, an abbreviation for a combined therapy of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone, and FOLFOX, an abbreviation for a treatment regimen with oxaliplatin (ELOXATIN™) combined with 5-FU and leucovorin.

Also included in this definition are anti-hormonal agents that act to regulate, reduce, block, or inhibit the effects of hormones that can promote the growth of cancer, and are often in the form of systemic, or whole-body treatment. They may be hormones themselves. Examples include anti-estrogens and selective estrogen receptor modulators (SERMs), including, for example, tamoxifen (including NOLVADEX® tamoxifen), raloxifene (EVISTA®), droloxifene, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and toremifene (FARESTON®); anti-progesterones; estrogen receptor down-regulators (ERDs); estrogen receptor antagonists such as fulvestrant (FASLODEX®); agents that function to suppress or shut down the ovaries, for example, leutinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists such as leuprolide acetate (LUPRON® and ELIGARD®), goserelin acetate, buserelin acetate and triptorelin; anti-androgens such as flutamide, nilutamide and bicalutamide; and aromatase inhibitors that inhibit the enzyme aromatase, which regulates estrogen production in the adrenal glands, such as, for example, 4(5)-imidazoles, aminoglutethimide, megestrol acetate (MEGASE®), exemestane (AROMASIN®), formestane, fadrozole, vorozole (RIVISOR®), letrozole (FEMARA®), and anastrozole (ARIMIDEX®). In addition, such definition of chemotherapeutic agents includes bisphosphonates such as clodronate (for example, BONEFOS® or OSTAC®), etidronate (DIDROCAL®), NE-58095, zoledronic acid/zoledronate (ZOMETA®), alendronate (FOSAMAX®), pamidronate (AREDIA®), tiludronate (SKELID®), or risedronate (ACTONEL®); as well as troxacitabine (a 1,3-dioxolane nucleoside cytosine analog); antisense oligonucleotides, particularly those that inhibit expression of genes in signaling pathways implicated in aberrant cell proliferation, such as, for example, PKC-alpha, Raf, H-Ras, and epidermal growth factor receptor (EGF-R); vaccines such as THERATOPE® vaccine and gene therapy vaccines, for example, ALLOVECTIN® vaccine, LEUVECTIN® vaccine, and VAXID® vaccine; topoisomerase 1 inhibitor (*e.g.*, LURTOTECAN®); mTOR (*e.g.*, ABARELIX®); lapatinib ditosylate (an ErbB-2 and EGFR dual tyrosine kinase small-molecule inhibitor also known as GW572016); and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

The term "cytokine" is a generic term for proteins released by one cell population that act on another cell as intercellular mediators. Examples of such cytokines are lymphokines, monokines; interleukins (ILs) such as IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, including PROLEUKIN® rIL-2 and human IL-4 and mutants of human IL-4, such as, for example, a mutant containing a mutation in the region of IL-4 which is involved in binding to IL-2R gamma, *e.g.*, Arg 21 is changed to a Glu residue; a tumor necrosis factor such as TNF- α or TNF- β ; and other polypeptide factors including LIF and kit ligand (KL). As used herein, the term cytokine includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native-sequence cytokines, including synthetically produced small-molecule entities and pharmaceutically acceptable derivatives and salts thereof.

The term "hormone" refers to polypeptide hormones, which are generally secreted by glandular organs with ducts. Included among the hormones are, for example, growth hormone such as human growth hormone, N-methionyl human growth hormone, and bovine growth hormone; parathyroid hormone; thyroxine; insulin; proinsulin; relaxin; estradiol; hormone-replacement therapy; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitio stanol, mepitio stanol, or testolactone; prorelaxin; glycoprotein hormones such as follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH); prolactin, placental lactogen, mouse gonadotropin-associated peptide, gonadotropin-releasing hormone; inhibin; activin; mullerian-inhibiting substance; and thrombopoietin. As used herein, the term hormone includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native-sequence hormone, including synthetically produced small-molecule entities and pharmaceutically acceptable derivatives and salts thereof.

The term "growth factor" refers to proteins that promote growth, and include, for example, hepatic growth factor; fibroblast growth factor; vascular endothelial growth factor; nerve growth factors such as NGF- β ; platelet-derived growth factor; transforming growth factors (TGFs) such as TGF- α and TGF- β ; insulin-like growth factor-I and -II; erythropoietin (EPO); osteoinductive factors; interferons such as interferon- α , - β , and - γ ; and colony stimulating factors (CSFs) such as macrophage-CSF (M-CSF); granulocyte-macrophage-CSF (GM-CSF); and granulocyte-CSF (G-CSF). As used herein, the term growth factor includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native-sequence growth factor, including synthetically produced small-molecule entities and pharmaceutically acceptable derivatives and salts thereof.

The term "integrin" refers to a receptor protein that allows cells both to bind to and to respond to the extracellular matrix and is involved in a variety of cellular functions such as wound healing, cell differentiation, homing of tumor cells and apoptosis. They are part of a large family of cell adhesion receptors that are involved in cell-extracellular matrix and cell-cell interactions. Functional integrins consist of two transmembrane glycoprotein subunits, called alpha and beta, that are non-covalently bound. The alpha subunits all share some homology to each other, as do the beta subunits. The receptors always contain one alpha chain and one beta chain. Examples include Alpha6beta1, Alpha3beta1, Alpha7beta1,

LFA-1 *etc.* As used herein, the term "integrin" includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native-sequence integrin, including synthetically produced small-molecule entities and pharmaceutically acceptable derivatives and salts thereof.

For the purposes herein, "tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)" refers to a human TNF-alpha molecule comprising the amino acid sequence as described in Pennica *et al.*, *Nature*, 312:721 (1984) or Aggarwal *et al.*, *JBC*, 260:2345 (1985). A "TNF-alpha inhibitor" herein is an agent that inhibits, to some extent, a biological function of TNF-alpha, generally through binding to TNF-alpha and neutralizing its activity. Examples of TNF inhibitors specifically contemplated herein are etanercept (ENBREL®), infliximab (REMICADE®), and adalimumab (HUMIRA™).

Examples of "disease-modifying anti-rheumatic drugs" or "DMARDs" include hydroxychloroquine, sulfasalazine, methotrexate, leflunomide, etanercept, infliximab, azathioprine, D-penicillamine, gold salts (oral), gold salts (intramuscular), minocycline, cyclosporine including cyclosporine A and topical cyclosporine, *staphylococcal* protein A (Goodyear and Silverman, *J. Exp. Med.*, 197, (9), p1125-39 (2003)), including salts and derivatives thereof, *etc.*

Examples of "non-steroidal anti-inflammatory drugs" or "NSAIDs" include aspirin, acetylsalicylic acid, ibuprofen, naproxen, indomethacin, sulindac, tolmetin, COX-2 inhibitors such as celecoxib (CELEBREX®; 4-(5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl) benzenesulfonamide and valdecoxib (BEXTRA®), and meloxicam (MOBIC®), including salts and derivatives thereof, *etc.*

Examples of "integrin antagonists or antibodies" herein include an LFA-1 antibody, such as efalizumab (RAPTIVA®) commercially available from Genentech, or an alpha 4 integrin antibody such as natalizumab (ANTEGREN®) available from Biogen, or diazacyclic phenylalanine derivatives (WO 2003/89410), phenylalanine derivatives (WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 and WO 2003/53926), phenylpropionic acid derivatives (WO 2003/10135), enamine derivatives (WO 2001/79173), propanoic acid derivatives (WO 2000/37444), alkanoic acid derivatives (WO 2000/32575), substituted phenyl derivatives (US Pat. Nos. 6,677,339 and 6,348,463), aromatic amine derivatives (US Pat. No. 6,369,229), ADAM disintegrin domain polypeptides (US2002/0042368), antibodies to alphavbeta3 integrin (EP 633945), aza-bridged bicyclic amino acid derivatives (WO 2002/02556), *etc.*

"Corticosteroid" refers to any one of several synthetic or naturally occurring substances with the general chemical structure of steroids that mimic or augment the effects of the naturally occurring corticosteroids. Examples of synthetic corticosteroids include prednisone, prednisolone (including methylprednisolone, such as SOLU-MEDROL® methylprednisolone sodium succinate), dexamethasone or dexamethasone triamcinolone, hydrocortisone, and betamethasone. The preferred corticosteroids herein are prednisone, methylprednisolone, hydrocortisone, or dexamethasone.

As used herein, the term "effective amount" is meant to refer to an amount of the antibody or antagonist that is effective for treating the IBD. Effective amounts are typically determined by the effect they have compared to the effect observed when a composition that includes no active ingredient (*i.e.* a control) is administered to a similarly situated individual.

24
A "package insert" is used to refer to instructions customarily included in commercial packages of therapeutic products, that contain information about the indications, usage, dosage, administration, contraindications, other therapeutic products to be combined with the packaged product, and/or warnings concerning the use of such therapeutic products, *etc.*

5 A "medicament" is an active drug to treat the IBD or its symptoms or side effects.

II. Therapy of IBD

The invention herein provides a method for treating IBD in a human subject comprising administering to the subject an effective amount of an antibody (or antagonist) that binds to a B-cell surface marker, such as CD20.

10 In particular, the invention provides a method for treating moderate-severe inflammatory bowel disease (IBD) in a human subject comprising administering to the subject an effective amount of a CD20 antibody (or antagonist), wherein administration of the antibody (or antagonist) results in a clinical response and/or disease remission.

15 Such administration may also reduce B-cells in colonic mucosa, Peyer's patches, secondary lymphoid tissues or organs such as the lymph nodes and spleen, and blood, but especially the colonic mucosa of the subject.

20 The IBD may be ulcerative colitis (UC), or Crohn's disease, but preferably UC. The subject treated herein may have active IBD, active UC or active Crohn's disease. Generally, the subject treated will have moderate-severe IBD, moderate-severe UC, or moderate-severe Crohn's disease.

Moreover, the subject may have steroid-refractory and/or steroid dependent IBD, steroid-refractory and/or steroid dependent UC or steroid-refractory and/or steroid dependent Crohn's disease.

Subjects treated herein may: have had diagnosis of IBD ≥ 6 months at screening; have ≥ 20 cm of active disease at screening sigmoidoscopy; have active disease as defined by a DAI score between ≥ 6 and ≤ 11 , with ≥ 2 for rectal bleeding and ≥ 2 for flexible sigmoidoscopy; have been treated with oral corticosteroids for UC within 2 years prior to screening; have been treated with an intensity greater than a prednisone equivalent dose of 20 mg/day for at least 2 weeks' duration; be resistant or refractory to etanercept, infliximab, or adalimumab; have been treated with a stable doses of aminosalicilate for ≥ 3 weeks; have been treated with stable doses of oral corticosteroid dose for ≥ 2 weeks; have been treated with 6-MP for a 3-month period, and with a stable dose thereof for ≥ 4 weeks; have been treated with azathioprine for a 3-month period, with a stable dose for ≥ 4 weeks.

25 The standard of care for subjects with active moderate-severe active UC involves therapy with standard doses of: an aminosalicilate, an oral corticosteroid, 6-mercaptopurine (6-MP) and/or azathioprine. Therapy with a CD20 antibody as disclosed herein will result in an improvement in disease remission (rapid control of disease and/or prolonged remission), and/or clinical response, superior to that achieved with the standard of care for such subjects.

Administration of the antibody may result in disease remission, for example where disease remission is achieved at, or by, about week 8. Preferably, the time to disease remission is less than that

achieved in a subject who is not treated with the CD20 antibody. Moreover, preferably the duration of remission is greater than that achieved in a subject who is not treated with the CD20 antibody. For example, the duration of remission may be for at least 24 weeks, and preferably for at least 48 weeks, and most preferably for at least about 2 years, from initial treatment or from achievement of remission.

Remission may be defined as a sigmoidoscopy score of 0 or 1, and/or rectal bleeding score of 0.

Administration of the antibody may result in a clinical response, for example where the clinical response is achieved at, or by, about week 8. Clinical response herein may be defined as a reduction in disease activity index (DAI) score, for example, reduction of such score by greater than or equal to 3 points.

In one embodiment, the subject has never been previously treated with a CD20 antibody. Preferably, the subject is not suffering from a B cell malignancy. The subject is also preferably one who is not suffering from an autoimmune disease, other than IBD, UC, or Crohn's disease.

Also provided, is a method for reducing a disease activity index (DAI) score in a human subject with active ulcerative colitis (UC) comprising administering a CD20 antibody to the subject in an amount effective to reduce DAI score. Preferably, the DAI scoring system is as in Table 2 herein, and administration of the CD20 antibody reduces such DAI score by greater than or equal to 3 points.

An addition, the method involves treatment of active inflammatory bowel disease (IBD) in a human subject with atypical perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) and/or anti-human tropomyosin isoform 5 (hTM5) autoantibody level(s). Administration of a CD20 antibody to the subject effectively reduces the p-ANCA and/or anti-hTM5 antibody level(s) in the subject.

The exact dose will be determined by the clinician according to accepted standards, taking into account the nature and severity of the condition to be treated, the type of antagonist or antibody, the subject's traits, *etc.* Determination of dose is within the level of ordinary skill in the art. Preferably the antibody is administered systemically, intravenously, or subcutaneously. Depending upon the route and method of administration, the antagonist or antibody may be administered in a single dose, as a prolonged infusion, or intermittently over an extended period. Intravenous administration will generally be by bolus injection or infusion over a typical period of one to several hours. Sustained release formulations can be employed.

In a preferred embodiment, the method comprises administering one or more doses in the range from about 200 mg to 2000 mg, preferably about 500 mg to 1500 mg, and most preferably about 750 mg to 1200 mg. For example, one to four doses, or only one or two doses may be administered. According to this embodiment, the antibody may be administered within a period of about one month, preferably within a period of about 2 to 3 weeks, and most preferably within a period of about two weeks.

Where more than one dose is administered, the later dose (for example, second or third dose) is preferably administered from about 1 to 20 days, more preferably from about 6 to 16 days, and most preferably from about 14 to 16 days from the time the previous dose was administered. The separate doses are preferably administered within a total period of between about 1 day and 4 weeks, more preferably

between about 1 and 20 days (*e.g.*, within a period of 6-18 days). Each such separate dose of the antibody is preferably about 200 mg to 2000 mg, preferably about 500 mg to 1500 mg, and most preferably about 750 mg to 1200 mg.

As noted above, however, these suggested amounts of antagonist or antibody are subject to a great deal of therapeutic discretion. The key factor in selecting an appropriate dose and scheduling is the result obtained, as indicated above. For example, relatively higher doses may be needed initially for the treatment of active IBD. A subsequent dose may be higher than an earlier dose. To obtain the most efficacious results, the antagonist or antibody is generally administered as close to the first sign, diagnosis, appearance, or occurrence of the disease or disorder as possible or during remissions of the disease or disorder.

Hence, the invention provides a method for treating inflammatory bowel disease (IBD) in a human subject with active IBD comprising administering only one or two doses of a CD20 antibody to the subject, wherein disease remission or clinical response is achieved upon administration of the one or two doses of the CD20 antibody. Preferably such one or two doses are administered intravenously (IV), or subcutaneously (SQ). Where two intravenous doses are administered, preferably each of the two doses is in the range from about 200 mg to about 2000 mg.

The antagonist or antibody is administered by any suitable means, including parenteral, subcutaneous, intra-peritoneal, inhalational, intrathecal, intra-articular, and intra-nasal, and, if desired for local immunosuppressive treatment, intralesional administration. Parenteral infusions include intramuscular, intravenous, intra-arterial, intraperitoneal, or subcutaneous administration. In addition, the antagonist or antibody may suitably be administered by pulse infusion, *e.g.*, with declining doses of the antagonist or antibody. Preferably the dosing is given by injections, most preferably intravenous or subcutaneous injections, depending in part on whether the administration is brief or chronic.

The subject may be retreated with the antagonist or antibody, as by being given more than one exposure or set of doses, such as at least about two exposures of the antagonist or antibody, for example, from about 2 to 60 exposures, and more particularly about 2 to 40 exposures, most particularly, about 2 to 20 exposures.

In one embodiment, any retreatment may be given when signs or symptoms of disease return, when the subject is no longer in remission, and/or when p-ANCA or anti-hTM5 autoantibody levels rise, etc.

In another embodiment, any retreatment may be given at defined intervals. For example, subsequent exposures may be administered at various intervals, such as, for example, about 24-28 weeks or 48-56 weeks or longer. Preferably, such exposures are administered at intervals each of about 24-26 weeks or about 38-42 weeks, or about 50-54 weeks.

In one embodiment, each antagonist or antibody exposure is provided as a single dose of the antagonist or antibody. In an alternative embodiment, each antagonist or antibody exposure is provided as separate doses of the antibody. However, not every antagonist or antibody exposure need be provided as a

single dose or as separate doses.

The preferred antagonist is an antibody. In the methods set forth herein, the CD20 antibody may be a naked antibody or may be conjugated with another molecule such as a cytotoxic agent or cytokine. Preferably, the antibody is an intact, naked antibody. The preferred CD20 antibody herein is a chimeric, humanized, or human CD20 antibody, more preferably rituximab, humanized 2H7, 2F2 (HuMax-CD20) human CD20 antibody (Genmab), humanized A20 antibody (Immunomedics). Still more preferred is rituximab or humanized 2H7.

In a further embodiment of all the methods herein, the subject has never been previously treated with drug(s), such as an agent that treats IBD and/or has never been previously treated with an antagonist or antibody to a B-cell surface marker (*e.g.* has never been previously treated with a CD20 antibody).

In any of the methods herein, one may administer to the subject along with the antagonist or antibody that binds a B-cell surface marker an effective amount of a second medicament (where the antagonist or antibody that binds a B-cell surface marker (*e.g.*, the CD20 antibody) is a first medicament). The type of such second medicament depends on various factors, including the type of IBD, the severity of the IBD, the condition and age of the subject, the type and dose of first medicament employed, *etc.*

Examples of such additional medicaments or other therapies include another agent that treats IBD, a chemotherapeutic agent, an interferon class drug such as interferon-alpha (*e.g.*, from Amarillo Biosciences, Inc.), IFN-beta-1a (REBIF[®] and AVONEX[®]) or IFN-beta-1b (BETASERON[®]), an oligopeptide such as glatiramer acetate (COPAXONE[®]), an agent blocking CD40-CD40 ligand, a cytotoxic agent (such as mitoxantrone (NOVANTRONE[®]), methotrexate, cyclophosphamide, chlorambucil, leflunomide, and azathioprine), one or more immunosuppressive agents (*e.g.* azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine), intravenous immunoglobulin (gamma globulin), lymphocyte-depleting therapy (*e.g.*, mitoxantrone, cyclophosphamide, CAMPATH[™] antibodies, anti-CD4, cladribine), a polypeptide construct with at least two domains comprising a de-immunized, autoreactive antigen or its fragment that is specifically recognized by the Ig receptors of autoreactive B-cells (WO 2003/68822), total body irradiation, bone marrow transplantation, integrin antagonist or antibody (*e.g.*, an LFA-1 antibody such as efalizumab (RAPTIVA[®]) commercially available from Genentech, or an alpha 4 integrin antibody such as natalizumab (ANTEGREN[®]) available from Biogen Idec, or others as noted above), steroid such as corticosteroid (*e.g.*, methylprednisolone such as SOLU-MEDROL[™] methylprednisolone sodium succinate for injection, prednisone such as low-dose prednisone, dexamethasone, or glucocorticoid, including systemic corticosteroid therapy), non-lymphocyte-depleting immunosuppressive therapy (*e.g.*, MMF or cyclosporine), cholesterol-lowering drug of the "statin" class (which includes cerivastatin (BAYCOL[™]), fluvastatin (LESCOL[™]), atorvastatin (LIPITOR[™]), lovastatin (MEVACOR[™]), pravastatin (PRAVACHOL[™]), and simvastatin (ZOCOR[™])), estradiol, testosterone (optionally at elevated dosages; Stuve *et al.* *Neurology* 8:290-301 (2002)), androgen, hormone-replacement therapy, a TNF inhibitor such as etanercept (ENBREL[®]), infliximab (REMICADE[®]), and adalimumab (HUMIRA[™]), disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD), nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), plasmapheresis

or plasma exchange, trimethoprim-sulfamethoxazole (BACTRIM™, SEPTRA™), mycophenolate mofetil, H2-blockers or proton-pump inhibitors (during the use of potentially ulcerogenic immunosuppressive therapy), levothyroxine, cyclosporin A (e.g. SANDIMMUNE®), somatastatin analogue, cytokine, cytokine or cytokine receptor antibody or antagonist, anti-metabolite, rehabilitative surgery or colectomy, radioiodine, thyroidectomy, BAFF antagonist such as BAFF or BR3 antibodies or immunoadhesins, anti-CD40 receptor or anti-CD40 ligand (CD154), anti-IL-6 receptor antagonist or antibody, anti-IL-2 antibody such as daclizumab, another B-cell surface antagonist or antibody such as a humanized 2H7 or other humanized or human CD20 antibody with rituximab, oral corticosteroids (e.g. within 2 years prior to initial treatment with the CD20 antibody or antagonist), prednisone (e.g. prednisone equivalent dose of 20 mg/day for at least 2 weeks' duration), etanercept, infliximab, adalimumab, aminosalicylate (e.g. stable dose for ≥ 3 weeks), oral corticosteroids (e.g. stable dose for ≥ 2 weeks), 6-MP (e.g. treatment for a 3-month period, with a stable dose for ≥ 4 weeks), azathioprine (e.g. treatment for a 3-month period, with a stable dose for ≥ 4 weeks), calcineurin inhibitor, cyclosporine, tacrolimus, sirolimus, methotrexate, mycophenolate mofetil, topical rectal preparation, non-biologic cell-depleting therapy such as ADACOLUMN®, antibiotic, antidiarrheal, bile-acid binder such as cholestyramine, oral and/or topical 5-ASA, oral and/or topical steroid, MLN-02, mesalamine, cortisone cream, hydrocortisone enema, sulfasalazine, alsalazine, balsalazide, methylprednisolone, hydrocortisone, ACTH, intravenous corticosteroids, GELTEX™ (Genzyme), anti-CD3 antibody such as visilizumab (NUVION®), OPC-6535, CBP 1011, thalidomide, ISIS 2302, BXT-51072, a growth factor such as keratinocyte growth factor-2 (KGF-2; REPIFERMIN™), RPD-58, antegren, FK-506, etc.

Preferred second medicaments include one, two, three or four of: an aminosalicylate, an oral corticosteroid, 6-mercaptopurine (6-MP) and azathioprine.

In one preferred method of "combination therapy," herein, the invention concerns a method for treating inflammatory bowel disease (IBD) in a human subject with active IBD comprising administering to the subject an effective amount of a CD20 antibody and further comprising administering to the subject an effective amount of a second medicament selected from the group consisting of an aminosalicylate, an oral corticosteroid, 6-mercaptopurine (6-MP) and azathioprine.

All these second medicaments may be used in combination with each other or by themselves with the first medicament, so that the expression "second medicament" as used herein does not mean it is the only medicament besides the first medicament, respectively. Thus, the second medicament need not be one medicament, but may constitute or comprise more than one such drug.

These second medicaments as set forth herein are generally used in the same dosages and with administration routes as used hereinbefore or about from 1 to 99% of the heretofore-employed dosages. If such second medicaments are used at all, optionally, they are used in lower amounts than if the first medicament were not present, especially in subsequent dosings beyond the initial dosing with the first medicament, so as to eliminate or reduce side effects caused thereby. For instance, therapy with a CD20

antibody herein permits tapering or discontinued administration of steroid.

Combined administration herein includes co-administration, using separate formulations or a single pharmaceutical formulation, and consecutive administration in either order, wherein preferably there is a time period while both (or all) active agents simultaneously exert their biological activities.

For the retreatment method herein, where a second medicament is administered in an effective amount with an antibody set of doses, it may be administered with any set of doses, for example, only with one set of doses, or with more than one set of doses. In one embodiment, the second medicament is administered with the initial set of doses. In another embodiment, the second medicament is administered with the initial and second set of doses. In a still further embodiment, the second medicament is administered with all sets of doses.

The combined administration of a second medicament includes co-administration (concurrent administration), using separate formulations or a single pharmaceutical formulation, and consecutive administration in either order, wherein preferably there is a time period while both (or all) active agents (medicaments) simultaneously exert their biological activities.

The antibody or antagonist herein is administered by any suitable means, including parenteral, topical, subcutaneous, intraperitoneal, intrapulmonary, intranasal, and/or intralesional administration. Parenteral infusions include intramuscular, intravenous (i.v.), intraarterial, intraperitoneal, or subcutaneous administration. Intrathecal administration is also contemplated (see, *e.g.*, US 2002/0009444, Grillo-Lopez, A concerning intrathecal delivery of a CD20 antibody). In addition, the antibody or antagonist may suitably be administered by pulse infusion, *e.g.*, with declining doses of the antibody or antagonist. Preferably, the dosing is given intravenously or subcutaneously, and more preferably by intravenous infusion(s).

If multiple sets of doses of antibody are provided, each set of doses may be provided using the same or a different administration means. In one embodiment, each set of doses is by intravenous administration. In another embodiment, each set of doses is given by subcutaneous administration. In yet another embodiment, the sets of doses are given by both intravenous and subcutaneous administration, and the antibodies may be the same or different.

A discussion of methods of producing, modifying, and formulating such antagonists and antibodies follows.

III. Production of Antagonists and Antibodies

The methods and articles of manufacture of the present invention use, or incorporate, an antagonist or antibody that binds to a B-cell surface marker. Accordingly, methods for generating such antagonists or antibodies will be described here.

The B-cell surface marker to be used for production of, or screening for, antagonists or antibodies may be, *e.g.*, a soluble form of the antigen or a portion thereof, containing the desired epitope. Alternatively, or additionally, cells expressing the B-cell surface marker at their cell surface can be used to

generate, or screen for, antagonists or antibodies. Other forms of the B-cell surface marker useful for generating antagonists or antibodies will be apparent to those skilled in the art. Preferably, the B-cell surface marker is the CD20 antigen.

While the preferred antagonist is an antibody, antagonists other than antibodies are contemplated herein. For example, the antagonist may comprise a small molecule antagonist optionally fused to, or conjugated with, a cytotoxic agent (such as those described herein). Libraries of small molecules may be screened against the B cell surface marker of interest herein in order to identify a small molecule that binds to that antigen. The small molecule may further be screened for its antagonistic properties and/or conjugated with a cytotoxic agent.

The antagonist may also be a peptide generated by rational design or by phage display (see, *e.g.*, WO98/35036 published 13 August 1998). In one embodiment, the molecule of choice may be a "CDR mimic" or antibody analogue designed based on the CDRs of an antibody. While such peptides may be antagonistic by themselves, the peptide may optionally be fused to a cytotoxic agent so as to add or enhance antagonistic properties of the peptide.

A description follows as to exemplary techniques for the production of antibodies used in accordance with the present invention.

(i) *Polyclonal antibodies*

Polyclonal antibodies are preferably raised in animals by multiple subcutaneous (sc) or intraperitoneal (ip) injections of the relevant antigen and an adjuvant. It may be useful to conjugate the relevant antigen to a protein that is immunogenic in the species to be immunized, *e.g.*, keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor using a bifunctional or derivatizing agent, for example, maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride, SOCl_2 , or $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, where R and R^1 are different alkyl groups.

Animals are immunized against the antigen, immunogenic conjugates, or derivatives by combining, *e.g.*, 100 μg or 5 μg of the protein or conjugate (for rabbits or mice, respectively) with 3 volumes of Freund's complete adjuvant and injecting the solution intradermally at multiple sites. One month later the animals are boosted with 1/5 to 1/10 the original amount of peptide or conjugate in Freund's complete adjuvant by subcutaneous injection at multiple sites. Seven to 14 days later the animals are bled and the serum is assayed for antibody titer. Animals are boosted until the titer plateaus. Preferably, the animal is boosted with the conjugate of the same antigen, but conjugated to a different protein and/or through a different cross-linking reagent. Conjugates also can be made in recombinant cell culture as protein fusions. Also, aggregating agents such as alum are suitably used to enhance the immune response.

(ii) *Monoclonal antibodies*

Monoclonal antibodies are obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally

occurring mutations that may be present in minor amounts. Thus, the modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as not being a mixture of discrete antibodies.

For example, the monoclonal antibodies may be made using the hybridoma method first described by Kohler *et al. Nature*, 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (U.S. Patent No. 4,816,567).

In the hybridoma method, a mouse or other appropriate host animal, such as a hamster, is immunized as hereinabove described to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the protein used for immunization. Alternatively, lymphocytes may be immunized *in vitro*. Lymphocytes then are fused with myeloma cells using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

The hybridoma cells thus prepared are seeded and grown in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells. For example, if the parental myeloma cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (HAT medium), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred myeloma cells are those that fuse efficiently, support stable high-level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. Among these, preferred myeloma cell lines are murine myeloma lines, such as those derived from MOPC-21 and MPC-11 mouse tumors available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, and SP-2 or X63-Ag8-653 cells available from the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia USA. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Culture medium in which hybridoma cells are growing is assayed for production of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).

The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson *et al. Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

After hybridoma cells are identified that produce antibodies of the desired specificity, affinity, and/or activity, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Suitable culture media for this purpose include, for example, D-MEM or RPMI-1640 medium. In addition, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites tumors in an animal.

35 The monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated from the culture
40 medium, ascites fluid, or serum by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for
example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity
chromatography.

5 The monoclonal antibodies may also be produced recombinantly. DNA encoding the monoclonal
antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide
probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine
antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may
be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian
10 COS cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce
immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells.
Review articles on recombinant expression in bacteria of DNA encoding the antibody include Skerra *et al.*
Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) and Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

15 In a further embodiment, antibodies or antibody fragments can be isolated from antibody phage
libraries generated using the techniques described in McCafferty *et al. Nature*, 348:552-554 (1990).
Clackson *et al. Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al. J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describe
the isolation of murine and human antibodies, respectively, using phage libraries. Subsequent publications
describe the production of high affinity (nM range) human antibodies by chain shuffling (Marks *et al.*
BioTechnology, 10:779-783 (1992)), as well as combinatorial infection and *in vivo* recombination as a
20 strategy for constructing very large phage libraries (Waterhouse *et al. Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266
(1993)). Thus, these techniques are viable alternatives to traditional monoclonal antibody hybridoma
techniques for isolation of monoclonal antibodies.

25 The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human
heavy- and light-chain constant domains in place of the homologous murine sequences (U.S. Patent No.
4,816,567; Morrison, *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), or by covalently joining to the
immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin
polypeptide.

Typically such non-immunoglobulin polypeptides are substituted for the constant domains of an
antibody, or they are substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody to
30 create a chimeric bivalent antibody comprising one antigen-combining site having specificity for an
antigen and another antigen-combining site having specificity for a different antigen.

(iii) Humanized antibodies

Methods for humanizing non-human antibodies have been described in the art. Preferably, a
humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-
35 human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are
typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following
the method of Winter and co-workers (Jones *et al. Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al. Nature*,

332:323-327 (1988); Verhoeven *et al. Science*, 239:1534-1536 (1988)), by substituting hypervariable region sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567) wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some hypervariable region residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies is very important to reduce antigenicity. According to the so-called "best-fit" method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library of known human variable-domain sequences. The human sequence which is closest to that of the rodent is then accepted as the human framework region (FR) for the humanized antibody (Sims *et al. J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al. J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Another method uses a particular framework region derived from the consensus sequence of all human antibodies of a particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be used for several different humanized antibodies (Carter *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al. J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

It is further important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to a preferred method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, *i.e.*, the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the hypervariable region residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

(iv) *Human antibodies*

As an alternative to humanization, human antibodies can be generated. For example, it is now possible to produce transgenic animals (*e.g.*, mice) that are capable, upon immunization, of producing a full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy-chain joining region (J_H) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice will result in the production of human antibodies upon antigen challenge. See, *e.g.*, Jakobovits *et al.*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al. Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al. Year in Immuno.*, 7:33 (1993); and US Patent Nos. 5,591,669, 5,589,369 and 5,545,807.

Alternatively, phage display technology (McCafferty *et al. Nature* 348:552-553 (1990)) can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. According to this technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the B cell. Phage display can be performed in a variety of formats; for their review see, *e.g.*, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Several sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson *et al. Nature*, 352:624-628 (1991) isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated essentially following the techniques described by Marks *et al. J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), or Griffith *et al. EMBO J.* 12:725-734 (1993). See, also, US Patent Nos. 5,565,332 and 5,573,905.

Human antibodies may also be generated by *in vitro* activated B cells (see US Patents 5,567,610 and 5,229,275).

(v) *Antibody fragments*

Various techniques have been developed for the production of antibody fragments. Traditionally, these fragments were derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, *e.g.*, Morimoto *et al. Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) and Brennan *et al. Science*, 229:81 (1985)). However, these fragments can now be produced directly by recombinant host cells. For example, the antibody fragments can be isolated from the antibody phage libraries discussed above. Alternatively, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form F(ab')₂ fragments (Carter *et al. Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). According to another approach, F(ab')₂ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner. In other embodiments, the antibody of choice is a single chain Fv fragment (scFv). See WO 93/16185; US Patent No. 5,571,894; and US Patent No. 5,587,458. The antibody fragment may also be a "linear antibody," *e.g.*, as described in US Patent 5,641,870 for example. Such linear antibody fragments may be monospecific or bispecific.

(vi) *Bispecific antibodies*

Bispecific antibodies are antibodies that have binding specificities for at least two different epitopes. Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes of the B cell surface marker. Other such antibodies may bind a first B cell marker and further bind a second B cell surface marker.

Alternatively, an anti-B cell marker binding arm may be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (*e.g.* CD2 or CD3), or Fc receptors for IgG (FcγR), such as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the B cell. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to the B cell. These antibodies possess a B cell marker-binding arm and an arm that binds the cytotoxic agent (*e.g.* saporin, anti-interferon-α, vinca alkaloid, ricin A chain, methotrexate or radioactive isotope hapten). Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (*e.g.* F(ab')₂ bispecific antibodies).

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditional production of full-length bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy-chain-light-chain pairs, where the two chains have different specificities (Millstein *et al. Nature*, 305:537-539 (1983)). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. Purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, and in Traunecker *et al. EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

According to a different approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy-chain-light-chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation. This approach is disclosed in WO 94/04690. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al. Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

According to another approach described in US Patent No. 5,731,168, the interface between a pair

of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers that are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the C_H3 domain of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g. tyrosine or tryptophan).

Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g. alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Bispecific antibodies include cross-linked or "heteroconjugate" antibodies. For example, one of the antibodies in the heteroconjugate can be coupled to avidin, the other to biotin. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (US Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (WO 91/00360, WO 92/200373, and EP 03089). Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents are well known in the art, and are disclosed in US Patent No. 4,676,980, along with a number of cross-linking techniques.

Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have also been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al. Science*, 229: 81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab')₂ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

Recent progress has facilitated the direct recovery of Fab'-SH fragments from *E. coli*, which can be chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al. J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody F(ab')₂ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al. J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody

homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain.

Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See Gruber *et al. J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991).

IV. Conjugates and Other Modifications of the Antagonist or Antibody

The antagonist or antibody used in the methods or included in the articles of manufacture herein is optionally conjugated to another agent, such as a cytotoxic agent, or cytokine (for example IL2; see for example, WO2005/016969).

Conjugation will ordinarily be achieved through a covalent linkage, the precise nature of which will be determined by the targeting molecule and the linking site on the CD20 antagonist or antibody polypeptide. Typically, a non-peptidic agent is modified by the addition of a linker that allows conjugation to CD20 antagonist or antibody through its amino acid side chains, carbohydrate chains, or reactive groups introduced on CD20 antagonist or antibody by chemical modification. For example, a drug may be attached through the ϵ -amino group of a lysine residue, through a free α -amino group, by disulfide exchange to a cysteine residue, or by oxidation of the 1,2- diols in a carbohydrate chain with periodic acid to allow attachment of drugs containing various nucleophiles through a Schiff-base linkage. See, for example, U.S. Pat. No. 4,256,833. Protein modifying agents include amine-reactive reagents (*e.g.*, reactive esters, isothiocyanates, aldehydes, and sulfonyl halides), thiol-reactive reagents (*e.g.*, haloacetyl derivatives and maleimides), and carboxylic acid- and aldehyde-reactive reagents. CD20 antagonist or antibody polypeptides can be covalently joined to peptidic agents through the use of bifunctional cross-linking reagents. Heterobifunctional reagents are more commonly used and permit the controlled coupling of two different proteins through the use of two different reactive moieties (*e.g.*, amine-reactive plus thiol, iodoacetamide, or maleimide). The use of such linking agents is well known in the art. See, for example, Brinkley, *supra*, and U.S. Pat. No. 4,671,958. Peptidic linkers can also be employed. In the alternative, a CD20 antagonist or antibody polypeptide can be linked to a peptidic moiety through preparation of a fusion polypeptide.

Examples of further bifunctional protein coupling agents include N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-

ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene).

Alternatively, a fusion protein comprising the antagonist or antibody and agent may be made, *e.g.* by recombinant techniques or peptide synthesis.

Other modifications of the antagonist or antibody are contemplated herein. For example, the antagonist or antibody may be linked to one of a variety of nonproteinaceous polymers, *e.g.*, polyethylene glycol, polypropylene glycol, polyoxyalkylenes, or copolymers of polyethylene glycol and polypropylene glycol.

The antagonist or antibody disclosed herein may also be formulated as liposomes. Liposomes containing the antagonist or antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545; and WO97/38731 published October 23, 1997. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

Particularly useful liposomes can be generated by the reverse-phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of an antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin *et al. J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) via a disulfide interchange reaction. A chemotherapeutic agent is optionally contained within the liposome. See Gabizon *et al. J. National Cancer Inst.* 81(19):1484 (1989).

Amino acid sequence modification(s) of protein or peptide antagonist or antibodies described herein are contemplated. For example, it may be desirable to improve the binding affinity and/or other biological properties of the antagonist or antibody. Amino acid sequence variants of the antagonist or antibody are prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the antagonist or antibody nucleic acid, or by peptide synthesis. Such modifications include, for example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences of the antagonist or antibody. Any combination of deletion, insertion, and substitution is made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid changes also may alter post-translational processes of the antagonist or antibody, such as changing the number or position of glycosylation sites.

A useful method for identification of certain residues or regions of the antagonist or antibody that are preferred locations for mutagenesis is called "alanine-scanning mutagenesis" as described by Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). Here, a residue or group of target residues are identified (*e.g.*, charged residues such as arg, asp, his, lys, and glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (most preferably alanine or polyalanine) to affect the interaction of the amino acids with antigen. Those amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by introducing further or other variants at, or for, the sites of substitution. Thus, while the site for

introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation *per se* need not be predetermined. For example, to analyze the performance of a mutation at a given site, ala scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed antagonist or antibody variants are screened for the desired activity.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an antagonist or antibody with an N-terminal methionyl residue or the antagonist or antibody fused to a cytotoxic polypeptide. Other insertional variants of the antagonist or antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antagonist or antibody of an enzyme, or a polypeptide that increases the serum half-life of the antagonist or antibody.

Another type of variant is an amino acid substitution variant. These variants have at least one amino acid residue in the antagonist or antibody molecule replaced by different residue. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis of antibody antagonists include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 4 under the heading of "preferred substitutions". If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 4, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

Table 4

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	Ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; Norleucine	leu

Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; Norleucine	leu

Substantial modifications in the biological properties of the antagonist or antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;
- (3) acidic: asp, glu;
- (4) basic: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and
- (6) aromatic: trp, tyr, phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class.

Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the antagonist or antibody also may be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule and prevent aberrant crosslinking. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the antagonist or antibody to improve its stability (particularly where the antagonist or antibody is an antibody fragment such as an Fv fragment).

A particularly preferred type of substitutional variant involves substituting one or more

hypervariable region residues of a parent antibody. Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have improved biological properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way for generating such substitutional variants is affinity maturation using phage display. Briefly, several hypervariable region sites (*e.g.* 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino substitutions at each site. The antibody variants thus generated are displayed in a monovalent fashion from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (*e.g.* binding affinity) as herein disclosed. In order to identify candidate hypervariable region sites for modification, alanine-scanning mutagenesis can be performed to identify hypervariable region residues contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or in additionally, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and antigen. Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

Another type of amino acid variant of the antagonist or antibody alters the original glycosylation pattern of the antagonist or antibody. By altering is meant deleting one or more carbohydrate moieties found in the antagonist or antibody, and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the antagonist or antibody.

Glycosylation of polypeptides is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine and asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-acetylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

Addition of glycosylation sites to the antagonist or antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antagonist or antibody (for O-linked glycosylation sites).

Where the antagonist or antibody comprises an Fc region, the carbohydrate attached thereto may be altered. For example, antibodies with a mature carbohydrate structure that lacks fucose attached to an Fc region of the antibody are described in US Pat Appl No US 2003/0157108 A1, Presta, L. See also US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Antibodies with a bisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) in the carbohydrate attached to an Fc region of the antibody are referenced in WO03/011878,

Jean-Mairet *et al.* and US Patent No. 6,602,684, Umana *et al.* Antibodies with at least one galactose residue in the oligosaccharide attached to an Fc region of the antibody are reported in WO97/30087, Patel *et al.* See, also, WO98/58964 (Raju, S.) and WO99/22764 (Raju, S.) concerning antibodies with altered carbohydrate attached to the Fc region thereof.

The preferred glycosylation variant herein comprises an Fc region, wherein a carbohydrate structure attached to the Fc region lacks fucose. Such variants have improved ADCC function. Optionally, the Fc region further comprises one or more amino acid substitutions therein which further improve ADCC, for example, substitutions at positions 298, 333, and/or 334 of the Fc region (Eu numbering of residues). Examples of publications related to "defucosylated" or "fucose-deficient" antibodies include: US Pat. Appl. No. US 2003/0157108 A1, Presta, L; WO 00/61739A1; WO01/29246A1; US2003/0115614A1; US2002/0164328A1; US2004/0093621A1; US2004/0132140A1; US2004/0110704A1; US2004/0110282A1; US2004/0109865A1; WO03/085119A1; WO03/084570A1; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Examples of cell lines producing defucosylated antibodies include Lec13 CHO cells deficient in protein fucosylation (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US Pat Appl No US 2003/0157108 A1, Presta, L; and WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especially at Example 11), and knockout cell lines, such as alpha-1,6-fucosyltransferase gene, *FUT8*, knockout CHO cells (Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the antagonist or antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of the antagonist or antibody.

It may be desirable to modify the antagonist or antibody of the invention with respect to effector function, *e.g.* so as to enhance antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and/or complement dependent cytotoxicity (CDC) of the antagonist or antibody. This may be achieved by introducing one or more amino acid substitutions in an Fc region of an antibody antagonist or antibody. Alternatively or additionally, cysteine residue(s) may be introduced in the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron *et al. J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) and Shopes, B. J. *Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff *et al. Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered which has dual Fc regions and may thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson *et al. Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

WO00/42072 (Presta, L.) describes antibodies with improved ADCC function in the presence of human effector cells, where the antibodies comprise amino acid substitutions in the Fc region thereof. Preferably, the antibody with improved ADCC comprises substitutions at positions 298, 333, and/or 334 of the Fc region (Eu numbering of residues). Preferably the altered Fc region is a human IgG1 Fc region comprising or consisting of substitutions at one, two or three of these positions. Such substitutions are optionally combined with substitution(s) which increase C1q binding and/or CDC.

Antibodies with altered C1q binding and/or complement dependent cytotoxicity (CDC) are described in WO99/51642, US Patent No. 6,194,551B1, US Patent No. 6,242,195B1, US Patent No. 6,528,624B1 and US Patent No. 6,538,124 (Idusogie *et al.*). The antibodies comprise an amino acid substitution at one or more of amino acid positions 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 and/or 334 of the Fc region thereof (Eu numbering of residues). Substitution of one or more residues at positions 326, 327, 333 and/or 334 can improve C1q binding and/or CDC function.

To increase the serum half life of the antibody, one may incorporate a salvage receptor binding epitope into the antibody (especially an antibody fragment) as described in US Patent 5,739,277, for example. As used herein, the term "salvage receptor binding epitope" refers to an epitope of the Fc region of an IgG molecule (*e.g.*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, or IgG₄) that is responsible for increasing the *in vivo* serum half-life of the IgG molecule.

Antibodies with improved binding to the neonatal Fc receptor (FcRn), and increased half-lives, are described in WO00/42072 (Presta, L.) and US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). These antibodies comprise an Fc region with one or more substitutions therein which improve binding of the Fc region to FcRn. For example, the Fc region may have substitutions at one or more of positions 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 or 434 (Eu numbering of residues). The preferred Fc region-comprising antibody variant with improved FcRn binding comprises amino acid substitutions at one, two or three of positions 307, 380 and 434 of the Fc region thereof (Eu numbering of residues).

Engineered antibodies with three or more (preferably four) functional antigen binding sites are also contemplated (US Appln No. US2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

V. Pharmaceutical Formulations

Therapeutic formulations of the antagonist or antibody used in accordance with the present invention are prepared for storage by mixing an antagonist or antibody having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-

10 cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (*e.g.* Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN™, PLURONICS™ or polyethylene glycol (PEG).

15 Exemplary anti-CD20 antibody formulations are described in WO 1998/56418. This publication describes a liquid multidose formulation comprising 40 mg/mL rituximab, 25 mM acetate, 150 mM trehalose, 0.9% benzyl alcohol, 0.02% polysorbate 20 at pH 5.0 that has a minimum shelf life of two years storage at 2-8°C. Another anti-CD20 formulation of interest comprises 10 mg/mL rituximab in 9.0 mg/mL sodium chloride, 7.35 mg/mL sodium citrate dihydrate, 0.7 mg/mL polysorbate 80, and Sterile Water for Injection, pH 6.5.

20 Lyophilized formulations adapted for subcutaneous administration are described in US Pat No. 6,267,958 (Andya *et al.*). Such lyophilized formulations may be reconstituted with a suitable diluent to a high protein concentration and the reconstituted formulation may be administered subcutaneously to the subject to be treated herein.

25 The formulation herein may also contain more than one active compound (a second medicament as noted above) as necessary, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. The type and effective amounts of such medicaments depend, for example, on the amount of antagonist or antibody present in the formulation, and clinical parameters of the subjects being treated. The preferred such medicaments are noted above.

30 The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

35 Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antagonist or antibody, which matrices are in the form of shaped articles, *e.g.* films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

VI. Articles of Manufacture

In another embodiment of the invention, articles of manufacture containing materials useful for the treatment of a IBD described above are provided. In one aspect, the article of manufacture comprises (a) a container comprising an antagonist (*e.g.* an antibody) that binds to a B-cell surface marker (*e.g.*, CD20), optionally in a pharmaceutically acceptable carrier or diluent; and (b) a package insert with instructions for treating a IBD in a human subject.

In all of these aspects, the package insert is on or associated with the container. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, *etc.* The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds or contains a composition that is effective for treating the IBD and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is the antagonist or antibody. The label or package insert indicates that the composition is used for treating a human subject eligible for treatment, *e.g.*, one having or predisposed to IBD, including moderate-severe IBD or UC, with specific guidance regarding dosing amounts and intervals of antagonist or antibody and any other medicament being provided. The article of manufacture may further comprise an additional container comprising a pharmaceutically acceptable diluent buffer, such as bacteriostatic water for injection (BWFI), phosphate-buffered saline, Ringer's solution, and/or dextrose solution. The article of manufacture may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, and syringes.

The article of manufacture herein optionally further comprises a container comprising a second medicament, wherein the antibody is a first medicament, and which article further comprises instructions on the package insert for treating the subject with the second medicament, in an effective amount. The second medicament may be any of those set forth above, with an exemplary second medicament being an aminosalicylate, an oral corticosteroid, 6-mercaptopurine (6-MP), and azathioprine.

Further details of the invention are illustrated by the following non-limiting Example. The disclosures of all citations in the specification are expressly incorporated herein by reference.

Example 1

Therapy of IBD

This is an evaluation of rituximab in human subjects with active UC as defined in the inclusion criteria. Gene microarray data have demonstrated that B-cell genes and CD20 expression are upregulated in human UC. This example provides a protocol for therapy of UC subjects.

Study schema for this protocol depicted in Fig. 4.

Therapy herein includes a screening period of about 2 weeks, a study period of about 24 weeks, and a follow-up period of 24 weeks. Rigorous evaluations of safety will be performed throughout the

study. The screening period from Day -14 to Day 0 includes a medical history, physical examination, laboratory assessments, collection of diary data, and a flexible sigmoidoscopy with biopsies to confirm active disease and determine the baseline Disease Activity Index (DAI) score. The DAI score is used to identify potential subjects for enrollment in the study and to assess the clinical activity of rituximab.

Subjects will receive a 1 gram intravenous (IV) infusion of rituximab (or placebo) on Days 1 and 15. All subjects will continue on stable doses of one or more of the following through at least Week 8: an aminosalicylate, an oral corticosteroid, 6-MP, and/or azathioprine. Safety monitoring with periodic laboratory and physical examination evaluations will be performed at all study visits. After the Day 1 and 15 visits, subjects will have scheduled visits every 4 weeks to Week 24 and then every 3 months to Week 48. In addition, subjects will return on Day 2 and Day 16 for pharmacokinetic (PK) samples only. Repeat flexible sigmoidoscopy with biopsies will be performed at Week 8 for histology, disease assessment, and evaluation of mucosal B-cell depletion. An additional sigmoidoscopy with biopsies will be performed at Week 24 to evaluate disease status and recovery of B-cell depletion in colonic mucosa. The histologic assessment of inflammation in the biopsy specimens will be scored according to a standardized scale (Geboes *et al.*, *Gut* 47:404-409 (2000)).

A DAI score will be calculated at Week 8 to determine the proportion of subjects achieving disease remission. The DAI score will also be calculated at the Week 24 visit. A clinical assessment will be performed at visits when a flexible sigmoidoscopy is not performed (*i.e.*, Days 1 and 15 and Weeks 4, 12, 16, 20, 36, and 48). Subjects will be followed by the investigator and the Sponsor until Week 48 or until B-cell recovery, whichever is longer. B-cell recovery is defined as B-cell levels that have returned to baseline (Day 1) or to the lower limit of normal.

This example provides an evaluation of the safety and tolerability of rituximab in adult subjects with active UC. The primary safety outcome measure is the frequency of targeted events of protocol-defined UC exacerbations (worsening of disease).

B-cell evaluation will continue until Week 48 or B-cell recovery, whichever is longer.

This example also evaluates the therapeutic clinical activity of rituximab in UC using the DAI scoring system as defined below. A DAI scoring system for assessment of UC activity has been used in pivotal clinical trials (Schroeder *et al.*, *N Engl J Med* 317:1625-1629 (1987)). Remission of signs and symptoms of active disease, as evidenced by cessation of rectal bleeding and healing of friable mucosa, has been chosen as a secondary endpoint for clinical activity. Duration of remission will also be measured. The flexible sigmoidoscopy results and DAI score at Week 24 and clinical follow-up to Week 48 will enable evaluation of the duration of the therapeutic effect.

OUTCOME MEASURES

Primary Safety Outcome Measure

The primary safety outcome measure is the targeted adverse event frequency of protocol-defined UC

exacerbations occurring during the study period (Day 1 to Week 24).

A protocol-defined UC exacerbation must satisfy one or more of the following criteria:

- A ≥ 3 -point increase in DAI score
- Suspected or impending toxic megacolon
- Need for hospitalization for an exacerbation of UC
- In the clinical judgment of the investigator, medically significant worsening of disease

Secondary Outcome Measures

Secondary outcome measures are the following:

- Other safety outcome measures
- Incidence of serious infections, defined as infections requiring hospitalization or IV antibiotics
- Incidence of all adverse events (serious and non-serious) graded according to National Cancer Institute Common Toxicity Criteria of Adverse Events (NCI-CTCAE), Version 3.0
- Incidence of clinical laboratory abnormalities
- Proportion of subjects who achieve disease remission at Week 8
- Disease remission is defined as a sigmoidoscopy score of 0 or 1 (no friability) and rectal bleeding score of 0.
- Proportion of subjects achieving a clinical response at Week 8
- Clinical response is defined as a reduction of ≥ 3 points in the DAI score.
- Time to disease remission
- Duration of disease remission as determined by the investigator
- Change from baseline during the study period in results of the Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (IBDQ)

The effects of rituximab on several pharmacodynamic markers will be examined by comparing blood, serum, and tissue samples at baseline and during treatment. These assessments will be as follows:

- Blood lymphocyte panel with B-cell count (CD19+ and other B-cell phenotype subsets)
- Serum Ig levels (total, IgA, IgG, and IgM)
- Antibodies specific to UC (p-ANCA)
- B-cell depletion in colonic biopsies, as measured by immunohistochemistry (IHC)

SUBJECTS

Inclusion Criteria

Subjects must meet the following criteria to be eligible for study entry:

- Written informed consent
- Age 18–75 years and capable of understanding study procedures
- Diagnosis of UC ≥ 6 months at screening
- ≥ 20 cm of active disease at screening sigmoidoscopy
- Active disease, as defined by a DAI score between ≥ 6 and ≤ 11 , with ≥ 2 for rectal bleeding and ≥ 2 for flexible sigmoidoscopy at screening
- Treatment with oral corticosteroids for UC within 2 years prior to screening
- Treatment intensity should have been equal to or greater than a prednisone equivalent dose of 20 mg/day for at least 2 weeks' duration.
- Colonoscopy within the past 2 years for extent of disease and to exclude polyps
- Colonoscopy with appropriate biopsies to exclude dysplasia within 1 year prior to screening if UC disease > 10 years
- For subjects of reproductive potential (males and females), use a reliable means of contraception (e.g., hormonal contraceptive, patch, vaginal ring, intrauterine device, physical barrier) during study treatment and for 1 year following the last dose of study drug
- Withdrawal of all previous investigative biologic therapy (e.g., etanercept, infliximab, adalimumab, rituximab) at least 15 weeks prior to randomization
- Current treatment with one or more of the following therapies on a stable dose for the indicated period prior to baseline (Day 1):
 - Aminosalicylate, stable dose for ≥ 3 weeks
 - Oral corticosteroids, stable dose for ≥ 2 weeks
 - 6-MP treatment for a 3-month period, with a stable dose for ≥ 4 weeks
 - Azathioprine treatment for a 3-month period, with a stable dose for ≥ 4 weeks
- For the therapies listed above that have been used previously but not currently at Day 1, subjects need to have discontinued aminosalicylates for ≥ 2 weeks and to have discontinued azathioprine treatment, 6-MP treatment, or oral corticosteroids for ≥ 4 weeks prior to baseline.

Exclusion Criteria

Subjects who meet any of the following criteria will be excluded from study entry:

- Severe colitis as evidenced by investigator judgment that the subject is likely to require a colectomy or institution of a calcineurin inhibitor within 12 weeks of baseline (Day 1)
- Clinical suspicion or radiographic evidence of colonic perforation or toxic Megacolon
- History of primary sclerosing cholangitis
- History of colonic dysplasia and/or adenomatous polyps in the colon
- Treatment with cyclosporine, tacrolimus, sirolimus, methotrexate, or mycophenolate mofetil within 8 weeks prior to screening
- Treatment with a topical rectal preparation within 2 weeks prior to screening
- Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) other than low-dose aspirin within 4 weeks prior to baseline
- Positive stool for ova or parasites, positive stool culture for pathogens, or positive stool toxin assay for *Clostridium difficile* at screening
- Receipt/treatment with any live vaccines within 4 weeks prior to randomization
- Previous treatment with any non-biologic cell-depleting therapies such as ADACOLUMN®
- History of colonic or small bowel obstruction or resection
- Use of antidiarrheal agents during the screening period
- History of hepatitis B or C

Exclusions for General Safety

- History of severe allergic or anaphylactic reactions to humanized, chimeric, or fully human antibodies or murine monoclonal antibodies
- Significant cardiac or pulmonary disease (including obstructive pulmonary disease)
- Evidence of significant uncontrolled concomitant diseases such as cardiovascular disease or nervous system, pulmonary, renal, hepatic, endocrine, or gastrointestinal disorders
- Known active bacterial, viral, fungal, mycobacterial, or other infection (including tuberculosis or atypical mycobacterial disease, but excluding fungal infections of nail beds) or any major episode of infection requiring hospitalization or treatment with IV antibiotics within 4 weeks of screening or oral antibiotics within 2 weeks of screening
- History of recurrent significant infection or recurrent bacterial infections
- Primary or secondary immunodeficiency (history of or currently active), including HIV
- History of cancer, including solid tumors and hematologic malignancies (except basal cell and squamous cell carcinomas of the skin that have been excised and cured)
- Pregnant women or nursing (breast feeding) mothers

- History of alcohol, drug, or chemical abuse within the 6 months prior to screening
- Lack of peripheral venous access

Laboratory Exclusion Criteria (at screening)

- Serum creatinine >1.4 mg/dL for women or ≥ 1.6 mg/dL for men
- Aspartate aminotransferase (AST) or alanine aminotransferase (ALT) >2.5 times upper limit of normal
- Platelet count <100,000/ μ L
- Hemoglobin <8.5 g/dL
- Neutrophils <1500/ μ L
- Lymphocyte count <100/ μ L
- Positive hepatitis B or C serology
- IgG <5.65 mg/mL
- IgM <0.55 mg/mL
- B-cell count $\leq 1.1\%$
- Electrocardiogram (ECG) showing a significant cardiac abnormality that the Principal Investigator determines may jeopardize the subject's health by participating in this study

STUDY TREATMENT

Formulation

Rituximab is formulated for IV administration as a sterile product in 9.0 mg/mL sodium chloride, 0.7 mg/mL polysorbate 80, 7.35 mg/mL sodium citrate dehydrate, and Sterile Water for Injection (pH 6.5). The antibody is supplied for market use in 10-mL and 50-mL vials at a concentration of 10.0 mg/mL. The 10-mL vials contain 100 mg of antibody. The 50-mL vials contain 500 mg of antibody. No preservative is used because the vial is designed for single use. Study sites will be supplied 50-mL vials of 500 mg of rituximab and 50-mL vials of matching placebo.

Dosage, Administration, and Storage

Study treatment will consist of 1 gram of rituximab or placebo equivalent administered IV on Days 1 and 15. Subjects will receive prophylactic treatment with acetaminophen (1 g) and diphenhydramine HCl (50 mg), or their equivalent, by mouth 30–60 minutes prior to the start of each infusion. Subjects may be hospitalized for observation, particularly for their first infusion, at the discretion of the investigator. Rituximab must be administered under close supervision, and full resuscitation facilities must be immediately available. If a protocol-defined UC exacerbation occurs prior to the second infusion, the

second infusion will be held.

Rituximab solutions for infusion are stable at 2°C–8°C (36°F–46°F) for 24 hours and at room temperature for an additional 24 hours. Do not use beyond the expiration date stamped on the carton. No incompatibilities between rituximab and polyvinyl chloride or polyethylene bags have been observed.

CONCOMITANT AND EXCLUDED THERAPIES

Prior to baseline (Day 1), all subjects will be on stable doses of an aminosalicylate, an oral corticosteroid, 6-MP, and/or azathioprine for variable periods prior to baseline. Throughout the study and follow-up periods, subjects should maintain their constant dose of aminosalicylate, 6-MP, and/or azathioprine. Oral corticosteroid doses should remain stable until after Week 8, if medically acceptable. Tapering should be instituted if medically indicated after Week 8.

Therapies for disease conditions other than UC may be continued, except as noted below. Use of live virus or bacteria vaccines is prohibited from Day –28 through the end of the study period. These vaccines may include, but are not limited to, measles, mumps, rubella, polio, bacille Calmette-Guerin, yellow fever, and TY21a typhoid. Vaccines that do not contain live organisms (*e.g.*, influenza, Pneumovax®, tetanus) are not prohibited, but may not be effective. It is recommended that a subject's vaccination record and possible requirements be reviewed, and, if necessary, any required vaccination/booster be given at least 28 days prior to initiation of study drug treatment.

Treatment with cyclosporine, tacrolimus, sirolimus, methotrexate, or mycophenolate mofetil is prohibited within 8 weeks of screening and during the study. Cyclosporine in any formulation may be used at the discretion of the investigator as a rescue medication for a protocol-defined UC exacerbation. If rescue medication is needed prior to Week 8, the subject will be considered a non-responder but should continue scheduled study visits.

Other excluded medications during the study period are as follows:

- Antibiotics to treat UC

Antibiotics may be used to treat infections as medically indicated but not as a therapy of UC.

- NSAIDs, with the exception of low-dose aspirin for cardiovascular prophylaxis
- Topical rectal therapies for UC
- Antidiarrheals
- Laxatives
- Bile-acid binders such as cholestyramine
- Investigational drugs or treatments is prohibited

ASSAY METHODS

Serum samples will be obtained for PK and HACA analyses at timepoints according to the assessment schedule.

The rituximab PK enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) will be used to measure

rituximab level in human serum samples.

The rituximab HACA ELISA is a bridging assay, which uses rituximab as the capturing reagent and biotinylated-rituximab and streptavidin-HRP for detection. The assay uses a calibrator curve prepared with affinity-purified polyclonal goat antibodies to rituximab; therefore, results from this assay are reported relative to this polyclonal antibody in terms of relative units.

All p-ANCA analysis will be performed by a central laboratory. Indirect immunofluorescence will be used to determine the presence of ANCAs. In addition, ELISA assays may be used to determine the specificity of ANCA for myeloperoxidase or other relevant antigens as determined by the central laboratory.

Clinical Activity Analyses

The clinical activity of rituximab in UC will be evaluated. The proportions of subjects experiencing disease remission and the proportions of subjects with clinical responses at Week 8 will be estimated and corresponding 95% confidence intervals will be generated for each treatment arm. Treatment differences and 95% confidence intervals will be provided.

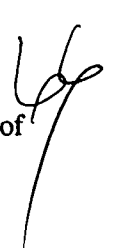
Duration of disease remission will be summarized by treatment arm. Median time to disease remission response will be summarized for each treatment arm using the Kaplan-Meier method for descriptive purposes only.

Subjects with active UC treated with the rituximab antibody as described above, will experience an improvement in the signs and symptoms of UC, including disease remission and/or clinical response (achieved by week 8), attainment of a sigmoidoscopy score of 0 or 1, and rectal bleeding score of 0, a reduction in DAI score (by greater than or equal to 3 points), a reduction in B-cells in colonic mucosa, and/or a reduction in p-ANCA antibody level.

From the foregoing, it will be appreciated that, although specific embodiments of the invention have been described herein for purposes of illustration, various modifications may be made without deviating from the spirit and scope of the invention. Accordingly, the invention is not limited except as by the appended claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for treating moderate-severe inflammatory bowel disease (IBD) in a human subject comprising administering to the subject an effective amount of a CD20 antibody, wherein administration of the antibody results in a clinical response or disease remission.
2. The method of claim 1 wherein the IBD is ulcerative colitis (UC).
3. The method of claim 1 wherein the IBD is Crohn's disease.
4. The method of any one of the preceding claims wherein the subject has active IBD.
5. The method of any one of the preceding claims wherein administration of the antibody results in disease remission.
6. The method of claim 5 wherein remission is achieved at about week 8.
7. The method of claim 5 or claim 6 wherein administration of the antibody results in a sigmoidoscopy score of 0 or 1 and rectal bleeding score of 0.
8. The method of any one of the preceding claims wherein administration of the antibody results in a clinical response.
9. The method of claim 8 wherein the clinical response is achieved at about week 8.
10. The method of claim 8 or claim 9 wherein administration of the antibody reduces disease activity index (DAI) score.
11. The method of claim 10 wherein the DAI score, scored using the scoring system in Table 2 herein, is reduced by greater than or equal to 3 points.
12. The method of any one of the preceding claims wherein administration of the antibody reduces B cells in colonic mucosa.
13. The method of any one of the preceding claims wherein the antibody is a chimeric, human, or humanized antibody.
14. The method of any one of the preceding claims wherein the antibody comprises rituximab.
15. The method of any one of claims 1 to 13 wherein the antibody comprises humanized 2H7.
16. The method of any one of claims 1 to 13 wherein the antibody comprises 2F2 (huMax-CD20).
17. The method of any one of the preceding claims wherein the antibody is a naked antibody.
18. The method of any one of claims 1 to 16 wherein the antibody is conjugated with another molecule.
19. The method of any one of the preceding claims wherein the antibody is administered as a dose in the range from about 200 mg to 2000 mg at a frequency of about one to four doses within a period of about one month.
20. The method of claim 19 wherein the dose is in the range from about 500 mg to 1500 mg.
21. The method of claim 19 or 20 wherein the dose is in the range from about 750 mg to 1200 mg.
22. The method of any one of claims 19 to 21 wherein the antibody is administered in one or two doses.

- 
23. The method of any one of claims 19 to 22 wherein the antibody is administered within a period of about 2 to 3 weeks.
24. The method of claim 23 wherein the period is about two weeks.
25. The method of any one of the preceding claims wherein the antibody is administered intravenously.
26. The method of any one of the preceding claims wherein the antibody is administered subcutaneously.
27. The method of any one of the preceding claims wherein a second medicament is administered in an effective amount, wherein the CD20 antibody is a first medicament.
28. The method of claim 27 wherein the second medicament is more than one medicament.
29. The method of claim 27 or claim 28 wherein the second medicament is selected from the group consisting of an aminosalicylate, an oral corticosteroid, 6-mercaptopurine (6-MP) and azathioprine.
30. The method of any one of claims 27 to 29 wherein the second medicament is administered in a lower amount than is used if the CD20 antibody is not administered to a subject treated with the second medicament.
31. The method of any one of the preceding claims wherein the subject has never been previously treated with a CD20 antibody.
32. The method of any one of the preceding claims wherein the subject is not suffering from a B cell malignancy.
33. The method of any one of the preceding claims wherein the subject is not suffering from an autoimmune disease, other than IBD.
34. A method for treating inflammatory bowel disease (IBD) in a human subject with active IBD comprising administering only one or two doses of a CD20 antibody to the subject, wherein disease remission or clinical response is achieved upon administration of the one or two doses of the CD20 antibody.
35. The method of claim 34 wherein the one or two doses are administered intravenously (IV).
36. The method of claim 34 wherein the one or two doses are administered subcutaneously (SQ).
37. The method of claim 34 wherein two intravenous doses are administered, wherein each of the two doses is in the range from about 200 mg to about 2000 mg.
38. A method for treating inflammatory bowel disease (IBD) in a human subject with active IBD comprising administering to the subject an effective amount of a CD20 antibody and further comprising administering to the subject an effective amount of a second medicament selected from the group consisting of an aminosalicylate, an oral corticosteroid, 6-mercaptopurine (6-MP) and azathioprine.
39. A method for reducing a disease activity index (DAI) score in a human subject with active ulcerative colitis (UC) comprising administering a CD20 antibody to the subject in an amount

bX

effective to reduce DAI score.

40. The method of claim 39 wherein the DAI score, scored using the scoring system in Table 2 herein, is reduced by greater than or equal to 3 points.
41. The method of any one of the preceding claims wherein the subject has an atypical level of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA), or anti-human tropomyosin isoform 5 (hTM5) autoantibody.
42. An article of manufacture comprising:
- i. a container comprising a CD20 antibody; and
 - ii. a package insert with instructions for treating inflammatory bowel disease (IBD) in a human subject, wherein the instructions indicate that an effective amount of the CD20 antibody is administered to the human subject.



Sequence Alignment of Variable Light Domains

	FR1 1020	CDR1 3040
2H7	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC	[RASSSVS-YMH] WYQQKP
	* * * *	* * * *
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[RASSSVS-YMH] WYQQKP
		* * * *
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[RASQISNYLA] WYQQKP
	FR2 50	CDR2 607080
2H7	GSSPKPWIY	[APSNLAS] GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEA
	* *	* * * *
hu2H7.v16	GKAPKPLIY	[APSNLAS] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
	*	* * *
hum KI	GKAPKLLIY	[AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
	CDR3 90	FR4 100
2H7	EDAATYYC	[QQWSFNPPT] FGAGTKLELKR
	*	* * *
hu2H7.v16	EDFATYYC	[QQWSFNPPT] FGQGTKVEIKR
		* * * *
hum KI	EDFATYYC	[QQYNSLPWT] FGQGTKVEIKR

FIG. 1A

69

Sequence Alignment of Variable Heavy Domains

	FR1 1020	CDR1 3040	
2H7	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS	[GYTFTSYNMH]	WVKQT
	*** ** *		* *
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFTSYNMH]	WVRQA
		* * *	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA
	FR2 50a60	CDR2 7080	FR3
2H7	PRQGLEWIG	[AIYPGNGDTSYNQKFKG]	KATLTVDKSSSTAYM
	** *		** ** ** *
hu2H7.v16	PGKGLEWVG	[AIYPGNGDTSYNQKFKG]	RFTISVDKSKNTLYL
	* * *		* *
hum III	PGKGLEWVA	[VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNSKNTLTL
	CDR3 abc90100abcde	FR4 110	
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR	[VVYYSNSYWYFDV]	WGTGTTVTVSS
	** ** *		*
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[VVYYSNSYWYFDV]	WGQGTLLVTVSS
		***** ** *	
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLY---DY]	WGQGTLLVTVSS

FIG. 1B

Light Chain Alignment

	1	32
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP	

hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
	52	
hu2H7.v16	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG	

hu2H7.v511	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG	
	102	
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	

hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
	152	
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	

hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
	202	214
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC	

hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC	

FIG. 2

71

Heavy Chain Alignment

hu2H7.v16	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW	
hu2H7.v511		*****	
hu2H7.v16	37	VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL	52a
hu2H7.v511		*****	82abc
hu2H7.v16	83	RAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLVTVSS	100abcde
hu2H7.v511		*****	113
hu2H7.v16	118	ASTKGPSVFPLAPS	
hu2H7.v511		*****	
hu2H7.v16	132	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS	
hu2H7.v511		*****	
hu2H7.v16	182	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA	
hu2H7.v511		*****	
hu2H7.v16	232	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	
hu2H7.v511		*****	
hu2H7.v16	282	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP	
hu2H7.v511		*****	
hu2H7.v16	332	IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
hu2H7.v511		* *****	
hu2H7.v16	382	ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA	
hu2H7.v511		*****	
hu2H7.v16	432	LHNHYTQKSLSLSPGK	447
hu2H7.v511		*****	
hu2H7.v16		LHNHYTQKSLSLSPGK	

FIG. 3

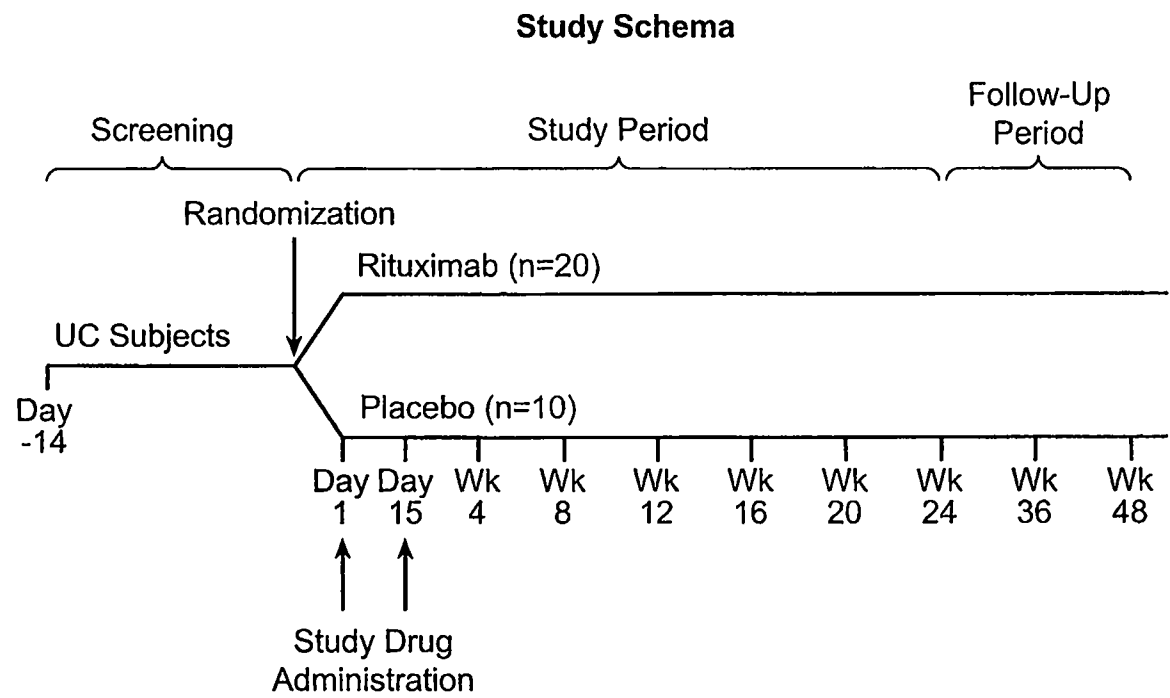


FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/013780

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395 A61P37/06 A61K31/00 ADD. C07K16/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/056312 A (GENENTECH, INC.) 8 July 2004 (2004-07-08) cited in the application page 36, line 33 - line 34 page 37, line 41 claims 41,42	1-38,41, 42
X	WO 2004/035607 A (GENMAB A/S & MEDAREX, INC.) 29 April 2004 (2004-04-29) cited in the application page 57, line 20 page 59, line 29 claims 73,85	1-38,41, 42
X	US 6 100 245 A (SOX) 8 August 2000 (2000-08-08) the whole document	39-41
-/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 July 2006		Date of mailing of the international search report 09/08/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 661 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/013780

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	K. PAPADAKIS ET AL.: "Anti-CD20 chimeric monoclonal antibody (rituximab) treatment of immune-mediated thrombocytopenia associated with Crohn's disease." GASTROENTEROLOGY, vol. 124, no. 2, February 2003 (2003-02), page 583, XP002392206 USA last paragraph	1-42
A	E. MIZOGUCHI ET AL.: "Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease." INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 12, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 97-605, XP002392207 cited in the application abstract	1-42
A	J. EDWARDS ET AL.: "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 30, no. 4, August 2002 (2002-08), pages 824-828, XP002306250 Colchester, GB cited in the application the whole document	1-42
P,X	WO 2005/117972 A (GENENTECH INC. ET AL.) 15 December 2005 (2005-12-15) example 3 claims 1,10	1-42
P,X	WO 2005/060999 A (GENENTECH INC.) 7 July 2005 (2005-07-07) example 3 claims 1,11	1-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/013780

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-41 (partially)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-41 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/013780

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004056312	A	08-07-2004	AU 2003301079 A1	14-07-2004
			BR 0316779 A	01-11-2005
			CA 2507898 A1	08-07-2004
			EP 1572744 A2	14-09-2005
			HR 20050649 A2	31-12-2005
			MA 27704 A1	02-01-2006
			MX PA05006511 A	17-02-2006
			US 2006024300 A1	02-02-2006
WO 2004035607	A	29-04-2004	AU 2003301445 A1	04-05-2004
			BR 0315295 A	30-08-2005
			CA 2502552 A1	29-04-2004
			EP 1558648 A2	03-08-2005
			JP 2006507844 T	09-03-2006
			MX PA05004022 A	05-10-2005
US 6100245	A	08-08-2000	AT 273013 T	15-08-2004
			BR 0002640 A	12-06-2001
			CA 2311035 A1	07-03-2001
			CN 1286978 A	14-03-2001
			DE 60012836 D1	16-09-2004
			DE 60012836 T2	01-09-2005
			EP 1084706 A2	21-03-2001
			ES 2225027 T3	16-03-2005
			JP 2001106630 A	17-04-2001
			MX PA00005545 A	24-04-2002
WO 2005117972	A	15-12-2005	NONE	
WO 2005060999	A	07-07-2005	AU 2004305560 A1	07-07-2005

P2211R1.txt
Sequence Listing

<110> GENENTECH, INC.
GUJRATHI, Sheila

<120> TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)

<130> P2211R1

<141> 2006-04-13

<150> US 60/671,902

<151> 2005-04-15

<160> 24

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro
1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro
35 40 45

Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
65 70 75

Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
95 100 105

Lys Arg

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 2

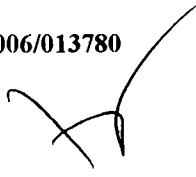
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
Page 1



P2211R1.txt
70

65 75
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105
Lys Arg

<210> 3
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 3
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
20 25 30
Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

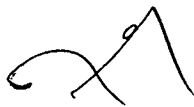
<400> 4
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5
Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6



p2211R1.txt

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
5

<210> 7
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val
110 115 120

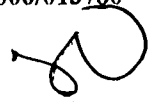
Ser Ser

<210> 8
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

P2211R1.txt



Ser Ser

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Thr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu
95 100 105
Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 11
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12
Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
5 10

<210> 13

P2211R1.txt

<211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

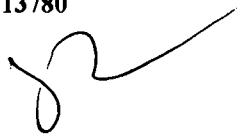
<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 13
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90
 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 110 115 120
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 125 130 135
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 140 145 150
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 155 160 165
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 170 175 180
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 185 190 195
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 200 205 210
 Gly Glu Cys

<210> 14
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30



P2211R1.txt
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
185 190 195
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
200 205 210
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
215 220 225
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
320 325 330
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
335 340 345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
350 355 360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
365 370 375



P2211R1.txt

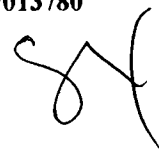
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
380 385 390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
395 400 405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
440 445 450

Gly Lys

<210> 15
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 15
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
35 40 45
Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90
Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
110 115 120
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125 130 135
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
140 145 150
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
155 160 165
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
170 175 180
Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
185 190 195
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg

P2211R1.txt
205

200

210

Gly Glu Cys

<210> 16
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
95 100 105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
185 190 195
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
200 205 210
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
215 220 225
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

P2211R1.txt

Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
				275					280					285
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
				290					295					300
Tyr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
				305					310					315
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
				320					325					330
Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
				335					340					345
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
				350					355					360
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
				365					370					375
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
				380					385					390
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				395					400					405
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				410					415					420
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
				425					430					435
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
				440					445					450

Gly Lys

<210> 17
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105

P2211R1.txt

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
185 190 195

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
200 205 210

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
215 220 225

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
320 325 330

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
335 340 345

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
350 355 360

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
365 370 375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
380 385 390

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

P2211R1.txt
445

440

450



Gly

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 18
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
35 40 45
Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90
Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105

Lys Arg

<210> 19
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 19
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
95 100 105

P2211R1.txt

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser

<210> 20
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 20
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
95 100 105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
185 190 195
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
200 205 210
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
215 220 225
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

P2211R1.txt

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300
Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
320 325 330
Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
335 340 345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
350 355 360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
365 370 375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
380 385 390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
395 400 405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
440 445 450

Gly

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<220>
<221> Xaa
<222> 9
<223> Xaa is M or L

<400> 21
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Xaa His
5 10

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<220>
<221> Xaa
<222> 4

P2211R1.txt



<223> Xaa is S or A

<400> 22

Gln Gln Trp Xaa Phe Asn Pro Pro Thr
5

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<220>

<221> Xaa

<222> 8

<223> Xaa is D or A

<400> 23

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> Xaa is N, A, Y, W or D

<220>

<221> Xaa

<222> 7

<223> Xaa is S or R

<400> 24

Val Val Tyr Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
5 10

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

VERSIÓN CORREGIDA

(19) Organización Mundial de Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
26 de Octubre de 2006 (26.10.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/113308 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(21) Numero de Solicitud Internacional:
PCT/US2006/013780

(22) Fecha de Presentación Internacional:
13 de Abril de 2006 (13.04.2006)

(25) Lenguaje de entrega: Inglés

(26) Lenguaje de Publicación: Inglés

(30) Datos de la Prioridad:
60/671,902 15 de Abril de 2005 (15.04.2005) EU

(71) Solicitante (para todos los estados designados excepto US): GENENTECH, INC. [EU/EU]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US)

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes (solo para EU): GUJRATHI, Sheila [EU/EU]; 682 Clipper Street, San Francisco, California 94114 (EU).

(74) Agentes: LEE, Wendy, M.; c/o Genetech, Inc., 1 DNA Way, MS 49, South San Francisco, CA 94080 (EU).

(81) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección nacional

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

(84) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— con el informe de búsqueda internacional

(48) Fecha de Publicación de Esta Versión Corregida:
18 de Enero de 2007

(15) Información sobre la Corrección:
ver Gaceta PCT No. 03/2007 del 18 de Enero de 2007

Para códigos de dos letras y otras abreviaciones, referirse a las "Notas de guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada edición de la Gaceta del PCT

(54) Título: TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII).

(57) Resumen: La presente invención concierne el tratamiento de EII, especialmente la colitis ulcerativa (CU), con un anticuerpo que se enlaza al CD20.

92

5 **TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII)**

 Esto es una prioridad de reivindicación de una solicitud no provisional bajo 35 USC §119 para la solicitud provisional nº 60/671.902, presentada el 15 de abril de 2005, y cuya divulgación completa se incorpora a la presente memoria descriptiva como referencia.

10 **Campo de la invención**

 La presente invención se refiere al tratamiento de la EII, especialmente la colitis ulcerativa (CU), con un anticuerpo que se une al CD20.

Antecedentes de la invención

15 **Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)**

 La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es el nombre de un grupo de trastornos que provocan la inflamación de los intestinos. Los síntomas de la EII incluyen calambres y dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso y hemorragia intestinal. La opinión de consenso actual sobre la patogénesis de la EII se centra en el papel de la desregulación determinada por vía genética en la respuesta inmune del anfitrión a la flora bacteriológica residente (Pallone y col., *The immune system in inflammatory bowel disease*, en Satsangi J, Sutherland LR, editores. *Inflammatory Bowel Disease*, España: Churchill Livingstone, 85–93 (2003)).

 La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa (CU) son las formas más comunes de EII.

25 La enfermedad de Crohn normalmente causa úlceras a lo largo de los intestinos grueso y delgado. Por lo general, la enfermedad de Crohn o bien deja el recto intacto o provoca inflamación o infección con drenaje alrededor del recto.

 Casi sin excepción, la CU afecta al recto y se extiende hacia las partes contiguas o la totalidad del colon. La actividad de la enfermedad es normalmente intermitente, con recidivas y períodos de quiescencia. La imagen sigmoidoscópica o colonoscópica es característica. En los casos leves de esta enfermedad, la mucosa del colon tiene un aspecto hiperémico y granular. Cuando la enfermedad es más grave, aparecen pequeñas úlceras esparcidas, y la mucosa es característicamente friable, pudiendo sangrar de forma espontánea. En términos histológicos, la infiltración inflamatoria en las células presente en la enfermedad activa normalmente incluye neutrófilos, que a menudo invaden las criptas y también conllevan lesiones epiteliales y distorsión de las criptas. Por lo general, hay una cantidad superior a la normal de linfocitos en la lámina propia y la plasmacitosis basal.

 En Estados Unidos, entre 500.000 y 700.000 pacientes padecen CU (Loftus, *Gastroenterology* 126:1504-1517(2004)). Las manifestaciones extracolónicas de la CU incluyen artritis, uveitis,

estomatitis aftosa, pioderma gangrenoso y eritema nodoso. La terapia inicial para los enfermos leves o moderados es normalmente un aminosalicilato. En ensayos controlados, la mejora de la enfermedad bajo diversos criterios se produjo hasta en un 30% de los sujetos de los grupos tratados con placebo; por tanto, no aplicar tratamiento específico alguno podría ser una opción para aquellos pacientes que desarrollen la enfermedad en un grado muy leve. La CU izquierda distal que afecta al recto y el colon sigmoide puede tratarse eficazmente con formulaciones de enemas de 5-aminosalicilato (5-ASA). En pacientes con CU activa que no responden al tratamiento estándar de 5-ASA y aquellos cuya enfermedad es más grave, los corticosteroides orales han sido la base principal de la terapia sintomática aguda. De todos modos, los corticosteroides no son efectivos para mantener a largo plazo la remisión en pacientes con CU dado que, con el paso del tiempo, su uso se asocia a un nivel significativo de toxicidad (Lennard-Jones *y col.*, *Lancet* 1:188-189 (1965)).

Las opciones terapéuticas de los pacientes que no respondan a los medicamentos basados en 5-ASA ni los corticosteroides para exacerbaciones de la enfermedad son limitadas. Muchos de estos pacientes se tratan con agentes inmunosupresores, por lo general 6-mercaptopurina (6-MP) o azatioprina, que pueden retardar de forma significativa el comienzo del efecto terapéutico en la enfermedad activa. En pacientes con enfermedad grave que no responden a los corticosteroides IV en altas dosis y están esperando someterse a una colectomía, se ha observado una eficacia significativa a corto plazo de la ciclosporina IV en un pequeño estudio controlado con placebo (Lichtiger *y col.*, *N Engl J Med* 330:1841-1845 (1994)). En última instancia, la colectomía es necesaria en un 25%-40% de los pacientes. Existe una clara necesidad no cubierta de un agente terapéutico seguro y eficaz que permita un control rápido de la enfermedad e induzca la remisión prolongada de la misma.

Aunque la patogénesis de la CU todavía no se comprende por completo, cada vez hay más pruebas de que la CU podría ser un trastorno autoinmune, donde las células B intervienen en la patofisiología de la enfermedad. Las células B, así como las T, están presentes en los agregados linfoides basales, una característica histopatológica considerada como un indicio de CU y observada en secciones histológicas de pacientes con CU activa (Yeung *y col.*, *Gut* 47:212-227(2000)). Al evaluar los parámetros clínicos e histológicos que pudiesen predecir una recidiva en pacientes con CU quiescente, la presencia de una cantidad superior a la normal de células plasmáticas en la porción basal de la mucosa resultó ser un factor independiente de predicción de la recidiva (Bitton *y col.*, *Gastroenterology* 120:1320 (2001)). Si bien se considera que son células T activadas las que provocan la inflamación de la mucosa en la CU, estos pacientes tienen un perfil de modelo de expresión citoquinica T-helper-2 (Th2) (Monteleone *y col.*, *Gut* 50 (Suplemento III) 64 (2002)). Dado que las citoquinas Th2 generan clásicamente respuestas inmunológicas mediadas por células B y la producción de anticuerpos, podría postularse que las células B desempeñan un papel central en la CU.

En la lámina propia de la mucosa colónica inflamada de pacientes con CU se han encontrado cantidades superiores a las normales de IgG, IgM, IgA y células plasmáticas, así como una producción superior a la normal de anticuerpos contra antígenos y autoantígenos lumenales intestinales (MacDermott *y col.*, *Gastroenterology* 81:844-852 (1981)). Además, se van acumulando datos sobre la presencia de anticuerpos en pacientes con CU, si bien todavía no se sabe con certeza que estos anticuerpos desempeñen un papel concreto en la patogénesis de la CU. Aproximadamente dos terceras partes de los pacientes con CU tienen un anticuerpo circulante conocido como anticuerpo citoplasmático antineutrófilo perinuclear (p-ANCA), que se dirige contra los leucocitos neutrófilos (Quinton *y col.*, *Gut* 42:788-791 (1998)). Recientemente, se ha mostrado que el p-ANCA presente en algunas formas de vasculitis, y que se dirige contra un componente neutrófilo distinto (mieloperoxidasa), es en sí la causa de la vasculitis y las lesiones tisulares en modelos animales experimentales de vasculitis (Xiao *y col.*, *J Clin Invest* 110:955-963 (2002)).

Otro marcador de la autoinmunidad es la respuesta de las células B de la mucosa del colon contra la isoforma 5 humana de la tropomiosina (hTM5), un autoantígeno putativo en la CU. La mucosa del colon de los pacientes con CU presentó una cantidad superior a la normal, y muy significativa a efectos estadísticos, de células B de la lámina propia que producían IgG contra hTM5 en comparación con pacientes con colitis de Crohn o sin EII, lo cual sugirió que los anticuerpos anti-hTM5 desempeñaban un papel importante y distinto en la CU (Onuma *y col.*, *Clin Exp Immunol* 121:466-471 (2000)). De forma similar, la cantidad de inmunocitos IgG anti-hTM5 fue significativamente superior en pacientes con CU en comparación con los controles realizados en sujetos sin IEE, observándose que 21 de 23 pacientes (un 91%) tenían inmunocitos que producían IgG, independientemente de la actividad clínica (Onuma *y col.*, *Clin Exp Immunol* 121:466-471 (2000)). Además, el anticuerpo anti-hTM5 se ha detectado en el suero de pacientes con CU y colangitis esclerosante primaria (Sakimaki *y col.*, *Gut* 47:236-241 (2000)). Se ha demostrado que los anticuerpos anti-colon en el suero de pacientes con CU pueden reaccionar con antígenos de superficie en células epiteliales colónicas o la mucina colónica en células caliciformes (Inoue *y col.*, *Gastroenterology* 121:1523 (2001)). Estos anticuerpos pueden contribuir a la destrucción de la mucosa del colon a través de mecanismos citotóxicos, dependientes de anticuerpos y mediados por células, contra las células epiteliales colónicas.

En un estudio, se observó que la colitis crónica espontánea que se produce en ratones con deficiencia del receptor de células T (TCR) α se agravaba en ausencia de células B maduras. La descendencia de ratones con deficiencia del TCR α y colitis crónica cruzados con ratones con bloqueo de la expresión de $\alpha\mu$ desarrolla una forma de colitis más grave que los ratones con deficiencia del TCR α . En este estudio, la gravedad aumentada de la colitis no se debió a la flora patogénica sino la

ausencia completa de células B. En ratones con bloqueo de la expresión de $\alpha\mu$, la colitis crónica se atenuó marcadamente en aquellos ejemplares de entre 3 y 4 semanas de edad que recibieron antes de que comenzase la enfermedad una transferencia adoptiva de células B periféricas de ratones con deficiencia del TCR α . Este hecho sugiere que las células B desempeñan un papel supresor en el desarrollo de la colitis en estos modelos murinos (Mizoguchi *y col.*, *Int Immunol* 12:597-605 (2000)).

Anticuerpos del CD20 y su uso terapéutico

Los linfocitos son una de las muchas clases de glóbulos blancos que se producen en la médula ósea durante la hematopoyesis. Hay dos poblaciones principales de linfocitos: los linfocitos B (células B) y T (células T). Los linfocitos que nos interesan de manera particular en este estudio son las células B.

Las células B maduran en la médula ósea y la abandonan expresando un anticuerpo de unión a antígeno en su superficie celular. Cuando una célula B virgen se encuentra por primera vez con el antígeno para el cual su anticuerpo unido a la membrana es específico, la célula comienza a dividirse rápidamente y su progenie se diferencia en células B de memoria y células efectoras, llamadas "células plasmáticas". Las células B de memoria tienen mayor duración y siguen expresando el anticuerpo unido a la membrana con la misma especificidad que la célula parental original. Las células plasmáticas no producen un anticuerpo unido a la membrana sino una forma secretada del mismo. Los anticuerpos secretados son las principales moléculas efectoras de la inmunidad humoral.

El antígeno CD20 (también llamado antígeno humano de diferenciación restringido a linfocitos B, Bp35) es una proteína transmembrana hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD que se encuentra en linfocitos pre-B y B maduros. Valentine *y col.*, *J. Biol. Chem.* 264 (19):11282-11287 (1989) y Einfeld *y col.*, *EMBO J.* 7 (3):711-717 (1988). El antígeno se expresa también en más del 90% de los linfomas no Hodgkin de células B (LNH) (Anderson *y col. Blood* 63 (6):1424-1433 (1984)), pero no se encuentra en las células madre hematopoyéticas, las células pro-B, las células plasmáticas normales u otros tejidos normales (Tedder *y col. J. Immunol.* 135 (2):973-979 (1985)). El CD20 regula una(s) etapa(s) temprana(s) del proceso de activación de la iniciación y la diferenciación del ciclo celular (Tedder *y col., supra*), y posiblemente funciona como un canal de iones de calcio. Tedder *y col., J. Cell. Biochem.* 14D:195 (1990).

Dada la expresión del CD20 en los linfomas de células B, este antígeno puede ser un candidato para actuar sobre estos linfomas. En esencia, esa acción puede generalizarse de la siguiente manera: se administran a un paciente los anticuerpos específicos del antígeno CD20 de superficie de las células B. Estos anticuerpos anti-CD20 se unen específicamente al antígeno CD20 de las células B tanto (ostensiblemente) normales como malignas; el anticuerpo unido al antígeno CD20 de superficie puede causar la destrucción o reducción de las células B neoplásicas. Además, los agentes químicos o las

etiquetas radioactivas con potencial para destruir el tumor pueden conjugarse con el anticuerpo anti-CD20 de modo que el agente actúe específicamente sobre las células B neoplásicas.

Independientemente del planteamiento, un objetivo fundamental es destruir el tumor; el planteamiento específico puede determinarse mediante el anticuerpo anti-CD20 que se utilice en particular, y por tanto, los planteamientos disponibles para actuar sobre el antígeno CD20 pueden variar considerablemente.

El anticuerpo rituximab (RITUXAN®) es un anticuerpo monoclonal, murino/humano, quimérico y creado mediante ingeniería genética, que se dirige contra el antígeno CD20. El rituximab es el anticuerpo llamado "C2B8" en la patente de EE.UU. n° 5.736.137, concedida el 7 de abril de 1998 (Anderson *y col.*). El rituximab está indicado para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin de células B, con presencia de CD20, de grado bajo o folicular, con recidiva o refractaria. *In vitro*, se ha demostrado que el rituximab media en la citotoxicidad dependiente de complementos (CDC) y la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC) e induce la apoptosis (Reff *y col.*, *Blood* 83 (2):435-445 (1994); Maloney *y col.*, *Blood* 88:637a (1996); Manches *y col.*, *Blood* 101:949-954 (2003)). La sinergia entre el rituximab y las quimioterapias y toxinas también se ha observado a escala experimental. En particular, el rituximab sensibiliza las líneas celulares del linfoma de células B humanas resistente a medicamentos a los efectos citotóxicos de la doxorrubicina, el CDDP, el VP-16, la toxina de la difteria y la ricina (Demidem *y col.*, *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12 (3):177-186 (1997)). Los estudios preclínicos *en vivo* han mostrado que el rituximab reduce la presencia de células B en la sangre periférica, los nódulos linfáticos y la médula ósea de los monos cinomolgus. Reff *y col.*, *Blood* 83:435-445 (1994).

El rituximab también se ha estudiado en varios trastornos autoinmunes benignos, en los cuales las células B y los autoanticuerpos parecen desempeñar un papel en la fisiopatología de la enfermedad. Edwards *y col.*, *Biochem Soc. Trans.* 30:824-828 (2002). Se ha informado que el rituximab alivia potencialmente los signos y síntomas de, por ejemplo, la artritis reumatoide (AR) (Leandro *y col.*, *Ann. Rheum. Dis.* 61:883-888 (2002); Edwards *y col.*, *Arthritis Rheum.*, 46 (Suplemento 9) S46 (2002); Stahl *y col.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 62 (Suplemento 1): OP004 (2003); Emery *y col.*, *Arthritis Rheum.* 48(9): S439 (2003)), el lupus (Eisenberg, *Arthritis. Res. Ther.* 5:157-159 (2003); Leandro *y col.* *Arthritis Rheum.* 46: 2673-2677 (2002); Gorman *y col.*, *Lupus*, 13: 312-316 (2004)), la púrpura trombocitopénica inmune (D'Arena *y col.*, *Leuk. Lymphoma* 44:561-562 (2003); Stasi *y col.*, *Blood*, 98: 952-957 (2001); Saleh *y col.*, *Semin. Oncol.*, 27 (Suplemento 12):99-103 (2000); Zaia *y col.*, *Haematologica*, 87: 189-195 (2002); Ratanatharathorn *y col.*, *Ann. Int. Med.*, 133: 275-279 (2000)), la aplasia pura de hematíes (Auner *y col.*, *Br. J. Haematol.*, 116: 725-728 (2002)), la anemia autoinmune (Zaja *y col.*, *Haematologica* 87:189-195 (2002) (la fe de erratas aparece en *Haematologica* 87:336

(2002)), la enfermedad por crioaglutininas (Layios y col., *Leukemia*, 15: 187-8 (2001); Berentsen y col., *Blood*, 103: 2925-2928 (2004); Berentsen y col., *Br. J. Haematol.*, 115: 79-83 (2001); Bauduer, *Br. J. Haematol.*, 112: 1083-1090 (2001); Damiani y col., *Br. J. Haematol.*, 114: 229-234 (2001)), el síndrome de clase B de resistencia grave a la insulina (Coll y col., *N. Engl. J. Med.*, 350: 310-311 (2004)), la crioglobulinemia mixta (DeVita y col., *Arthritis Rheum.* 46 Suplemento 9:S206/S469 (2002)), la miastenia gravis (Zaja y col., *Neurology*, 55: 1062-63 (2000); Wylam y col., *J. Pediatr.*, 143: 674-677 (2003)), la granulomatosis de Wegener (Specks y col., *Arthritis & Rheumatism* 44: 2836-2840 (2001)), el pénfigo vulgar refractario (Dupuy y col., *Arch Dermatol.*, 140:91-96 (2004)), la dermatomiositis (Levine, *Arthritis Rheum.*, 46 (Suplemento 9):S1299 (2002)), el síndrome de Sjogren (Somer y col., *Arthritis & Rheumatism*, 49: 394-398 (2003)), la crioglobulinemia mixta activa de clase II (Zaja y col., *Blood*, 101: 3827-3834 (2003)), el pénfigo vulgar (Dupay y col., *Arch. Dermatol.*, 140: 91-95 (2004)), la neuropatía autoinmune (Pestronk y col., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74:485-489 (2003)), el síndrome opsoclono-mioclono paraneoplásico (Pranzatelli y col. *Neurology* 60 (Suplemento 1) PO5.128:A395 (2003)) y la esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR). Cross y col. (resumen) "Resultados preliminares de un ensayo clínico de fase II de la acción del rituximab en la EM" Octava Reunión Anual de los Comités Americanos para la Investigación y el Tratamiento de la Esclerosis Múltiple, 20-21 (2003).

Se ha llevado a cabo un estudio de fase II (WA16291) en pacientes con artritis reumatoide (AR) que, tras un seguimiento de 48 semanas, ha proporcionado datos sobre la seguridad y eficacia del rituximab. Emery y col. *Arthritis Rheum* 48 (9):S439 (2003); Szczepanski y col. *Arthritis Rheum* 48 (9):S121 (2003); Edwards y col., *N Engl. J. Med.* 350:2572-82 (2004). Se realizó una distribución uniforme y aleatoria de un total de 161 pacientes en cuatro versiones de tratamiento: metotrexato, rituximab solo, rituximab más metotrexato y rituximab más ciclofosfamida (CTX). El régimen de tratamiento del rituximab consistió en un gramo administrado por vía intravenosa los días 1 y 15. La mayoría de pacientes con AR toleró bien las infusiones de rituximab, si bien un 36% de estos pacientes experimentó al menos una reacción adversa durante su primera infusión (en comparación con un 30% de los pacientes que recibieron placebo). En general, la mayoría de reacciones adversas se consideró entre leve y moderada y se produjo de forma equilibrada a través de todos los grupos de tratamiento. Hubo un total de 19 reacciones adversas graves a través de los cuatro regímenes a lo largo de las 48 semanas, con una frecuencia ligeramente mayor en el grupo de rituximab más ciclofosfamida. La incidencia de infecciones estuvo bien equilibrada a través de todos los grupos. La tasa media de infecciones graves en esta población de pacientes con AR fue de 4,66 por 100 pacientes-años, una cifra inferior a la tasa de infecciones que requirieron un ingreso hospitalario en pacientes con RA (9,57 por 100 pacientes-años) que se publicó en un estudio epidemiológico realizado en toda una comunidad.

Doran *y col.*, *Arthritis Rheum.* 46:2287–2293 (2002).

El perfil de seguridad del rituximab en una pequeña cantidad de pacientes con trastornos neurológicos, incluyendo la neuropatía inmune (Pestronk *y col.*, *supra*), el síndrome opsoclonomioclon (Pranzatelli *y col.*, *supra*) y la EMRR (Cross *y col.*, *supra*), fue similar al que se observó en oncología o AR. En un ensayo patrocinado por investigadores (EPI), todavía en curso, sobre el rituximab en combinación con interferón- γ (IFN- γ) o acetato de glatiramero en pacientes con EMRR (Cross *y col.*, *supra*), 1 de cada 10 pacientes tratados ingresó en el hospital para pernoctar en observación tras experimentar fiebres y rigores moderados después de la primera infusión de rituximab, mientras que los 9 pacientes restantes concluyeron el régimen de 4 infusiones sin manifestar reacciones adversas.

Las publicaciones de patentes relativas a los anticuerpos del CD20 y las moléculas de unión al CD20 incluyen las patentes de EE.UU. n^{os} 5.776.456, 5.736.137, 5.843.439, 6.399.061 y 6.682.734, así como los documentos US 2002/0197255, US 2003/0021781, US 2003/0082172, US 2003/0095963, US 2003/0147885 (Anderson *y col.*); la patente de EE.UU. n^o 6.455.043 y los documentos US 2003/0026804 y WO 2000/09160 (Grillo-López, A.); el documento WO 2000/27428 (Grillo-López y White); los documentos WO 2000/27433 y US 2004/0213784 (Grillo-López y Leonard); el documento WO 2000/44788 (Braslawsky *y col.*); el documento WO 2001/10462 (Rastetter, W.); el documento WO01/10461 (Rastetter y White); el documento WO 2001/10460 (White y Grillo-López); los documentos US 2001/0018041, US 2003/0180292 y WO 2001/34194 (Hanna y Hariharan); los documentos US 2002/0006404 y WO 2002/04021 (Hanna y Hariharan); los documentos US 2002/0012665 y WO 2001/74388 (Hanna, N.); el documento US 2002/0058029 (Hanna, N.); el documento US 2003/0103971 (Hariharan y Hanna); los documentos US 2002/0009444 y WO 2001/80884 (Grillo-López, A.); el documento WO 2001/97858 (White, C.); los documentos US 2002/0128488 y WO 2002/34790 (Reff, M.); el documento WO 2002/060955 (Braslawsky *y col.*); el documento WO 2002/096948 (Braslawsky *y col.*); el documento WO 2002/079255 (Reff y Davies); la patente de EE.UU. n^o 6.171.586 y el documento WO 1998/56418 (Lam *y col.*); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); el documento WO 1999/22764 (Raju, S.); el documento WO 1999/51642 y las patentes de EE.UU. n^{os} 6.194.551, 6.242.195, 6.528.624 y 6.538.124 (Idusogie *y col.*); el documento WO 2000/42072 (Presta, L.); el documento WO 2000/67796 (Curd *y col.*); el documento WO 2001/03734 (Grillo-López *y col.*); los documentos US 2002/0004587 y WO 2001/77342 (Miller y Presta); el documento US 2002/0197256 (Grewal, I.); el documento US 2003/0157108 (Presta, L.); el documento WO 04/056312 (Lowman *y col.*); los documentos US 2004/0202658 y WO 2004/091657 (Benyunes, K.); el documento WO 2005/000351 (Chan, A.); el documento US 2005/0032130A1 (Beresini *y col.*); el documento US 2005/0053602A1 (Brunetta, P.); las patentes de EE.UU. n^{os}

ay

6.565.827, 6.090.365, 6.287.537, 6.015.542, 5.843.398, y 5.595.721, (Kaminski *y col.*); las patentes de EE.UU. n°s 5.500.362, 5.677.180, 5.721.108, 6.120.767 y 6.652.852 (Robinson *y col.*); la patente de EE.UU. n° 6.410.391 (Raubitschek *y col.*); la patente de EE.UU. n° 6.224.866 y el documento WO00/20864 (Barbera-Guillem, E.); el documento WO 2001/13945 (Barbera-Guillem, E.); el documento WO 2000/67795 (Goldenberg); los documentos US 2003/0133930 y WO 2000/74718 (Goldenberg y Hansen); los documentos US 2003/0219433 y WO 2003/68821 (Hansen *y col.*); el documento WO2004/058298 (Goldenberg y Hansen); el documento WO 2000/76542 (Golay *y col.*); el documento WO 2001/72333 (Wolin y Rosenblatt); la patente de EE.UU. n° 6.368.596 (Ghetie *y col.*); la patente de EE.UU. n° 6.306.393 y el documento US 2002/0041847 (Goldenberg, D.); el documento US 2003/0026801 (Weiner y Hartmann); el documento WO 2002/102312 (Engleman, E.); el documento US 2003/0068664 (Albitar *y col.*); el documento WO 2003/002607 (Leung, S.); los documentos WO 2003/049694, US2002/0009427 y US 2003/0185796 (Wolin *y col.*); el documento WO 2003/061694 (Sing y Siegall); el documento US 2003/0219818 (Bohen *y col.*); los documentos US 2003/0219433 y WO 2003/068821 (Hansen *y col.*); el documento US 2003/0219818 (Bohen *y col.*); el documento US2002/0136719 (Shenoy *y col.*); el documento WO 2004/032828 (Wahl *y col.*) y el documento WO 2002/56910 (Hayden-Ledbetter); US 2003/0219433 A1 (Hansen *y col.*); WO 2004/035607 (Teeling *y col.*); US 2004/0093621 (Shitara *y col.*); WO 2004/103404 (Watkins *y col.*); WO 2005/000901 (Tedder *y col.*); US 2005/0025764 (Watkins *y col.*); WO2005/016969 y US 2005/0069545 A1 (Carr *y col.*); y WO 2005/014618 (Chang *y col.*). Véase también la patente de EE.UU. n° 5.849.898 y el documento EP 330.191 (Seed *y col.*); el documento EP332,865A2 (Meyer y Weiss); la patente de EE.UU. n° 4.861.579 (Meyer *y col.*); el documento US2001/0056066 (Bugelski *y col.*) y el documento WO 1995/03770 (Bhat *y col.*);

Las publicaciones relativas a la terapia con rituximab incluyen: Perotta y Abuel, "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to rituximab" Resumen n° 3.360 *Blood* 10 (1) (sección 1-2): página 88B (1998) ("Respuesta de 10 años de duración de la PTI crónica recurrente al rituximab"); Perotta *y col.*, "Rituxan in the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)", *Blood*, 94: 49 (resumen) (1999); Matthews, R., "Medical Heretics" *New Scientist* (7 de abril de 2001) ("Herejes medicos"); Leandro *y col.*, "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response" *Arthritis and Rheumatism* 44(9): S370 (2001) ("Reducción de linfocitos en artritis reumatoide: datos iniciales sobre seguridad, eficacia y respuesta a la dosis"); Leandro *y col.*, "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", *Arthritis and Rheumatism*, 46:2673-2677 (2002) ("Un estudio abierto de la reducción de linfocitos B en el lupus eritematoso sistémico"), en que, durante un período de dos semanas, cada paciente recibió dos infusiones de 500 mg de rituximab, dos infusiones de 750 mg de ciclofosfamida y una elevada dosis de

corticosteroides orales, y dos de los pacientes tratados sufrieron una recidiva a los 7 y 8 meses, respectivamente, recibiendo de nuevo el tratamiento, aunque con diferentes protocolos; Weide y col., "Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy" *Lupus*, 12: 779-782 (2003) ("Tratamiento prolongado con éxito del lupus eritematoso sistémico mediante terapia de mantenimiento con rituximab"), en que un paciente recibió tratamiento con rituximab (375 mg/m² x 4, repetido a intervalos semanales), posteriormente se le administró rituximab cada 5-6 meses y, por último, se le aplicó una terapia de mantenimiento de 375 mg/m² de rituximab cada tres meses, y un segundo paciente con LES refractario se trató con éxito con rituximab y está recibiendo terapia de mantenimiento cada tres meses, con buena respuesta por parte de ambos

pacientes al rituximab; Edwards y Cambridge, "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" *Rheumatology* 40:205-211 (2001) ("Mejoría sostenida de la artritis reumatoide siguiendo un protocolo diseñado para reducir los linfocitos B"); Cambridge y col., "B lymphocyte depletion in patients with rheumatoid arthritis: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis" *Arthritis Rheum.*, 46 (Suplemento 9): S1350 (2002); Edwards y col., "Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis" *Arthritis and Rheumatism* 46 (9): S197 (2002); Pavelka y col., *Ann. Rheum. Dis.*, 63: (S1):289-90 (2004); Emery y col., *Arthritis Rheum.* 50 (S9):S659 (2004); Levine y Pestronk, "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab" *Neurology* 52: 1701-1704 (1999)

("Polineuropatías relacionadas con anticuerpos IgM: quimioterapia con rituximab para reducir las células B"); DeVita y col., "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheum* 46:2029-2033 (2002) ("Eficacia del bloqueo selectivo de las células B en el tratamiento de la artritis reumatoide"); Hidashida y col., "Treatment of DMARD-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" ("Tratamiento de la artritis reumatoide refractaria a DMARD con rituximab"), presentado en el *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology* (Congreso Científico Anual del Instituto Americano de Reumatología), 24-29 de octubre, Nueva Orleans, LA, (2002); Tuscano, J. "Successful treatment of infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" ("Tratamiento satisfactorio con rituximab de la artritis reumatoide refractaria al infliximab"), presentado en el *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology* (Congreso Científico Anual del Instituto Americano de Reumatología); 24-29 de octubre, Nueva Orleans, LA, (2002); "Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic", Martin y Chan, *Immunity* 20:517-527 (2004) ("Funciones patogénicas de las células B en la autoinmunidad humana; perspectivas desde la clínica"); Silverman y Weisman, "Rituximab Therapy and Autoimmune Disorders, Prospects for Anti-B Cell Therapy", *Arthritis and Rheumatism*, 48: 1484-

1492 (2003) ("Terapia con rituximab y trastornos autoinmunes; perspectivas para el tratamiento anti-células B"); Kazkaz e Isenberg, "Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases", *Current opinion in pharmacology*, 4: 398-402 (2004) ("Terapia anti-células B (rituximab) para el tratamiento de enfermedades autoinmunes"); Virgolini y Vanda, "Rituximab in autoimmune diseases", *Biomedicine & pharmacotherapy*, 58: 299-309 (2004); Klemmer y col., "Treatment of antibody mediated autoimmune disorders with an antiCD20 monoclonal antibody Rituximab" *Arthritis And Rheumatism* 48 (9):S624-S624 (2003); Kneitz y col., "Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases" *Immunobiology* 206: 519-527 (2002) ("Reducción eficaz de las células B con rituximab en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes"); Arzoo y col., "Treatment of refractory antibody mediated autoimmune disorders with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab)" *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61 (10):922-4 (2002) ("Tratamiento de los trastornos autoinmunes refractarios mediados con un anticuerpo monoclonal antiCD20 (rituximab)"); Looney, R., "Treating human autoimmune disease by depleting B cells" *Ann Rheum Dis.* 61: 863-866 (2002); Lake y Dionne, "Future Strategies in Immunotherapy" ("Estrategias futuras en inmunoterapia") en *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (2003 por John Wiley & Sons, Inc.), fecha de publicación del artículo en Internet: 15 de enero de 2003 (Capítulo 2 "Antibody-Directed Immunotherapy" ("Inmunoterapia dirigida a los anticuerpos")); Liang y Tedder, *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, sección: "CD20 as an Immunotherapy Target" ("El CD20 como una diana de la inmunoterapia"), fecha de publicación del artículo en Internet: 15 de enero de 2002, titulado "CD20"; Apéndice 4A titulado "Monoclonal Antibodies to Human Cell Surface Antigens" ("Anticuerpos monoclonales para antígenos humanos de la superficie celular") por Stockinger y col., editores: Coligan y col., en *Current Protocols in Immunology* (2003 John Wiley & Sons, Inc), fecha de publicación en Internet: mayo de 2003; fecha de publicación impresa: febrero de 2003; Peniche y Morrison, "CD Antibodies/molecules: Definition; Antibody Engineering" ("Anticuerpos/moléculas CD: definición; Ingeniería de los anticuerpos"), en *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, sección: "Chimeric, Humanized and Human Antibodies" ("Anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos"), publicado en Internet el 15 de enero de 2002; Specks y col. "Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy" *Arthritis & Rheumatism* 44:2836-2840 (2001) ("Respuesta de la granulomatosis de Wegener a la terapia con anticuerpos quiméricos monoclonales antiCD20"), ingreso del resumen en Internet e invitación a cargo de Koegh y col., "Rituximab for Remission Induction in Severe ANCA-Associated Vasculitis: "Rituximab para inducción de la remisión en vasculitis grave asociada a ANCA: Report of a Prospective Open-Label Pilot Trial in 10 Patients" ("Rituximab para inducir la remisión en vasculitis grave asociada a ANCA: informe de un ensayo piloto prospectivo abierto en 10 pacientes"), American College of Rheumatology (Instituto

Americano de Reumatología), número de la sesión: 28-100, título de la sesión: Vasculitis, clase de sesión: Sesión concurrente ACR, categoría primaria: 28 Vasculitis, sesión 18/10/2004

(<http://www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp>); Eriksson, "Short-term outcome and safety in 5 patients with ANCA-positive vasculitis treated with rituximab", *Kidney and Blood Pressure*

5 *Research*, 26: 294 (2003) ("Resultado y seguridad a corto plazo en 5 pacientes con vasculitis positiva en ANCA tratados con rituximab"); Jayne y col., "B-cell depletion with rituximab for refractory vasculitis" *Kidney and Blood Pressure Research*, 26: 294 (2003) ("Reducción de las células B con rituximab para la vasculitis refractaria"); Jayne, cartel 88 (11° Seminario Internacional sobre Vasculitis y ANCA), 2003 American Society of Nephrology (Sociedad Americana de Nefrología); Stone y

10 Specks, "Rituximab Therapy for the Induction of Remission and Tolerance in ANCA-associated Vasculitis" ("Terapia con rituximab para inducir la remisión y la tolerancia en la vasculitis asociada al ANCA"), en el Resumen de Investigaciones de Ensayos Clínicos de la Red de Tolerancia Inmune de 2002-2003, <http://www.immunetolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html> y Leandro y col.,

15 "B cell repopulation occurs mainly from naïve B cells in patient with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus" *Arthritis Rheum.*, 48 (Suplemento 9): S1160 (2003) ("La repoblación de las células B se produce principalmente a partir de células B vírgenes en pacientes con artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico").

Resumen de la invención

20 En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para tratar los casos moderados-graves de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto humano que consiste en administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo del CD20 y cuyo resultado es una respuesta clínica o la remisión de la enfermedad en el sujeto.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto humano con EII activa que consiste en administrar al paciente sólo una o dos dosis de un anticuerpo del CD20, obteniendo ya como resultado tras dicha(s) dosis la remisión de la enfermedad o una respuesta clínica.

30 La invención ofrece además un procedimiento para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto humano con EII activa que consiste en administrar al paciente cantidades eficaces de un anticuerpo del CD20 y, posteriormente, un segundo medicamento seleccionado del grupo integrado por un aminosalicilato, un corticosteroide oral, la 6-mercaptopurina (6-MP) y la azatioprina.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para reducir el resultado del índice de actividad de la enfermedad (IAE) en un sujeto humano con colitis ulcerativa (CU) activa

En un segundo aspecto adicional, la invención se relaciona con un artículo fabricado que consta de:

- i. un envase que contiene un anticuerpo del CD20, y
- ii. un prospecto con instrucciones para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto humano que indican la administración de una cantidad eficaz del anticuerpo del CD20.

10

15

20

25

30

La figura 3 muestra una alineación del 2H7.v16 maduro y las cadenas pesadas del 2H7.v511

(IDENTIFICADORES DE SECUENCIA N^{OS} 14 y 16, respectivamente), con numeración de residuos del dominio variable según Kabat y numeración de residuos del dominio constante según Eu.

En la figura 4 se representa un esquema del estudio para el protocolo del Ejemplo 1.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

I. Definiciones

La “enfermedad inflamatoria intestinal” o “EII” se refiere al grupo de trastornos que provoca la inflamación de los intestinos, manifestado por lo general a través de síntomas como calambres y dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso y hemorragia intestinal. Las formas principales de la EII son la colitis ulcerativa (CU) y la enfermedad de Crohn.

La “colitis ulcerativa” o “CU” es una enfermedad inflamatoria, crónica y episódica, del intestino grueso y el recto caracterizada por diarreas sanguinolentas. La colitis ulcerativa se caracteriza por la inflamación crónica de la mucosa colónica y puede categorizarse según su ubicación: la “proctitis” sólo se manifiesta en el recto, la “proctosigmoiditis” afecta al recto y el colon sigmoide, la “colitis izquierda” abarca todo el lado izquierdo del intestino grueso y la “pancolitis” inflama el colon entero.

La “enfermedad de Crohn”, llamada también “enteritis regional”, es una enfermedad autoinmune crónica que puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal pero por lo general se origina en el íleon (la zona de encuentro del intestino delgado y el grueso). La enfermedad de Crohn, en contraste con la colitis ulcerativa, se caracteriza por una inflamación crónica que se extiende a través de todas las capas de las paredes intestinales y afecta al mesenterio así como los nódulos linfáticos regionales. Tanto si el intestino delgado o el colon están afectados o no, el proceso básico de la patología es el mismo.

La colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn pueden distinguirse entre sí por factores clínicos, endoscópicos, patológicos y serológicos en más del 90% de los casos; el resto se considera una EII indeterminada (Harrison’s Principles of Internal medicine (Principios de Harrison de medicina interna), 12^a edición, página 1.271 (1991)).

La EII “moderada-grave” es una modalidad de la enfermedad en que los signos o síntomas que presenta el sujeto son superiores a un grado leve. Un gastroenterólogo capacitado puede identificar a estos sujetos. El paciente con EII moderada-grave puede haberse tratado con corticosteroides orales para la CU durante dos años antes de la exploración, y/o la intensidad del tratamiento puede haber sido igual o superior a una dosis equivalente de prednisona de 20 mg/día durante al menos dos semanas. Estos sujetos pueden ser refractarios a los esteroides y/o dependientes de éstos. Un paciente con CU moderada-grave puede seleccionarse sobre la base de su resultado del IAE; por ejemplo, un resultado del IAE ≥ 6 , un resultado de hemorragia rectal ≥ 2 y/o un resultado de la sigmoidoscopia flexible ≥ 2 indican que el sujeto tiene CU moderada-grave. De forma alternativa, o adicionalmente, pueden aplicarse los criterios para

evaluar los grados leve, moderado y grave de la enfermedad tal como se describen en Truelove y Witts *Br Med J.* 2:1041-1048 (1955) (véase la Tabla 1 a continuación) para identificar a estos sujetos. Por lo general, los pacientes con colitis fulminante o tóxica evacuan más de 10 veces al día, tienen hemorragias constantes, distensión y sensibilidad abdominal y presentan pruebas radiológicas de edema y posiblemente dilatación intestinal.

Tabla 1:		
Criterios de Truelove y Witts para evaluar la actividad de la enfermedad en la colitis ulcerativa		
Evacuaciones diarias (cantidad)	< o = a 5	> 5
Hematoquecia	Pequeñas cantidades	Grandes cantidades
Temperatura	< 37,5 °C	> o = a 37,5 °C
Pulso	< 90/minuto	> o = 90/minuto
Tasa de sedimentación de eritrocitos	< 30 mm/hora	> o = a 30 mm/hora
Hemoglobina	> 10 g/dl	< o = a 10 g/dl
Aquellos sujetos que no cumplan estos 6 criterios de determinación de una actividad grave tienen una enfermedad moderadamente activa.		

En la presente memoria descriptiva, un “sujeto” es un sujeto humano.

Un sujeto con EII "activa" experimenta al menos un síntoma de la EII en el momento de la exploración o el tratamiento inicial.

La EII “refractaria a los esteroides” es una clase de EII que progresa, o empeora, aunque se administren esteroides al sujeto con EII.

Un sujeto con EII “dependiente de esteroides” depende del tratamiento con esteroides, y no puede disminuir o abandonar su administración debido a los síntomas persistentes.

Un “síntoma” de la EII es un fenómeno mórbido o una manifestación alejada de los parámetros normales en cuanto a estructura, función o sensación, que el sujeto experimenta y constituye un indicio de EII.

La “mucosa” es el tejido húmedo que recubre órganos y cavidades corporales particulares por todo el cuerpo, incluyendo el tracto gastrointestinal. Las glándulas que hay a lo largo de la mucosa segregan mucosidad (un fluido espeso).

El “colon” es la porción del intestino grueso que se extiende desde el ciego hasta el recto.

La mucosa “colónica” es la mucosa que recubre el colon.

Los “parches de Peyer” son folículos linfáticos agregados que se encuentran por todo el cuerpo, especialmente en los recubrimientos mucosos de los tractos digestivo y respiratorio.

Por “remisión de la enfermedad” se entiende sustancialmente la inexistencia de síntomas de la enfermedad. La remisión puede lograrse dentro de un marco temporal especificado, como un período de 8 semanas, desde el inicio del tratamiento con, o la dosis inicial de, el antagonista o anticuerpo. La remisión también puede mantenerse durante un plazo de tiempo, como ≥ 24 ó ≥ 48 semanas. La remisión de la enfermedad también puede definirse como una sigmoidoscopia que dé 0 ó 1 como resultado y/o una hemorragia rectal que den 0 como resultado.

Una “sigmoidoscopia” es una inspección, a través de un endoscopio, del interior del colon sigmoide.

Un “resultado de una sigmoidoscopia” se refiere al resultado asignado por un médico sobre la base de una sigmoidoscopia. El sistema preferente del resultado de una sigmoidoscopia es el siguiente:

0 = estado normal o enfermedad inactiva

1 = enfermedad leve (eritema, modelo vascular reducido, friabilidad leve)

2 = enfermedad moderada (eritema marcado, modelo vascular ausente, friabilidad, erosiones)

3 = enfermedad grave (hemorragia espontánea, ulceración)

Una “hemorragia rectal” se refiere a cualquier hemorragia que haya o se origine en el recto.

Un “resultado de una hemorragia rectal” es el resultado del grado asignado a la extensión, si la hay, de una hemorragia rectal. El resultado diario de la hemorragia representa la hemorragia más grave del día. El sistema preferente del resultado de una hemorragia rectal es:

0 = no se percibe sangre

1 = pequeñas cantidades de sangre en las deposiciones en menos de la mitad de ocasiones

2 = presencia obvia de sangre en las deposiciones en la mayoría de ocasiones

3 = excreción sólo de sangre

“Respuesta clínica” significa una mejoría de los síntomas de la enfermedad. La respuesta clínica puede lograrse dentro de un marco temporal determinado, por ejemplo, un período de 8 semanas, desde el inicio del tratamiento con, o la dosis inicial de, el antagonista o anticuerpo. La respuesta clínica también puede mantenerse durante un plazo de tiempo, como ≥ 24 ó ≥ 48 semanas. La respuesta clínica puede evaluarse en términos de la reducción del resultado del índice de actividad de la enfermedad (IAE); por ejemplo, el resultado del IAE puede reducirse en 3 o más puntos.

Un sistema del resultado del “índice de actividad de la enfermedad (IAE)” es un procedimiento para evaluar cuantitativamente la actividad de la CU. El sistema preferente del resultado del IAE se muestra a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2

Sistema del resultado del IAE para evaluar la actividad de la CU

Frecuencia de las deposiciones (cada sujeto actúa como su propio control a la hora de establecer el grado de anormalidad de la frecuencia de las deposiciones)

0 = cantidad normal de deposiciones para este sujeto

5 1 = 1 ó 2 deposiciones más de lo normal

2 = 3 ó 4 deposiciones más de lo normal

3 = 5 o más deposiciones más de lo normal

Hemorragia rectal (el resultado diario de la hemorragia representa la hemorragia más grave del día)

10 0 = no se percibe sangre

1 = pequeñas cantidades de sangre en las deposiciones en menos de la mitad de ocasiones

2 = presencia obvia de sangre en las deposiciones en la mayoría de ocasiones

3 = excreción sólo de sangre

15 **Datos sobre la base de una protosigmoidoscopia flexible**

0 = estado normal o enfermedad inactiva

1 = enfermedad leve (eritema, modelo vascular reducido)

2 = enfermedad moderada (eritema marcado, modelo vascular ausente, friabilidad, erosiones)

3 = enfermedad grave (hemorragia espontánea, ulceración)

20

Evaluación global del médico (reconoce los otros 3 criterios, el registro diario de las molestias abdominales y la sensación general de bienestar del sujeto y otras observaciones, como los datos físicos y el estado de rendimiento del sujeto)

0 = normal

25 1 = enfermedad leve

2 = enfermedad moderada

3 = enfermedad grave

Un “autoanticuerpo” es un anticuerpo que el sujeto genera y se dirige contra un antígeno propio del sujeto.

30

Una “tropomiosina” es una proteína fibrosa que se puede extraer del músculo. Existen 8 isoformas humanas conocidas de la tropomiosina. En las células epiteliales del colon, la isoforma 5 humana de la tropomiosina (hTM5) es la isoforma predominante, con menos cantidades de la isoforma 4 (hTM4).

Por “anticuerpo anti-hTM5” se entiende un autoanticuerpo que el sujeto ha generado y se dirige contra la hTM5 de dicho sujeto.

El “anticuerpo citoplasmático antineutrófilo perinuclear (p-ANCA)” se refiere al autoanticuerpo que el sujeto genera y se dirige contra componentes de los leucocitos neutrófilos de dicho sujeto. “Perinuclear” se refiere al modelo de coloración de estos autoanticuerpos.

Un nivel de autoanticuerpos “atípico” significa un nivel de dichos autoanticuerpos que supera el normal. Ese nivel de autoanticuerpos normal o típico podría ser el nivel que se detecta en la mucosa o el tejido colónico de un sujeto normal, o que no padezca EII.

Una “célula B” es un linfocito que madura dentro de la médula ósea, e incluye una célula B virgen, una célula B de memoria o una célula B efectora (células plasmáticas). En la presente memoria descriptiva, la célula B puede ser una célula B normal o benigna.

En la presente memoria descriptiva, un “marcador de la superficie de células B” o “antígeno de la superficie de células B” es un antígeno que se expresa en la superficie de una célula B y se puede actuar sobre él mediante un antagonista o anticuerpo que se le une. Ejemplos de marcadores de la superficie de células B serían marcadores de la superficie de leucocitos como el CD10, el CD19, el CD20, el CD21, el CD22, el CD23, el CD24, el CD37, el CD40, el CD53, el CD72, el CD73, el CD74, el CDw75, el CDw76, el CD77, el CDw78, el CD79a, el CD79b, el CD80, el CD81, el CD82, el CD83, el CDw84, el CD85 y el CD86 (para conocer sus descripciones, consulte The Leukocyte Antigen Facts Book (Libro de datos sobre los antígenos de leucocitos), 2ª edición, 1997, editores Barclay y col., Academic Press, Harcourt Brace & Co., Nueva York). Otros marcadores de la superficie de células B incluyen el RP105, el FcRH2, el CR2 de células B, el CCR6, el P2X5, el HLA-DOB, el CXCR5, el FCER2, el BR3, el BtIg, el NAG14, el SLGC16270, el FcRH1, el IRTA2, el ATWD578, el FcRH3, el IRTA1, el FcRH6, el BCMA, y el 239287. El marcador de la superficie de células B de interés particular se expresa preferentemente en las células B en comparación con los otros tejidos del sujeto que no pertenecen a células B, y se puede expresar tanto en células B precursoras como maduras.

El antígeno “CD20”, o “CD20”, es una fosfoproteína no glicosilada, de aproximadamente 35-kDa, que se encuentra en la superficie de más del 90% de las células B de la sangre periférica o los órganos linfoides. El CD20 está presente tanto en células B normales como malignas, pero no se expresa en las células madre. Otros nombres que se dan al CD20 en la bibliografía son “antígeno restringido a linfocitos B” y “Bp35”. El antígeno CD20 se describe en Clark y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE.UU.) 82:1766 (1985), por ejemplo.

Un “antagonista de los marcadores de la superficie de células B” es una molécula que, al unirse en las células B a un marcador de la superficie de células B, destruye o reduce las células B del sujeto y/o interfiere en una o más de las funciones de las células B, *por ejemplo*, disminuyendo o impidiendo la respuesta humoral que las células B provocan. El antagonista es preferentemente capaz

de reducir las células B (*es decir*, disminuir los niveles de células B circulantes) en un sujeto tratado con dicho antagonista. Esta reducción puede conseguirse a través de diversos mecanismos, como la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complementos (CDC), la inhibición de la proliferación de células B y/o la inducción de la muerte de las células B (*por ejemplo*, vía apoptosis). Los antagonistas incluidos en el ámbito de la presente invención pueden ser anticuerpos, péptidos sintéticos o de secuencia nativa, inmunoadhesinas y antagonistas de molécula pequeña que se unen a un marcador de la superficie de células B como el CD20, opcionalmente conjugados o fusionados con un agente citotóxico. El antagonista preferente está constituido por un anticuerpo.

En la presente memoria descriptiva, un “antagonista anticuerpo del CD20” es un anticuerpo que, al unirse al CD20 en las células B, destruye o reduce las células B del sujeto y/o interfiere en una o más de las funciones de las células B, *por ejemplo*, disminuyendo o impidiendo la respuesta humoral que las células B provocan. El antagonista anticuerpo es preferentemente capaz de reducir las células B (*es decir*, disminuir los niveles de células B circulantes) en un sujeto tratado con dicho antagonista. Esta reducción puede conseguirse a través de diversos mecanismos, como la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complementos (CDC), la inhibición de la proliferación de células B y/o la inducción de la muerte de las células B (*por ejemplo*, vía apoptosis).

En la presente memoria descriptiva, el término “anticuerpo” se emplea en su sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, los anticuerpos biespecíficos) formados a partir de, al menos, dos anticuerpos intactos y los fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que preferentemente comprende la región de unión a antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos son los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, los diacuerpos, los anticuerpos lineales, las moléculas de anticuerpos de cadena única y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

En la presente memoria descriptiva, un “Anticuerpo intacto” es aquél que comprende dos regiones de unión a antígeno y una región Fc. El anticuerpo intacto tiene preferentemente una región Fc funcional.

Ejemplos de anticuerpos del CD20 son: el “C2B8”, que actualmente se llama “rituximab” (“RITUXAN[®]”) (patente de EE.UU. n° 5.736.137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con itrio-[90] denominado “Y2B8” o “Ibritumomab Tiuxetán” (ZEVALIN[®]) y comercializado por IDEC

ND

Pharmaceuticals, Inc. (patente de EE.UU. n° 5.736.137; 2B8 depositado en la ATCC bajo adquisición con el n° HB11388 el 22 de junio de 1993); el anticuerpo murino IgG2a "B1", llamado también "Tositumomab", opcionalmente marcada con ¹³¹I para generar el "131I-B1" o anticuerpo "iodina I131 tositumomab" (BEXXAR™) y comercializado por Corixa (véase, además, la patente de EE.UU. n° 5.595.721); el anticuerpo monoclonal murino "1F5" (Press *y col.*, *Blood* 69 (2):584-591 (1987) y variantes del mismo incluyendo una "estructura parcheada" o 1F5 humanizado (documento WO 2003/002607, Leung, S.; depósito en la ATCC HB-96450); el anticuerpo murino 2H7 y el quimérico 2H7 (patente de EE.UU. n° 5.677.180); el 2H7 humanizado (documento WO 2004/056312, Lowman *y col.*, y como se establece a continuación); el 2F2 (HuMax-CD20), un anticuerpo totalmente humano, de alta afinidad, dirigido a la molécula del CD20 en la membrana celular de las células B (Genmab, Dinamarca; véase, por ejemplo, Glennie *y Van de Winkel*, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003) y Cragg *y col.*, *Blood* 101: 1045-1052 (2003); documento WO 2004/035607; documento US2004/0167319); los anticuerpos monoclonales humanos especificados en los documentos WO 2004/035607 y US2004/0167319 (Teeling *y col.*); los anticuerpos con cadenas complejas de azúcares enlazadas a N-glicósidos y unidas a la región Fc descrita en el documento US 2004/0093621 (Shitara *y col.*); los anticuerpos monoclonales y los fragmentos de unión a antígeno que se unen al CD20 (documento WO 2005/000901, Tedder *y col.*) como el HB20-3, el HB20-4, el HB20-25 y el MB20-11; las moléculas de unión al CD20 como la serie AME de anticuerpos, *por ejemplo*, los anticuerpos AME 33 tal como se especifican en los documentos WO 2004/103404 y US2005/0025764 (Watkins *y col.*, Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME); las moléculas de unión al CD20 como las descritas en el documento US 2005/0025764 (Watkins *y col.*); el anticuerpo A20 o las variantes del mismo como el anticuerpo A20 quimérico o humanizado (cA20 y hA20, respectivamente) (documento US 2003/0219433, Immunomedics); los anticuerpos de unión al CD20, incluyendo el Leu-16 con reducción de epítomos, el 1H4 o el 2B8, opcionalmente conjugados con IL-2, como se indica en los documentos US 2005/0069545A1 y WO 2005/16969 (Carr *y col.*); el anticuerpo biespecífico que se une al CD22 y el CD20, por ejemplo, el hLL2xhA20 (documento WO2005/14618, Chang *y col.*); los anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles a través del International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *y col.*, en: *Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., página 440, Oxford University Press (1987)) y el H4 (Haisma *y col.*, *Blood* 92:184 (1998)). En la presente memoria descriptiva, los anticuerpos del CD20 preferentes son anticuerpos del CD20 humanos, humanizados o quiméricos, más preferentemente rituximab, el anticuerpo 2H7 humanizado, el anticuerpo humano del CD20 2F2 (Hu-Max-CD20) (Genmab) y el anticuerpo A20 humanizado (Immunomedics).

En la presente memoria descriptiva, los términos “rituximab” o “RITUXAN®” se refieren al anticuerpo monoclonal murino/humano, quimérico y creado mediante ingeniería genética, dirigido contra el antígeno CD20 y denominado “C2B8” en la patente de EE.UU. n° 5.736.137, incluyendo fragmentos del mismo que retienen la capacidad de unirse al CD20.

Puramente para los propósitos de la presente memoria descriptiva y a menos que se indique lo contrario, un anticuerpo “2H7 humanizado” es una variante humanizada del anticuerpo 2H7 murino, eficaz a la hora de reducir las células B circulantes *en vivo*.

En una realización, el anticuerpo 2H7 humanizado comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis de las siguientes secuencias de CDRs:

Secuencia RASSSVSYXH de la CDR L1 en que X es M o L (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 21), por ejemplo, el IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 4 (figura 1A),
 Secuencia de la CDR L2 del IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 5 (figura 1A),
 Secuencia QQWXFNPPT de la CDR L3 en que X es S o A (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 22), por ejemplo, el IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 6 (figura 1A),
 Secuencia de la CDR H1 del IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 10 (figura 1B),
 Secuencia AIYPGNGXTSYNQKFKG de la CDR H2 en que X es D o A (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 23), por ejemplo, el IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 11 (figura 1B), y
 Secuencia VVYYSSXXYWYFDV de la CDR H3 en que X en la posición 6 es N, A, Y, W o D, y en la posición 7 es S o R (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 24), por ejemplo, el IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 12 (figura 1B).

Por lo general, las anteriores secuencias de CDRs están presentes en las secuencias humanas de las estructuras ligera variable y pesada variable, como sustancialmente los residuos humanos de la FR de consenso del subgrupo I humano kappa de la cadena ligera (V_L6I) y sustancialmente los residuos humanos de la FR de consenso del subgrupo III humano de la cadena pesada (V_HIII). Véase también el documento WO 2004/056312 (Lowman *y col.*).

La región pesada variable puede unirse a una región constante humana de la cadena IgG, pudiendo ser la región, por ejemplo, IgG1 o IgG3, incluyendo regiones de secuencia nativa y constantes variantes.

En una realización preferente, este anticuerpo comprende la secuencia del dominio pesado variable del IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 8 (v16, tal como se muestra en la figura 1B), comprendiendo también opcionalmente la secuencia del dominio ligero variable del IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 2 (v16, tal como se muestra en la figura 1A), que opcionalmente comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 56, 100, y/o 100a, *por ejemplo* D56A, N100A o N100Y y/o S100aR, del dominio pesado variable y una o más

sustituciones de aminoácidos en las posiciones 32 y/o 92, *por ejemplo* M32L y/o S92A, del dominio ligero variable. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo intacto que comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de los IDENTIFICADORES DE SECUENCIA N^{OS} 13 ó 15, y las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de los IDENTIFICADORES DE SECUENCIA N^{OS} 14, 16, 17 ó 20.

Un anticuerpo 2H7 humanizado preferente es el ocrelizumab (Genentech).

En la presente memoria descriptiva, el anticuerpo puede comprender adicionalmente al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que mejora la actividad de la ADCC, como un anticuerpo en que las sustituciones de aminoácidos se produzcan en las posiciones 298, 333 y 334, preferentemente S298A, E333A y K334A, utilizando la numeración Eu para los residuos de la cadena pesada. Véase también la patente de EE.UU. n° 6.737.056B1, Presta.

Cualquiera de estos anticuerpos puede comprender al menos una sustitución en la región Fc que mejora la unión al FcRn o la vida media del suero, por ejemplo, una sustitución en la posición 434 de la cadena pesada, como N434W. Véase también la patente de EE.UU. n° 6.737.056B1, Presta.

Cualquiera de estos anticuerpos puede comprender adicionalmente al menos una sustitución en la región Fc que mejora la actividad de la CDC, por ejemplo, comprendiendo al menos una sustitución en la posición 326, preferentemente, K326A o K326W. Véase también la patente de EE.UU. n° 6.528.624B1 (Idusogie y col.).

Algunas variantes preferentes del 2H7 humanizado son aquéllas que comprenden el dominio ligero variable del IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 2 y el dominio pesado variable del IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 8, incluyendo las que tienen o no sustituciones en una región Fc (si está presente) y las que comprenden un dominio pesado variable con alteraciones N100A, o D56A y N100A, o D56A, N100Y y S100aR en el IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 8 y un dominio ligero variable con alteraciones M32L, o S92A, o M32L y S92A en el IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 2.

M34 en el dominio pesado variable del 2H7.v16 se ha identificado como una fuente potencial de estabilidad para los anticuerpos y es otro candidato potencial a la sustitución.

En un resumen de varias realizaciones preferentes de la invención, la región variable de las variantes basadas en el 2H7.v16 comprenden las secuencias de aminoácidos del v16 excepto en las posiciones de sustituciones de aminoácidos que se indican a continuación en la Tabla 3. A menos que se indique lo contrario, las variantes del 2H7 tendrán la misma cadena ligera que el v16.

Tabla 3

Ejemplos de variantes del anticuerpo 2H7 humanizado

Versión del 2H7	Cambios en la cadena pesada (V _H)	Cambios en la cadena ligera (V _L)	Cambios en Fc
16 para referencia			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L
588	-		S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR		S298A, E333A, K334A, K326A

Una versión preferente del 2H7 humanizado comprende la siguiente secuencia del dominio ligero variable del 2H7.v16:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG
5 SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 2);

y la secuencia del dominio pesado variable del 2H7.v16:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSY
NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFVDVWGQGTLLTV
10 SS (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 8).

Cuando el anticuerpo 2H7.v16 humanizado sea un anticuerpo intacto, puede comprender la siguiente secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
15 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 13);

y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 14 o:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSY
20 NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFVDVWGQGTLLTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL

FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSCV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 17).

5 Otra versión preferente del 2H7 humanizado comprende la siguiente secuencia del dominio
ligero variable del 2H7.v511:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (IDENTIFICADOR DE
SECUENCIA N° 18);

10 y la secuencia del dominio pesado variable del 2H7.v511:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNG
ATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWGQGT
LVTVSS (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 19).

15 Cuando el anticuerpo 2H7.v511 humanizado sea un anticuerpo intacto, puede comprender la
siguiente secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 15);

20 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del IDENTIFICADOR DE SECUENCIA
N° 16 o:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSY
NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWGQGT
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
25 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSCV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N° 20).

30 Los anticuerpos “inhibidores del crecimiento” son aquéllos que impiden o reducen la
proliferación de una célula que exprese un antígeno al cual el anticuerpo se une. Por ejemplo, el
anticuerpo puede impedir o reducir la proliferación de células B *in vitro* y/o *in vivo*.

Los anticuerpos que “inducen la apoptosis” son aquéllos que inducen la muerte celular
programada, *por ejemplo* de una célula B, tal como se determina en los ensayos estándar de apoptosis,

es decir, mediante la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, la contracción de las células, la dilatación del retículo endoplasmático, la fragmentación celular y/o la formación de vesículas en la membrana (llamadas cuerpos apoptóticos).

Los "anticuerpos nativos" son por lo general glicoproteínas heterotetraméricas con una masa atómica de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una pesada mediante un enlace covalente disulfuro, mientras que la cantidad de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los distintos isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro separados regularmente dentro de la cadena. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una cantidad de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y uno constante en el otro; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que ciertos residuos particulares de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en sus secuencias de un anticuerpo a otro y se utilizan para la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular con relación a su antígeno particular. De todos modos, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos, denominados regiones hipervariables, de los dominios variables tanto de la cadena ligera como la pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se llaman regiones de estructura (FRs). Cada dominio variable de las cadenas pesada y ligera nativas comprende cuatro FRs que, en gran parte, adoptan una configuración de hoja- β . Dichas FRs están conectadas por tres regiones hipervariables que crean bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la hoja- β . Las FR mantienen unidas y en estrecha proximidad las regiones hipervariables de cada cadena, las cuales, junto con las de la otra, contribuyen a la formación del punto de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *y col.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero desarrollan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno de ellos con un solo punto de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos puntos de unión a antígeno y todavía es capaz

de establecer un enlace cruzado con el antígeno.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un punto completo de reconocimiento y unión a antígeno. Esta región está compuesta por un dímero de un domino variable de cadena pesada y otro de cadena ligera en una estrecha asociación no covalente. En esta configuración, las tres
 5 regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un punto de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. No obstante, incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprenda únicamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer un antígeno y unirse a él, aunque con una afinidad menor que el punto
 10 de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab’ se diferencian de los Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de un anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se
 15 da en la presente memoria descriptiva a los Fab' en que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes presenta(n) al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab’ con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros emparejamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier vertebrado pueden
 20 asignarse a una de dos clases claramente distintas, denominadas kappa (κ) y lambda (λ), sobre la base de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Según la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus “cadenas pesadas” (si están presentes), los anticuerpos pueden asignarse a distintas clases. Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden seguir dividiéndose en
 25 subclases (isotipos), *por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las distintas clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las distintas clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

A menos que se indique lo contrario, en la presente memoria descriptiva la numeración de los
 30 residuos de una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU tal como se describe en Kabat y *col.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD (1991), incorporada expresamente a la presente memoria como referencia. El “índice EU tal como se describe en Kabat” se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo humano IgG1 EU.

En la presente memoria descriptiva, el término “región Fc” se utiliza para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluidas las regiones Fc de secuencia nativa y las variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada IgG humana se suele definir como la extensión desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el terminal carboxilo del mismo. La lisina C terminal (residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o generando mediante recombinación el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin residuos K447 eliminados y poblaciones de anticuerpos con una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

Una “región Fc funcional” tiene una “función efectora” de una región Fc de secuencia nativa. Algunos ejemplos de “funciones efectoras” incluyen la unión al C1q, la citotoxicidad dependiente de complementos, la unión al receptor de Fc, la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, la regulación a la baja de receptores en la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B, BCR), etc. Estas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, el dominio variable de un anticuerpo), y se pueden evaluar mediante diversos ensayos, tal y como se desvela en esta memoria descriptiva, por ejemplo.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácido idéntica a la secuencia de aminoácido de una región Fc que se pueda encontrar en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos A y no A), una región Fc IgG2 humana de secuencia nativa, una región Fc IgG3 humana de secuencia nativa y una región Fc IgG4 humana de secuencia nativa, así como las variantes de cualquiera de ellas que se producen de forma natural.

Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en al menos una modificación de aminoácidos, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o la región Fc de un polipéptido parental, *por ejemplo*, entre una y diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente entre una y cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. En la presente memoria descriptiva, la región Fc variante tendrá preferentemente al menos un nivel de homología del 80%, mejor aún si es del 90% e ideal si llega a ser del 95%, con una región Fc de secuencia nativa y/o una región Fc de un polipéptido parental.

La “citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos” y las siglas “ADCC” se

refieren a una reacción con mediación celular en que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcRs) (*por ejemplo*, las células asesinas naturales (NK), los neutrófilos y los macrófagos) reconocen en una célula diana el anticuerpo unido a ella y posteriormente producen la lisis de la célula. Las principales células que median en la ADCC, las células NK, sólo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-492 (1991). A fin de evaluar la actividad de la ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, como el que se describe en las patentes de EE.UU. n^{os} 5.500.362 ó 5.821.337. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se encuentran las células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC) y las asesinas naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de la ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *en vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el que se desvela en Clynes *y col.*, *PNAS (EE.UU.)* 95:652-656 (1998).

Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos el FcγRIII y realizan la función efectora de la ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC serían las células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC), las células asesinas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos, pero son las PBMC y las NK las células preferentes.

Los términos “receptor de Fc” o “FcR” se emplean para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferente es aquél que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) y pertenece a las subclases de receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo las variantes alélicas y las formas de estos receptores enlazadas alternativamente. Los receptores FcγRII incluyen el FcγRIIA (un “receptor activador”) y el FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), los cuales tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador FcγRIIA contiene en su dominio citoplasmático un motivo activador inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM). El receptor inhibidor FcγRIIB contiene en su dominio citoplasmático un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en la tirosina (ITIM). (Véase Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). En Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-492 (1991), Capel *y col.*, *Immunomethods*, 4:25-34 (1994) y de Haas *y col.*, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-341 (1995) también se revisan los FcRs. Otros FcRs, incluidos aquéllos que se identifiquen en el futuro, se engloban en el término “FcR” empleado en la presente memoria descriptiva. Este término también incluye el receptor neonatal, FcRn, responsable de la transferencia de los IgGs maternos al feto y la homeostasis de la inmunoglobulina (Guyer *y col.*, *J. Immunol.*, 117:587 (1976) y Kim *y col.*, *J. Immunol.*, 24:249

(1994)).

La "citotoxicidad dependiente de complementos" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula de producir la lisis de una sustancia objetivo en presencia del complemento. La ruta de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (*por ejemplo*, un anticuerpo) que forme complejo con un antígeno cognado. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, *por ejemplo*, tal como se describe en Gazzano-Santoro *y col.*, *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

Los fragmentos "Fv de cadena simple" o "scFv" de un anticuerpo comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo presentes en una cadena simple de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende también un enlazador de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión antigénica. Para una reseña sobre los scFv, véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, volumen 113, Rosenberg and Moore editores., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos puntos de unión a antígeno que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptidos ($V_H - V_L$). Mediante el uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, estos dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos puntos de unión antigénica. Los diacuerpos se describen con más detalle en, *por ejemplo*, la patente europea 404.097, el documento WO 93/11161 y Hollinger *y col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

El término "anticuerpo monoclonal", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, *es decir*, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos y/o se unen al (a los) mismo(s) epítipo(s), excepto en el caso de posibles variantes que pudiesen surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes, por lo general, presentes en cantidades insignificantes. Generalmente, dicho anticuerpo monoclonal incluye un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptidos que se une a una diana, obteniéndose dicha secuencia de polipéptidos unida a una diana mediante un proceso que incluye la selección de una secuencia de polipéptidos única unida a una diana a partir de una gran variedad de secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon a partir de una gran variedad de clones, como un conjunto de clones de hibridoma, clones de fago o clones recombinantes del ADN. Debería entenderse que la secuencia seleccionada de unión a una diana puede sufrir más alteraciones, por ejemplo, para mejorar la afinidad con la diana, humanizar la secuencia de unión a la diana, mejorar su producción en cultivo celular, reducir su

inmunogenicidad *en vivo*, crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia alterada de unión a una diana es también un anticuerpo monoclonal de esta invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que generalmente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que no suelen estar contaminadas por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo de que se ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que sea necesario producir el anticuerpo por algún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilicen de conformidad con la presente invención pueden obtenerse a partir de diversas técnicas, incluido, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (*por ejemplo*, Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975); Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición 1988); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), los procedimientos del ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, la patente de EE.UU. n° 4.816.567), las tecnologías de reproducción de imágenes de fago (véase, *por ejemplo*, Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu y col., *J. Mol. Biol.* 338 (2):299-310 (2004); Lee y col., *J. Mol. Biol.* 340 (5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101 (34):12467-12472 (2004); y Lee y col. *J. Immunol. Methods* 284 (1-2):119-132 (2004)) y las tecnologías para producir anticuerpos humanos o semejantes a los humanos en animales que tienen partes o la totalidad de los loci de la inmunoglobulina humana o los genes que codifican las secuencias de la inmunoglobulina humana (véase, *por ejemplo*, el documento WO 1998/24893; el documento WO 1996/34096; el documento WO 1996/33735; el documento WO 1991/10741; Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann y col., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); las patentes de EE.UU. n°s 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm) y 5.545.807; el documento WO 1997/17852; las patentes de EE.UU. n°s 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 y 5.661.016; Marks y col., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

En la presente memoria descriptiva, los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente los anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de

otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. n° 4.816.567 y Morrison *y col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria descriptiva incluyen los anticuerpos “primatizados”, que comprenden

5 secuencias de unión a antígeno de dominios variables obtenidas de un primate no humano (*por ejemplo*, los monos del Viejo Mundo, como el babuino, el macaco rhesus o el mono cynomolgus) y secuencias humanas de regiones constantes (patente de EE.UU. n° 5.693.780).

Las formas “humanizadas” de los anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, los murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no

10 humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por los residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como el ratón, la rata, el conejo o los primates no humanos, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de estructura (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen

15 por sus correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentren en el anticuerpo receptor o el donante. Estas modificaciones se llevan a cabo para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables (o al menos uno, y típicamente dos), en los cuales todos, o sustancialmente todos, los bucles hipervariables corresponden a

20 los de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las FRs son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, excepto en la(s) sustitución(es) de FRs tal como se ha indicado anteriormente. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente humana. Para más detalles, véase Jones *y col.*, *Nature*, 321:522-525 (1986), Riechmann *y col.*, *Nature*, 332:323-329 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

25

El término “región hipervariable”, en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región de determinación de complementariedad” o “CDR” (*por ejemplo*, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del

30 dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Kabat *y col.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, Servicio Público de Salud, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable” (*por ejemplo*, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio variable de la cadena

pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)). Los residuos de una "estructura" o "FR" son aquellos residuos de un dominio variable distintos de los de una región hipervariable, tal como se define en la presente memoria descriptiva.

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo (tal como se define en la presente memoria descriptiva) que no se conjuga con una molécula heteróloga, como un segmento citotóxico o una etiqueta radiactiva.

En la presente memoria descriptiva, un "Anticuerpo intactoA" es aquél que comprende dos regiones de unión a antígeno y una región Fc. El anticuerpo intacto tiene preferentemente una región Fc funcional.

Un anticuerpo "aislado" es aquél que se ha identificado y separado, y/o recuperado, a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en el diagnóstico o los usos terapéuticos del anticuerpo, y podrían incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En las realizaciones preferentes, el anticuerpo se purificará (1) en más del 95% de su peso tal como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente, en más del 99% de su peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o internos mediante un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta alcanzar la homogeneidad mediante SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, empleando una tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, plata. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. De todas formas, normalmente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo con "Amaduración de afinidad@" es aquél con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables del mismo que resultan en una mejora de la afinidad del anticuerpo al antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posea dicha(s) alteración(es). Los anticuerpos con maduración de afinidad preferentes tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares con el antígeno diana. Los anticuerpos con maduración de afinidad se producen mediante procedimientos bien conocidos en el sector. En Marks *y col.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992), se describe la maduración de afinidad a través de la transposición de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de la CDR y/o los residuos de estructura se describen en: Barbas *y col.*, *Proc Nat. Acad. Sci, USA*, 91:3809-3813 (1994), Schier *y col.*, *Gene*, 169:147-155 (1995), Yelton *y col.*, *J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995), Jackson *y col.*, *J. Immunol.*, 154(7):3310-9 (1995) y Hawkins *y col.*, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992).

En la presente memoria descriptiva, el "tratamiento" de un sujeto se refiere tanto al tratamiento terapéutico como las medidas profilácticas o preventivas. Entre las personas que necesitan tratamiento

se incluyen aquéllas que ya tienen EII así como las que deben tomar medidas para prevenirla. De aquí que tal vez hayan diagnosticado EII al paciente o éste quizá tenga predisposición o sea susceptible a la EII. Los términos “tratando”, “tratar” o “tratamiento”, en el contexto de la presente memoria descriptiva, incluyen tratamientos preventivos (*por ejemplo*, profilácticos), paliativos y curativos.

5 El término “agente inmunosupresor”, tal como se usa en la presente memoria descriptiva para la terapia asociada, se refiere a sustancias que suprimen o enmascaran el sistema inmunológico del paciente que aquí se está tratando. Estos agentes incluirían sustancias que suprimen la producción de citoquina, regulan a la baja o suprimen la autoexpresión de antígenos o enmascaran los antígenos del MHC (complejo principal de histocompatibilidad). Ejemplos de estos agentes serían las pirimidinas 2-
10 amino-6-aril-5-sustituidas (véase la patente de EE.UU. n° 4.665.077); los medicamentos antiinflamatorios no esteroides (NSAIDs); el ganciclovir; el tacrolimus; los glucocorticoides como el cortisol o la aldosterona; los agentes antiinflamatorios como un inhibidor de la ciclooxigenasa; un inhibidor de la 5-lipoxigenasa o un antagonista receptor del leucotrieno; los antagonistas de la purina como la azatioprina o el micofenolato mofetil (MMF); los agentes alquilantes como la ciclofosfamida;
15 la bromocriptina; el danazol; la dapsona; el glutaraldehído (que enmascara los antígenos del MHC, tal como se describe en la patente de EE.UU. n° 4.120.649); los anticuerpos anti-idiotípicos para los antígenos y fragmentos del MHC; la ciclosporina; la 6 mercaptopurina; los esteroides como los corticosteroides, los glucocorticosteroides o los análogos a los glucocorticoides, *por ejemplo*, prednisona, metilprednisolona, incluyendo succinato sódico de metilprednisolona (SOLU-MEDROL®),
20 y dexametasona; los inhibidores de la dihidrofolato reductasa como el metotrexato (oral o subcutáneo); los agentes contra la malaria como la cloroquina y la hidroxiclороquina; la sulfasalazina; la leflunomida; la citoquina o los anticuerpos o antagonistas receptores de citoquina incluyendo los anticuerpos anti-interferón-alfa, -beta o -gamma, los anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral(TNF)-alfa (infliximab (REMICADE®) o adalimumab), la inmunoadhesina anti-TNF-alfa (etanercept), los
25 anticuerpos anti-TNF-beta, los anticuerpos anti-interleukin-2 (IL-2) y anti-receptores de IL-2 y los anticuerpos y antagonistas anti-receptores de interleukin-6 (IL-6); los anticuerpos anti-LFA-1, incluyendo los anti-CD11a y anti-CD18; los anticuerpos anti-L3T4; la globulina anti-linfocitos heteróloga; los anticuerpos pan-T, preferentemente los anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; un péptido soluble que contenga un dominio de unión a LFA-3 (documento WO 90/08187 publicado el 26 de julio de
30 1990); la estreptoquinasa; el factor de crecimiento transformador-beta (TGF-beta); la estreptodornasa; el ARN o ADN del anfitrión; el FK506; el RS-61443; el clorambucil; la deoxispergualina; la rapamicina; el receptor de células T (Cohen *y col.*, patente de EE.UU. n° 5.114.721); los fragmentos del receptor de células T (Offner *y col.*, *Science*, 251: 430-432 (1991); el documento WO 90/11294; Ianeway, *Nature*, 341: 482 (1989) y el documento WO 91/01133); los antagonistas del BAFF como los

anticuerpos o inmunoadhesinas del BAFF o el BR3 y los antagonistas del zTNF4 (para una reseña, véase Mackay y Mackay, *Trends Immunol.*, 23:113-5 (2002) y también la definición más adelante); los agentes biológicos que interfieren en las señales auxiliares de las células T, como el receptor anti-CD40 o el ligando anti-CD40 (CD154), incluyendo los anticuerpos de bloqueo del ligando CD40-CD40 (*por ejemplo*, Durie y col., *Science*, 261: 1328-30 (1993); Mohan y col., *J. Immunol.*, 154: 1470-80 (1995)) y CTLA4-Ig (Finck y col., *Science*, 265: 1225-7 (1994)) y los anticuerpos de receptores de células T (documento EP 340.109) como el T10B9.

El término “agente citotóxico”, en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa su destrucción. El término pretende incluir isótopos radiactivos (*por ejemplo*, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² y los isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas como las de molécula pequeña o las enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos serían los agentes alquilantes como la tiotepa y la ciclofosfamida (CYTOXAN®); los sulfonatos de alquilo como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas como la benzodopa, la carboquona, la meturedopa y la uredopa; las etilniminas y metilamelaminas incluyendo la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilenofosforamida, la trietilenotiofosforamida y la trimetilolomelamina; los acetogeninos (en especial, el bullatacín y la bullatacinona); el delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); la beta-lapachona; el lapachol; las colchicinas; el ácido betulínico, una camptotecina (incluyendo el topotecán análogo sintético (HYCAMTIN®), el CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), la acetilcamptotecina, la escopolectina y la 9-aminocamptotecina); la briostatina; la callistatina; el CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adocesina, carcelesina y bicelesina); la podofilotoxina; el ácido podofilínico; la teniposida; las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongistatina; los gases nitrógeno como el clorambucil, la clornafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato de óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembichina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida y la uramustina; las nitrosureas como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina y la ranimustina; los antibióticos como los de enedina (*por ejemplo*, la calicheamicina, especialmente la calicheamicina gamma II y la omega II (véase, *por ejemplo*, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); la dinemicina, incluyendo la dinemicina A; una esperamicina; el cromóforo de neocarcinostatina y los cromóforos de antibióticos de enedina

cromoproteína relacionados (las aclacinomisinas, la actinomicina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinomicina, la carabicina, la carminomicina, la carcinofilina, las cromomicinas, la dactinomicina, la daunorrubicina, la detorrubicina, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, la morfolino-doxorrubicina, la cianomorfolino-doxorrubicina, la 2-pirrolino-doxorrubicina, la inyección de liposomas de doxorubicina HCl (DOXIL®) y la desoxidoxorrubicina), la epirubicina, la esorrubicina, la idarrubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la potfiromicina, la puromicina, la quelamicina, la rodorrubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la cinostatina y la zorrubicina); los antimetabolitos como el metotrexato, la gemcitabina (GEMZAR®), el tegafur (UFTORAL®), la capecitabina (XELODA®), una epotilona y el 5-fluorouracilo (5-FU); los análogos del ácido fólico como la denopterina, el metotrexato, la teropterina y el trimetrexato; los análogos de la purina como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina y la tioguanina; los análogos de la pirimidina como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la didesoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina y la floxuridina; los antiadrenales como la aminoglutetimida, el mitotano y el trilostano; un reabastecedor del ácido fólico como el ácido folínico; la aceglatona; el glucósido aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucil; el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; la elfornitina; el acetato de eliptinio; el etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiiurea; el lentinán; la lonidainina; los maitansinoides como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; el pentostatín; el fenamet; la pirarrubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidracida; la procarbicina; el complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); el razoxano; la rizoxina; el sizofirán; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaciquona; la 2,2',2"-triclortrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, el verracurín A, el roridín A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); la dacarbicina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromán; la gacitosina; la arabinosida ("Ara-C"); la tiotepa; los taxoides, *por ejemplo*, el paclitaxel (TAXOL®), la formulación de nanopartículas de paclitaxel mediante ingeniería de albúmina (ABRAXANE™) y el doxetaxel (TAXOTERE®); el clorambucil; la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metatrexato; los análogos de platino o los basados en platino como el cisplatino y el carboplatino; la vinblastina (VELBAN®); el platino; el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la vincristina (ONCOVIN®); el oxaliplatino; la leucovovina; la vinorelbina (NAVELBINE®); la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor RFS 2000 de la topoisomerasa; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides como el ácido retinoico y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores, así

como las combinaciones de una o más de las sustancias anteriores como la CHOP, la abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y la FOLFOX, la abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovorina.

5 También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que regulan, reducen, bloquean o inhiben los efectos de las hormonas que pueden fomentar el crecimiento del cáncer y se presentan a menudo en la forma de un tratamiento sistémico o del cuerpo entero. Estos agentes podrían ser hormonas propiamente. Como ejemplos tendríamos los antiestrógenos y los moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, el tamoxifeno (también el
10 tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno (EVISTA®), el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona y el toremifeno (FARESTON®); las antiprogesteronas; los reguladores a la baja de los receptores de estrógenos (ERDs); los antagonistas de los receptores de estrógenos como el fulvestrant (FASLODEX®); los agentes que oprimen o cierran los ovarios, por ejemplo, los agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH)
15 como el acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), el acetato de goserelina, el acetato de buserelina y la tripterelina; los antiandrógenos como la flutamida, la nilutamida y la bicalutamida y los inhibidores de la aromatasa que inhiben el enzima aromatasa, encargado de regular la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, como, por ejemplo, las 4(5)-imidazolas, la aminoglutetimida, el acetato de megestrol (MEGASE®), el exemestano (AROMASIN®), la formestania, la fadrozola, la vorozola (RIVISOR®), la letrozola (FEMARA®) y la anastrozola (ARIMIDEX®). Además, esta
20 definición de los agentes quimioterapéuticos incluye los bisfosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), el etidronato (DIDROCAL®), el NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), el alendronato (FOSAMAX®), el pamidronato (AREDIA®), el tiludronato (SKELID®) o el risedronato (ACTONEL®), así como la troxacitabina (un análogo de la
25 citosina nucleósida 1,3-dioxolano); los oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión génica en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, como, por ejemplo, el PKC-alfa, el Raf, el H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); las vacunas como THERATOPE® y las que se aplican para terapias génicas, por ejemplo, la ALLOVECTIN®, la LEUVECTIN® y la VAXID®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 (*por ejemplo*,
30 LURTOTECAN®); el mRH (*por ejemplo*, ABARELIX®); el ditosilato de lapatiniba (un inhibidor de molécula pequeña doble tirosina quinasa del ErbB-2 y el EGFR conocido también como GW572016) y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores.

El término “citoquina” es un término genérico para aquellas proteínas, liberadas por una población de células, que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de estas citoquinas son las linfoquinas; las monoquinas; las interleuquinas (ILs) como la IL-1, la IL-1 α , la IL-2, la IL-3, la IL-4, la IL-5, la IL-6, la IL-7, la IL-8, la IL-9, la IL-11, la IL-12 y la IL-15, incluyendo la PROLEUKIN® rIL-2, la IL-4 humana y los mutantes de la IL-4 humana como, por ejemplo, un mutante que contenga una mutación en la región de la IL-4 que participa en la unión a la IL-2R gamma, *por ejemplo*, cuando Arg 21 cambia a un residuo Glu; un factor de necrosis tumoral como el TNF- α o el TNF- β y otros factores polipéptidos incluyendo el LIF y el ligando de kit (KL). En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas por vía sintética y los derivados y las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

El término “hormona” se refiere a hormonas polipéptidas, que por lo general segregan los órganos glandulares con conductos. Entre estas hormonas se incluyen, por ejemplo, las hormonas del crecimiento como la del crecimiento humano, el crecimiento humano N-metionil y el crecimiento bovino; la hormona paratiroide; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; el estradiol; la terapia de sustitución de hormonas; los andrógenos como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitioestanol, la mepitioestana o la testolactona; la prorrelaxina; las hormonas glicoproteínas como la hormona de estimulación folicular (FSH), la hormona de estimulación tiroidea (TSH) y la hormona luteinizante (LH); la prolactina; el lactógeno placentario; el péptido asociado a la gonadotropina murina; la hormona de liberación de la gonadotropina; la inhibina; la activina; la sustancia inhibidora mulleriana y la trombopoyetina. En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término hormona incluye proteínas de fuentes naturales o cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las hormonas de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas por vía sintética y los derivados y las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

El término “factor de crecimiento” se refiere a las proteínas que fomentan el crecimiento e incluyen, por ejemplo, el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento fibroblástico; el factor de crecimiento endotelial vascular; los factores de crecimiento nervioso como el NGF- β ; el factor de crecimiento derivado de las plaquetas; los factores de crecimiento transformador (TGFs) como el TGF- α y el TGF- β ; los factores I y II de crecimiento similar a la insulina; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductivos; los interferones como el interferón- α , el - β y el - γ ; los factores de estimulación de colonias (CSFs) como el macrófago-CSF (M-CSF); el granulocito-macrofago-CSF (GM-CSF) y el granulocito-CSF (G-CSF). En el contexto de la presente memoria descriptiva, el

término factor de crecimiento incluye proteínas de fuentes naturales o cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos del factor de crecimiento de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas por vía sintética y los derivados y las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

5 El término “integrina” se refiere a una proteína receptora que permite a las células tanto unirse como responder a la matriz extracelular e interviene en diversas funciones celulares como la curación de heridas, la diferenciación celular, la migración de células tumorales y la apoptosis. Forman parte de una gran familia de receptores de adhesión celular que participan en la matriz extracelular de las células y las interacciones entre células. Las integrinas funcionales constan de dos subunidades de glicoproteína transmembrana, llamadas alfa y beta, que están unidas de forma no covalente. Todas las subunidades alfa comparten cierta homología entre sí, al igual que las beta. Los receptores siempre contienen una cadena alfa y una beta. Ejemplos de estos receptores serían el Alpha6beta1, el Alpha3beta1, el Alpha7beta1, el LFA-1 *etc.* En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término “integrina” incluye proteínas de fuentes naturales o cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de la integrina de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas por vía sintética y los derivados y las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

20 Para los propósitos de la presente memoria descriptiva, el “factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa)” se refiere a la molécula TNF-alfa humana que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se describe en Pennica *y col.*, *Nature*, 312:721 (1984) o Aggarwal *y col.*, *JBC*, 260:2345 (1985). En la presente memoria descriptiva, un “inhibidor del TNF-alfa” es un agente que inhibe, hasta cierto punto, una función biológica del TNF-alfa, normalmente a través de la unión a dicha molécula y neutralizando su actividad. Ejemplos de inhibidores del TNF específicamente estudiados en la presente memoria descriptiva son el etanercept (ENBREL®), el infliximab (REMICADE®) y el adalimumab (HUMIRA™).

25 Los ejemplos de “medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad” o “DMARDs” incluyen la hidroxicloroquina, la sulfasalazina, el metotrexato, la leflunomida, el etanercept, el infliximab, la azatioprina, la D-penicilamina, las sales doradas (orales), las sales doradas (intramusculares), la minociclina, la ciclosporina incluyendo la ciclosporina A y la tópica, la proteína A *estafilococal* (Goodyear y Silverman, *J. Exp. Med.*, 197, (9), páginas 1125-39 (2003)), incluyendo las sales y los derivados de la misma, *etc.*

30 Ejemplos de “medicamentos antiinflamatorios no esteroideos” o “NSAIDs” serían la aspirina, el ácido acetilsalicílico, el ibuprofeno, el naproxeno, la indometacina, el sulindac, la tolmetina, los inhibidores de COX-2 como el celecoxib (CELEBREX®), la benzenosulfonamida 4-(5-(4-metilfenil)-

3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-yl) y el valdecóxib (BEXTRA®) y el meloxicam (MOBIC®), incluyendo las sales y los derivados del mismo, *etc.*

En la presente memoria descriptiva, los ejemplos de "antagonistas o anticuerpos de la integrina" incluirían un anticuerpo LFA-1, como el efalizumab (RAPTIVA®), comercializado por Genentech, o un anticuerpo de la integrina alfa 4 como el natalizumab (ANTEGREN®), comercializado por Biogen, o los derivados de la fenilalanina diazacíclica (documento WO 2003/89410), los derivados de la fenilalanina (documentos WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 y WO 2003/53926), los derivados del ácido fenilpropiónico (documento WO 2003/10135), los derivados de la enamina (documento WO 2001/79173), los derivados del ácido propanoico (documento WO 2000/37444), los derivados del ácido alcanoico (documento WO 2000/32575), los derivados del fenil sustituido (patente de EE.UU. n° 6.677.339 y 6.348.463), los derivados de la amina aromática (patente de EE.UU. n° 6.369.229), los polipéptidos del dominio de la disintegrina ADAM (documento US2002/0042368), los anticuerpos de la integrina alfa beta3 (documento EP 633945), los derivados de los aminoácidos bicíclicos con puente aza (documento WO 2002/02556), *etc.*

Los "corticosteroides" se refieren a cualquiera de las diversas sustancias sintéticas o de producción natural, con la estructura química general de los esteroides, que emula o aumenta los efectos de los corticosteroides que se producen de forma natural. Los ejemplos de corticosteroides sintéticos incluirían la prednisona, la prednisolona (incluyendo la metilprednisolona, como el succinato sódico de metilprednisolona SOLU-MEDROL®), la dexametasona o la dexametasona triamcinolona, la hidrocortisona y la betametasona. En la presente memoria descriptiva, los corticosteroides preferentes serían la prednisona, la metilprednisolona, la hidrocortisona o la dexametasona.

Tal como se emplea en la presente memoria descriptiva, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del anticuerpo o antagonista que resulta eficaz para tratar la EII. Por lo general, las cantidades eficaces se determinan por el efecto que tienen en comparación con el efecto observado cuando se administra una composición sin ingredientes activos (*es decir*, un control) a un individuo con una situación similar.

Un "prospecto" se refiere a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los envases comerciales de los productos terapéuticos y contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, la posología, las contraindicaciones, otros productos terapéuticos que pueden combinarse con el producto envasado y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos, *etc.*

Un "medicamento" es un fármaco activo para tratar la EII, sus síntomas o efectos secundarios.

II. Terapia de la EII

La invención de la presente memoria descriptiva ofrece un procedimiento para tratar la EII en un sujeto humano que consiste en administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo (o antagonista) que se une a un marcador de la superficie de las células B, como el CD20.

En particular, la invención ofrece procedimiento para tratar los casos moderados-graves de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto humano que consiste en administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo (o antagonista) del CD20 y cuyo resultado es una respuesta clínica y/o la remisión de la enfermedad.

Esta administración también puede reducir las células B de la mucosa colónica, los parches de Peyer, los tejidos u órganos linfoides secundarios, como los nódulos linfáticos y el bazo, y la sangre, pero especialmente de la mucosa colónica del sujeto.

La EII puede adoptar las formas de colitis ulcerativa (CU) o enfermedad de Crohn, pero preferentemente CU. El sujeto tratado en la presente memoria descriptiva puede tener formas activas de EII, CU o enfermedad de Crohn. Por lo general, el nivel de la enfermedad del sujeto tratado, en cualquiera de sus tres modalidades, será moderado-grave.

Además, el sujeto podría padecer una EII, una CU o una enfermedad de Crohn refractarias a los esteroides y/o dependientes de éstos.

Los sujetos tratados en la presente memoria descriptiva pueden: haber recibido un diagnóstico de EII ≥ 6 meses antes de la exploración; presentar ≥ 20 cm de enfermedad activa en la sigmoidoscopia de la exploración; tener la enfermedad activa definida por un resultado del IAE de entre ≥ 6 y ≤ 11 , con ≥ 2 para la hemorragia rectal y ≥ 2 para la sigmoidoscopia flexible; haber recibido tratamiento para la CU con corticosteroides durante los dos años anteriores a la exploración; haber recibido un tratamiento con una intensidad superior a una dosis equivalente de prednisona de 20 mg/día durante al menos dos semanas; ser resistente o refractario al etanercept, el infliximab o el adalimumab; haber recibido tratamiento con una dosis estable de aminosalicilato durante ≥ 3 semanas; haber recibido tratamiento con una dosis estable de corticosteroides orales durante ≥ 2 semanas; haber recibido tratamiento con 6-MP durante un período de 3 meses y una dosis estable de dicho medicamento durante ≥ 4 semanas o haber recibido un tratamiento con azatioprina durante un período de 3 meses y una dosis estable durante ≥ 4 semanas.

El tratamiento estándar para sujetos con CU activa moderada-grave es una terapia con dosis estándar de: un aminosalicilato, un corticosteroide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) y/o azatioprina. La terapia con un anticuerpo del CD20, tal como se desvela en la presente memoria descriptiva, mejorará la remisión de la enfermedad (control rápido de la enfermedad y/o remisión prolongada) y/u ofrecerá una respuesta clínica superior a la obtenida con el tratamiento estándar para estos sujetos.

La administración del anticuerpo puede dar como resultado la remisión de la enfermedad,

alcanzándose dicha remisión alrededor de la semana 8. Preferentemente, el tiempo de remisión de la enfermedad es inferior al que tarda un sujeto que no se trate con el anticuerpo del CD20. Además, la duración de la remisión es preferentemente mayor que la de un sujeto que no se trate con el anticuerpo del CD20. Por ejemplo, la duración de la remisión podría ser de al menos 24 semanas, mejor aún al menos 48 e idealmente al menos 2 años, desde el tratamiento inicial o la manifestación de la remisión. La remisión puede definirse como una sigmoidoscopia que dé 0 ó 1 como resultado y/o una hemorragia rectal que dé 0 como resultado.

La administración del anticuerpo puede dar como resultado una respuesta clínica, obteniéndose dicha respuesta, por ejemplo, alrededor de la semana 8. En la presente memoria descriptiva, la respuesta clínica puede definirse como una reducción del resultado del índice de actividad de la enfermedad (IAE), disminuyendo, por ejemplo, en 3 o más puntos.

En una realización, el sujeto jamás se ha tratado anteriormente con un anticuerpo del CD20. Preferentemente, el sujeto no padece malignidad en las células B. El sujeto también es preferentemente una persona que no padezca una enfermedad autoinmune, aparte de la EII, la CU o la enfermedad de Crohn.

La invención también ofrece un procedimiento para reducir el resultado del índice de actividad de la enfermedad (IAE) en un sujeto humano con colitis ulcerativa (CU) activa que consiste en administrar al sujeto un anticuerpo del CD20 en una cantidad eficaz para reducir ese resultado del IAE. Preferentemente, el sistema del resultado del IAE es como el de la Tabla 2 de la presente memoria descriptiva, y la administración del anticuerpo del CD20 reduce el resultado del IAE en 3 o más puntos.

Adicionalmente, el procedimiento también sirve para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) activa en sujetos humanos con un(os) nivel(es) atípico(s) de anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos perinucleares (p-ANCA) y/o autoanticuerpos anti-isoforma 5 humana de la tropomiosina (hTM5). La administración de un anticuerpo del CD20 en el sujeto reduce eficazmente su(s) nivel(es) de anticuerpos p-ANCA y/o anti-hTM5.

El médico determinará la dosis exacta de acuerdo con los estándares aceptados, teniendo en cuenta la naturaleza y gravedad del estado que deba tratarse, la clase de antagonista o anticuerpo, las características del sujeto, *etc.* Cualquier profesional con aptitudes normales será capaz de determinar dicha dosis. Preferentemente, el anticuerpo se administra por vía sistemática, intravenosa o subcutánea. En función de la vía y el procedimiento de administración, el antagonista o anticuerpo se puede administrar en una dosis única, como infusión prolongada o intermitentemente a lo largo de un período amplio. La administración intravenosa se realizará normalmente mediante inyección o infusión en bolo a lo largo de un período típico de varias horas. Se pueden emplear formulaciones de liberación

sostenida.

En una realización preferente, el procedimiento comprende la administración de una o más dosis de entre 200 y 2.000 mg, mejor aún de entre 500 y 1.500 mg e idealmente entre 750 y 1.200 mg. Por ejemplo, se pueden administrar una o cuatro dosis, o sólo una o dos. Según esta realización, el anticuerpo podría administrarse dentro de un período de alrededor de un mes, mejor aún entre 2 y 3 semanas e idealmente unas 2 semanas.

Cuando se administre más de una dosis, la última (por ejemplo, la segunda o tercera) se realiza preferentemente entre 1 y 20 días, mejor aún entre 6 y 16 días e idealmente entre 14 y 16 días después de la administración de la dosis anterior. Las dosis separadas se administran preferentemente dentro de un período total de entre 1 día y cuatro semanas, y mejor aún entre 1 y 20 días (*por ejemplo*, un período de 6-18 días). La cantidad de cada una de estas dosis separadas del anticuerpo debería ser preferentemente de entre 200 y 2.000 mg, mejor aún entre 500 y 1.500 mg e idealmente entre 750 y 1.200 mg.

De todos modos, tal como se ha indicado anteriormente, estas cantidades sugeridas del antagonista o anticuerpo están sujetas en gran medida al criterio terapéutico. El factor clave para seleccionar una dosis y programación apropiadas es el resultado obtenido, tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, al principio, tal vez se requieran dosis relativamente superiores para el tratamiento de la EII activa. No obstante, una dosis posterior puede ser superior a otra anterior. A fin de obtener los resultados más eficaces, el antagonista o anticuerpo se administra por lo general lo más rápidamente posible tras la primera señal, diagnóstico, aparición o manifestación de la enfermedad o trastorno o durante sus remisiones.

Por tanto, la invención ofrece un procedimiento para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto humano con EII activa que consiste en administrar al paciente sólo una o dos dosis de un anticuerpo del CD20, obteniendo ya como resultado tras dicha(s) dosis la remisión de la enfermedad o una respuesta clínica. Preferentemente, estas dosis se administran intravenosa (IV) o subcutáneamente (SC). Si se administra un par de dosis intravenosas, la cantidad de cada una de ellas debería ser preferentemente de entre 200 y 2.000 mg.

El antagonista o anticuerpo se administra por cualquier medio apto, incluyendo las vías parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, intraarticular e intranasal, por inhalación y, si se desea para un tratamiento inmunosupresor local, la administración también puede ser intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el antagonista o anticuerpo podría administrarse correctamente mediante infusión de efecto rápido, *por ejemplo*, con dosis cada vez menores del antagonista o anticuerpo. Preferentemente, la dosificación se realiza mediante inyecciones, mejor aún por vía

intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

El sujeto puede volver a tratarse con el antagonista o anticuerpo, recibiendo más de una exposición, al menos dos, o un conjunto de dosis; por ejemplo, entre 2 y 60 exposiciones, más particularmente entre 2 y 40 e idealmente entre 2 y 20.

5 En una realización, se puede aplicar cualquier segundo tratamiento cuando las señales o los síntomas de la enfermedad reaparezcan, ésta ya no remita y/o los niveles de los anticuerpos p-ANCA o anti-hTM5 asciendan, etc.

En otra realización, se puede aplicar cualquier segundo tratamiento a intervalos definidos. Por ejemplo, las exposiciones posteriores se pueden administrar en varios intervalos, como, por ejemplo, 10 entre 24 y 28 semanas o entre 48 y 56, incluso más tiempo. Preferentemente, estas exposiciones se administran a intervalos de alrededor de 24 a 26, 38 a 42 ó 50 a 54 semanas cada uno.

En una realización, cada exposición de antagonista o anticuerpo se administra como dosis única. En otra realización alternativa, cada exposición de antagonista o anticuerpo se administra como dosis separada. De todas formas, no es necesario que cada exposición de antagonista o anticuerpo se 15 administre como dosis única o separada.

El antagonista preferente es un anticuerpo. En los procedimientos establecidos en la presente memoria descriptiva, el anticuerpo del CD20 podría ser un anticuerpo desnudo o conjugarse con otra molécula como un agente citotóxico o una citoquina. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo desnudo e intacto. En la presente memoria descriptiva, el anticuerpo del CD20 preferente es un 20 anticuerpo del CD20 humano, humanizado o quimérico, más preferentemente rituximab, el anticuerpo 2H7 humanizado, el anticuerpo humano del CD20 2F2 (HuMax-CD20) (Genmab) y el anticuerpo A20 humanizado (Immunomedics). Los más preferentes son el rituximab o el 2H7 humanizado.

En otra realización más de todos los procedimientos de la presente memoria descriptiva, el sujeto jamás se ha tratado anteriormente con medicamentos, como un agente para tratar la EII, y/o 25 jamás se ha tratado anteriormente con un antagonista o anticuerpo de un marcador de la superficie de células B (*por ejemplo*, jamás se ha tratado anteriormente con un anticuerpo del CD20).

En cualquiera de los procedimientos de la presente memoria descriptiva, se puede administrar al sujeto, junto con el antagonista o anticuerpo que se une al marcador de la superficie de células B, una cantidad eficaz de un segundo medicamento (cuando el antagonista o anticuerpo que se une al 30 marcador de la superficie de células B (*por ejemplo*, el anticuerpo del CD20) sea un primer medicamento). La clase de este segundo medicamento depende de diversos factores, incluyendo la clase de EII, la gravedad de la misma, el estado y la edad del sujeto, la clase y dosis del primer medicamento empleado, *etc.*

Ejemplos de estos medicamentos adicionales u otras terapias serían otro agente para tratar la

EII, un agente quimioterapéutico, un medicamento de la clase del interferón como el interferón-alfa (*por ejemplo*, de Amarillo Biosciences, Inc.), el IFN-beta-1a (REBIF® y AVONEX®) o el IFN-beta-1b (BETASERON®), un oligopéptido como el acetato de glatiramero (COPAXONE®), un agente de bloqueo del ligando CD40-CD40, un agente citotóxico (como una mitoxantrona (NOVANTRONE®), el metotrexato, la ciclofosfamida, el clorambucil, la leflunomida y la azatioprina), uno o más agentes inmunosupresores (*por ejemplo*, la azatioprina, la 6-mercaptopurina o la ciclosporina), la inmunoglobulina intravenosa (gammaglobulina), una terapia de reducción de linfocitos (*por ejemplo*, la mitoxantrona, la ciclofosfamida, los anticuerpos CAMPATH™, el anti-CD4 y la cladribina), un polipéptido construido con al menos dos dominios que comprendan un antígeno desinmunizado y autorreactivo o su fragmento reconocido específicamente por los receptores Ig de las células B autorreactivas (documento WO 2003/68822), la irradiación total del cuerpo, el trasplante de médula ósea, un antagonista o anticuerpo de la integrina (*por ejemplo*, un anticuerpo LFA-1 como el efalizumab (RAPTIVA®), comercializado por Genentech, o un anticuerpo de la integrina 4 alfa como el natalizumab (ANTEGREN®), comercializado por Biogen Idec, u otros indicados anteriormente), un esteroide como los corticosteroides (*por ejemplo*, la metilprednisolona como el succinato sódico de metilprednisolona SOLU-MEDROL™ para inyección, la prednisona como la prednisona en dosis bajas, la dexametasona o los glucocorticoides, incluyendo la terapia sistémica con corticosteroides), una terapia inmunosupresora sin reducción de linfocitos (*por ejemplo*, MMF o ciclosporina), un medicamento reductor de colesterol de la clase “estatina” (que incluye cerivastatina (BAYCOL™), fluvastatina (LESCOL™), atorvastatina (LIPITOR™), lovastatina (MEVACOR™), pravastatina (PRAVACHOL™) y simvastatina (ZOCOR™)), el estradiol, la testosterona (opcionalmente en dosis elevadas; Stuve y col. *Neurology* 8:290–301 (2002)), un andrógeno, la terapia de sustitución de hormonas, un inhibidor del TNF como el etanercept (ENBREL®), el infliximab (REMICADE®) y el adalimumab (HUMIRA™), un medicamento antirreumático modificador de enfermedades (DMARD), un medicamento antiinflamatorio no esteroide (NSAID), la plasmaféresis o intercambio de plasma, la trimetoprima-sulfametoxazola (BACTRIM™, SEPTRA™), el micofenolato mofetil, los bloqueadores de H2 o los inhibidores de la bomba de protones (durante el uso de la terapia inmunosupresora potencialmente ulcerogénica), la levotiroxina, la ciclosporina A (*por ejemplo*, SANDIMMUNE®), un análogo de la somatastatina, la citoquina, la citoquina o un anticuerpo o antagonista receptor de citoquina, un antimetabolito, la cirugía rehabilitativa o colectomía, la radioyodina, la tiroidectomía, un antagonista del BAFF como los anticuerpos o las inmunoadhesinas del BAFF o el BR3, un receptor anti-CD40 o un ligando anti-CD40 (CD154), un antagonista o anticuerpo receptor anti-IL-6, un anticuerpo anti-IL-2 como el daclizumab, otro antagonista o anticuerpo de la superficie de células B como un anticuerpo humanizado 2H7 u otro anticuerpo humanizado o humano del CD20 con

rituximab, los corticosteroides orales (*por ejemplo*, dentro de los 2 años anteriores al tratamiento inicial con el anticuerpo o antagonista del CD20), la prednisona (*por ejemplo*, una dosis equivalente de prednisona de 20 mg/día durante al menos 2 semanas), el etanercept, el infliximab, el adalimumab, el aminosalicilato (*por ejemplo*, dosis estable durante ≥ 3 semanas), los corticosteroides orales (*por ejemplo*, dosis estable durante ≥ 2 semanas), el 6-MP (*por ejemplo*, tratamiento durante un período de 3 meses, con una dosis estable durante ≥ 4 semanas), la azatioprina (*por ejemplo*, tratamiento durante un período de 3 meses, con una dosis estable durante ≥ 4 semanas), un inhibidor de la calcineurina, la ciclosporina, el tacrolimus, el sirolimus, el metotrexato, el micofenolato mofetil, una preparación rectal tópica, una terapia no biológica de reducción celular como el ADACOLUMN[®], un antibiótico, un antidiarreico, un agente de unión del ácido bílico como la colestiramina, el 5-ASA oral y/o tópico, un esteroide oral y/o tópico, el MLN-02, la mesalamina, una crema de cortisona, un enema de hidrocortisona, la sulfasalazina, la alsalazina, la balsalazida, la metilprednisolona, la hidrocortisona, el ACTH, los corticosteroides intravenosos, el GELTEX[™] (Genzyme), un anticuerpo anti-CD3 como el visilizumab (NUVION[®]), el OPC-6535, el CBP 1011, la talidomida, el ISIS 2302, el BXT-51072, un factor de crecimiento como el factor de crecimiento-2 de la queratinocita (KGF-2; REPIFERMIN[™]), el RPD-58, el antegrén, el FK-506, etc.

Los segundos medicamentos preferentes incluyen uno, dos, tres o cuatro de: un aminosalicilato, un corticosteroide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) y azatioprina.

En un procedimiento preferente de “terapia de combinación” de la presente memoria descriptiva, la invención proporciona un procedimiento para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto humano con EII activa que consiste en administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo del CD20 y, posteriormente, una cantidad eficaz de un segundo medicamento seleccionado del grupo integrado por un aminosalicilato, un corticosteroide oral, la 6-mercaptopurina (6-MP) y la azatioprina.

Todos estos segundos medicamentos pueden usarse combinándose unos con otros o por sí solos con el primer medicamento, de modo que la expresión “segundo medicamento”, tal como se emplea en la presente memoria descriptiva, no significa que sea el único medicamento además del primero, respectivamente. Por tanto, no es necesario que el segundo medicamento sea un solo medicamento, sino que puede comprender o constar de más de uno.

Estos segundos medicamentos, tal como se establece en la presente memoria descriptiva, se utilizan normalmente con las mismas dosis y vías de administración indicadas anteriormente en la presente memoria descriptiva o aproximadamente entre el 1 y el 99% de las dosis empleadas hasta este momento. Si finalmente se utilizan estos segundos medicamentos, como opción, se usan en cantidades inferiores a las correspondientes en caso de que el primer medicamento no estuviese presente,

especialmente en dosis posteriores a la dosis inicial del primer medicamento a fin de eliminar o reducir los efectos secundarios que éste causara. Por ejemplo, la terapia con un anticuerpo del CD20 permite de acuerdo con la presente memoria descriptiva disminuir o interrumpir la administración de esteroides.

5 La administración combinada incluye en la presente memoria descriptiva la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en que preferentemente existe un período en el cual ambos (o todos los) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

10 En cuanto al procedimiento de segundo tratamiento de la presente memoria descriptiva, donde se administra como segundo medicamento una cantidad eficaz de un conjunto de dosis de un anticuerpo, se puede administrar con cualquier conjunto de dosis, por ejemplo, sólo con uno o más de uno. En una realización, el segundo medicamento se administra con el conjunto inicial de dosis. En otra realización, el segundo medicamento se administra con el conjunto inicial de dosis y el segundo. En otra realización más, el segundo medicamento se administra con todos los conjuntos de dosis.

15 La administración combinada de un segundo medicamento incluye la coadministración (administración concurrente), utilizando formulaciones farmacéuticas separadas o una única, y la administración consecutiva en cualquier orden, en que preferentemente existe un período en el cual ambos (o todos los) agentes activos (medicamentos) ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

20 El anticuerpo o antagonista de la presente memoria descriptiva se administra por cualquier medio apto, incluyendo las vías parenteral, tópica, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal y/o intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa (i.v.), intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La administración intratecal también se contempla (véase, *por ejemplo*, el documento US 2002/0009444, Grillo-López, A., referente a la
25 introducción intratecal de un anticuerpo del CD20). Además, el antagonista o anticuerpo podría administrarse correctamente mediante infusión de efecto rápido, *por ejemplo*, con dosis cada vez menores del anticuerpo o antagonista. Preferentemente, la dosis se administra vía intravenosa o subcutánea y mejor aún mediante infusión(es) intravenosa(s).

30 Si se dispone de múltiples conjuntos de dosis de anticuerpos, cada uno de ellos puede ofrecerse a través del mismo medio de administración o uno distinto. En una realización, cada conjunto de dosis se administra por vía intravenosa. En otra realización, cada conjunto de dosis se administra por vía subcutánea. En otra realización más, los conjuntos de dosis se administran por vía tanto intravenosa como subcutánea, y los anticuerpos pueden ser los mismos o diferentes.

A continuación presentamos una discusión de los procedimientos para producir, modificar y

formular estos antagonistas y anticuerpos.

III. Producción de antagonistas y anticuerpos

Los procedimientos y artículos fabricados de la presente invención utilizan, o incorporan, un antagonista o anticuerpo que se une a un marcador de la superficie de células B. Por consiguiente, aquí describiremos los procedimientos para generar estos antagonistas o anticuerpos.

El marcador de la superficie de células B se que empleará para producir, o examinar, antagonistas o anticuerpos podría ser, *por ejemplo*, una forma soluble del antígeno, o una porción del mismo, que contenga el epítipo deseado. Como alternativa, o adicionalmente, las células que expresan en su superficie un marcador de la superficie de células B se pueden usar para generar, o examinar, antagonistas o anticuerpos. Otras formas del marcador de la superficie de células B útiles para generar antagonistas o anticuerpos serán obvias para los expertos en la materia. Preferentemente, el marcador de la superficie de células B es el antígeno CD20.

Si bien el antagonista preferente es un anticuerpo, en la presente memoria descriptiva también se contemplan otros antagonistas aparte de los anticuerpos. Por ejemplo, el antagonista puede comprender un antagonista de molécula pequeña opcionalmente fusionado, o conjugado, con un agente citotóxico (como los que se describen en la presente memoria descriptiva). Las bibliotecas de moléculas pequeñas se pueden cotejar con el marcador de la superficie de células B de interés en la presente memoria descriptiva a fin de identificar una molécula pequeña que se una a ese antígeno. También es posible seguir examinando aún más las propiedades antagonistas de la molécula pequeña y/o conjugarla con un agente citotóxico.

El antagonista también podría ser un péptido generado por diseño racional o reproducción de imágenes de fago (véase, *por ejemplo*, el documento WO98/35036 publicado el 13 de agosto de 1998). En una realización, la molécula elegida podría ser una "emulación de la CDR" o un análogo del anticuerpo diseñado sobre la base de las CDRs de un anticuerpo. Si bien estos péptidos pueden ser antagonistas por sí mismos, el péptido podría fusionarse opcionalmente con un agente citotóxico a fin de aumentar o mejorar sus propiedades antagonistas.

A continuación se describen ejemplos de las técnicas para producir anticuerpos utilizadas de acuerdo con esta invención.

(i) *Anticuerpos policlonales*

Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunogénica en la especie que se pretende inmunizar, *por ejemplo*, la hemocianina de la lapa californiana (keyhole limpet), la albúmina sérica, la tiroglobulina bovina o un inhibidor de la tripsina de la soja utilizando un agente bifuncional o derivativo, *por ejemplo*, el éster de maleimidobenzol sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), la N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), el glutaraldehído, el anhídrido succínico, el SOCl_2 o el $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, los conjugados inmunogénicos o los derivados combinando, *por ejemplo*, 100 ó 5 μg de la proteína o el conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con tres volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución en múltiples puntos vía intradérmica. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con entre 1/5 y 1/10 de la cantidad original del péptido o el conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples puntos. Entre siete y catorce días más tarde, los animales se desangran, y el suero se analiza para titular los anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta obtener los niveles adecuados de titulación. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo reticulante diferente. Los conjugados también se pueden obtener en cultivos celulares recombinantes como fusiones proteínicas. También, los agentes agregantes como el alumbre se utilizan adecuadamente para incrementar la respuesta inmune.

(ii) *Anticuerpos monoclonales*

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir*, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos excepto en posibles mutaciones de formación natural que podrían estar presentes en cantidades insignificantes. Por tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo de que no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez en Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o los procedimientos del ADN recombinante (patente de EE.UU. n° 4.816.567).

En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal anfitrión apropiado, como un hámster, se inmuniza como se describió anteriormente para obtener linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Después, los linfocitos se

fusionan con las células de mieloma utilizando un agente fusionador adecuado, como por ejemplo glicol de polietileno, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células parentales de mieloma sin fusionar. Por ejemplo, si las células parentales de mieloma no poseen el enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

Las células de mieloma preferentes son aquéllas que se fusionan eficazmente, soportan altos niveles estables de producción de anticuerpos por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio como el HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferentes son líneas de mieloma murino, como las derivadas de los tumores de ratones MOPC-21 y MPC-11 disponibles a través del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles a través de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma murino-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984) y Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en que las células de hibridoma crecen se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma está determinada por la inmunoprecipitación o un ensayo de unión *in vitro*, como el ensayo de radioinmunidad (RIA) o el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis Scatchard de Munson y col., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de identificar que las células de hibridoma producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y pueden crecer mediante procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, un medio D-MEM o un RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *en vivo* en un animal como tumores con ascitis.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, los fluidos ascíticos o el suero mediante procedimientos convencionales de

purificación de inmunoglobulinas, como por ejemplo, la proteína-A-sefarosa, la cromatografía de hidroxilapatita, la electroforesis en gel, la diálisis o la cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse a través de la recombinación. Se aísla el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (*por ejemplo*, usando sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan en células anfitrión, como por ejemplo las células *E. coli*, las células COS de monos, las células de ovario de hámster chino (CHO) o las células de mieloma que, de otro modo, no producen la proteína de la inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células anfitrión recombinantes. En Skerra *et al. Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992) hay artículos sobre la expresión recombinante en las bacterias del ADN que codifica el anticuerpo.

En otra forma de realización, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de librerías de fagos de anticuerpos generados mediante las técnicas descritas en McCafferty *y col.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). En Clackson *y col.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *y col.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) se describe el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando librerías de fagos. En publicaciones posteriores también se describe la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) mediante la transposición de la cadena (Marks *y col.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *en vivo* como estrategias para elaborar bibliotecas de fagos muy amplias (Waterhouse *y col.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para aislar a éstos.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación de los dominios humanos constantes de las cadenas pesada y ligera en el lugar de sus secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. nº 4.816.567; Morrison, *y col.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o uniendo de forma covalente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido que no sea inmunoglobulina.

Típicamente, dichos polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o los dominios variables de un punto de combinación con el antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un punto de combinación con el antígeno con especificidad para un antígeno y otro punto de combinación con el antígeno con especificidad para otro antígeno diferente.

(iii) *Anticuerpos humanizados*

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la materia. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se conocen a menudo como residuos “importados”, que generalmente se toman de un dominio variable de “importación”. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y sus colaboradores (Jones *y col.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *y col.*, *Nature*, 332:323-327 (1988) y Verhoeven *y col.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. n° 4.816.567) en que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR se sustituyen por residuos de puntos análogos de anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para realizar los anticuerpos humanizados es muy importante para disminuir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento llamado “la más apta”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de un roedor se coteja con toda la librería de secuencias conocidas de dominios variables humanos. La secuencia humana más parecida a la de los roedores se acepta entonces como la región de estructura humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *y col.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *y col.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro procedimiento utiliza una región de estructura concreta derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma estructura se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados (Carter *y col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *y col.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Es importante también que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad con el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, siguiendo el procedimiento preferente, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales que utilizan modelos tridimensionales de las secuencias parentales y las humanizadas. Los modelos tridimensionales de la inmunoglobulina están comúnmente disponibles, y los expertos en la materia los conocen de sobra. Existen programas informáticos que ilustran y muestran las estructuras probables de conformación tridimensional de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite analizar el papel que los residuos probablemente desempeñan en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, *es decir*, el análisis de los residuos que

influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de la FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación y lograr así la característica deseada del anticuerpo, como por ejemplo una mayor afinidad con el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable influyen directamente y en mayor medida en la unión al antígeno.

(iv) *Anticuerpos humanos*

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, actualmente es posible producir animales transgénicos (*por ejemplo*, ratones) que sean capaces, una vez inmunizados, de generar un repertorio completo de anticuerpos humanos cuando no se produzca inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región (J_H) del anticuerpo que se une a la cadena pesada en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal inhibe por completo la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz de genes humanos de la inmunoglobulina de línea germinal a uno de estos ratones mutantes de línea germinal ocasionará la producción de anticuerpos humanos al actuar sobre el antígeno. Véase, *por ejemplo*, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993) y las patentes de EE.UU. n^{os} 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807. Alternativamente, la tecnología de reproducción de imágenes de fagos (McCafferty y col., *Nature* 348:552-553 (1990)) se puede utilizar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominios variables (V) de la inmunoglobulina de donantes sin inmunizar. De acuerdo con esta técnica, los genes de los dominios V de los anticuerpos se clonan dentro de la estructura en un gen proteínico de revestimiento o bien mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, como el M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de una sola fila del genoma del fago, las selecciones que se basan en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago emula algunas de las propiedades de la célula B. La reproducción de imágenes de fagos se puede realizar en diversos formatos; para su reseña consulte, *por ejemplo*, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos del gen V para la reproducción de imágenes de fagos. En Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) se habla del aislamiento de una matriz diversa de anticuerpos anti-oxazolona pertenecientes a una pequeña librería de combinación aleatoria de genes V derivados del bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados, y se pueden aislar anticuerpos contra una matriz diversa de antígenos (incluidos los autoantígenos) siguiendo

esencialmente las técnicas descritas por Marks *y col.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) o Griffith *y col.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Véanse, también, las patentes de EE.UU. n^{os} 5.565.332 y 5.573.905.

Los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante células B activadas *in vitro* (véanse las patentes de EE.UU. n^{os} 5.567.610 y 5.229.275).

(v) *Fragmentos de anticuerpos*

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, *por ejemplo*, Morimoto *y col.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan *y col.*, *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente mediante células anfitrión recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las librerías de fagos de anticuerpos descritas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y emparejarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *y col.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otro planteamiento, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente de cultivos de células anfitrión recombinantes. Otras técnicas para producir fragmentos de anticuerpos serán obvias para los profesionales expertos. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena simple (scFv). Véase el documento WO 93/16185 y las patentes de EE.UU. n^{os} 5.571.894 y 5.587.458. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", *por ejemplo*, tal y como se describe en la patente de EE.UU. n^o 5.641.870. Estos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) *Anticuerpos biespecíficos*

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión con al menos dos epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítomos diferentes del marcador de la superficie de células B. Otros de estos anticuerpos se pueden unir a un primer marcador de la superficie de células B y después a un segundo. Como alternativa, un brazo de unión anti-marcador de células B se puede combinar con un brazo que se una a una molécula activadora de un leucocito, como *por ejemplo* una molécula receptora de células T (*por ejemplo*, la CD2 o la CD3) o los receptores Fc para IgG (FcγR), como *por ejemplo* el FcγRI (CD64), el FcγRII (CD32) y el FcγRIII (CD16), para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula B. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos de la células B. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al marcador de la célula B y un brazo que se une al agente citotóxico (*por ejemplo*, saporina, anti-interferón-α, alcaloide de la vinca, cadena A de ricino, metotrexato o hapteno con un isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar

como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la materia. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en que las dos cadenas tienen distintas especificidades (Millstein *y col.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complicada, y la cantidad de producto que se obtiene es baja. En el documento WO 93/08829 y Traunecker *y col.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991), se desvelan procedimientos similares.

Según un planteamiento distinto, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (puntos de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a las secuencias de los dominios constantes de la inmunoglobulina. La fusión se lleva a cabo preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra CH2 y CH3. Preferentemente, la primera región constante de la cadena pesada (CH1) debe contener el punto necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina, y, si se desea, de la cadena ligera también, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan a un organismo anfitrión adecuado. Esto ofrece una gran flexibilidad a la hora de ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones donde los índices desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizadas en la construcción proporcionan las producciones óptimas. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación de dos o todas tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en índices iguales da como resultado producciones elevadas o los índices no tienen particular importancia.

En una realización preferente de este planteamiento, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una de las mitades de la molécula biespecífica proporciona una forma sencilla de separación. Este planteamiento se desvela en el documento WO 94/04690. Para obtener mayores detalles sobre la generación de anticuerpos

biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *y col.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Según otro planteamiento descrito en la patente de EE.UU. n° 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos se puede modificar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo celular recombinante. La interfaz preferente comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante del anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales cortas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula del anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más largas (*por ejemplo*, tirosina o triptófano). Las “cavidades” compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) larga(s) se crean en la interfaz de la segunda molécula del anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales largas de aminoácidos por cadenas más cortas (*por ejemplo*, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar la producción del heterodímero con relación a otros productos finales no deseados como los homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o “heteroconjugados”. Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede emparejar con la avidina, el otro con la biotina. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para conseguir que las células del sistema inmunitario actúen sobre células no deseadas (patente de EE.UU. n° 4.676.980) y para el tratamiento de la infección de VIH (documentos WO 91/00360 y WO 92/200373 y la patente europea EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden obtener utilizando cualquier procedimiento de reticulación oportuno. Los agentes reticulantes adecuados se conocen bien en la materia y se desvelan en la patente de EE.UU. n° 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar mediante un enlace químico. En Brennan *y col.*, *Science*, 229: 81 (1985) se describe un procedimiento en que los anticuerpos intactos se escinden por vía proteolítica para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia de arsenito de sodio del agente que forma complejos con el ditiol para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados del tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados del Fab'-TNB se reconvierte entonces en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de otro derivado del Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden emparejar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. En Shalaby *y col.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) se describe la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo

biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a un emparejamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera fue capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito varias técnicas para realizar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148 (5):1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para producir los homodímeros del anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios V_L y V_H de otro fragmento, formando, por tanto, dos puntos de unión al antígeno. También se ha informado de otra estrategia para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

También se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

IV. Conjugados y otras modificaciones del antagonista o anticuerpo

El antagonista o anticuerpo usado en los procedimientos o incluido en los artículos fabricados en la presente memoria descriptiva se conjuga opcionalmente con otro agente, como un agente citotóxico o una citoquina (por ejemplo, IL2; véase, por ejemplo, el documento WO2005/016969).

La conjugación se conseguirá habitualmente a través de un enlace covalente, la naturaleza precisa del cual vendrá determinada por la molécula agente y el punto de enlace en el polipéptido del antagonista o anticuerpo del CD20. Por lo general, un agente no peptídico se modifica mediante la adición de un enlazador que permite la conjugación con el antagonista o anticuerpo del CD20 a través de sus cadenas laterales de aminoácidos, cadenas de carbohidratos o agrupaciones reactivas introducidas en el antagonista o anticuerpo del CD20 por modificación química. Por ejemplo, se puede

anexar un medicamento a través del grupo ϵ -amino de un residuo de lisina o un grupo α -amino libre, intercambiando un disulfuro por un residuo de cisteína o por oxidación de los dioles 1,2- en una cadena de carbohidratos con ácido periódico para permitir la anexión de un medicamento que contenga varios nucleófilos a través de un enlace de base Schiff. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.256.833. Los agentes modificadores de proteínas incluyen los reactivos de aminos (*por ejemplo*, los ésteres, los isotiociantatos, los aldehídos y los halidos de sulfonil), los reactivos del tiol (*por ejemplo*, los derivados del haloacetil y las maleimidas) y los reactivos del ácido carboxílico y los aldehídos. Los polipéptidos del antagonista o anticuerpo del CD20 pueden unirse de forma covalente a agentes peptídicos a través de reactivos reticulares bifuncionales. Los reactivos heterobifuncionales se utilizan más comúnmente y permiten el emparejamiento controlado de dos proteínas distintas a través de dos porciones de reactivos diferentes (*por ejemplo*, un reactivo de aminos más tiol, yodoacetamida o maleimida). El uso de estos agentes de enlace se conoce bien en la material. Véase, por ejemplo, Brinkley, *supra*, y la patente de EE.UU. n° 4.671.958. También pueden emplearse enlazadores peptídicos. Como alternativa, un polipéptido de un antagonista o anticuerpo del CD20 puede enlazarse con una porción peptídica a través de la preparación de un polipéptido de fusión.

Ejemplos de otros agentes de emparejamiento con proteínas bifuncionales serían el N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), el succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, el iminotiolano (IT), los derivados bifuncionales de los imidoésteres (como el dimetil adipimidato HCL), los ésteres activos (como el disuccinimidil suberato), los aldehídos (como los glutaraldehídos), los compuestos de bis-azido (como la bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), los derivados de bis-diazonio (como la bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), los diisocianatos (como el 2,6-diisocianato de tolueno) y los compuestos bis-activos de flúor (como el 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno).

Alternativamente, se puede realizar una proteína de fusión que contenga el antagonista o anticuerpo y el agente, *por ejemplo*, mediante técnicas de recombinación o síntesis de péptidos.

En la presente memoria descriptiva también se contemplan otras modificaciones del antagonista o anticuerpo. Por ejemplo, el antagonista o anticuerpo se puede enlazar con uno de varios polímeros no proteínicos, *por ejemplo*, el polietilenglicol, el polipropilenglicol, los polioxialquilenos o los copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol.

El antagonista o anticuerpo desvelado en la presente memoria descriptiva también se puede formular como liposoma. Los liposomas que contienen el antagonista o anticuerpo se preparan mediante procedimiento bien conocidos en la materia, como los descritos en Epstein y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); las patentes de EE.UU. n°s 4.485.045 y 4.544.545 y el documento WO97/38731 publicado el 23 de

octubre de 1997. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se desvelan en la patente de EE.UU. n° 5.013.556.

Los liposomas particularmente útiles se pueden generar mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprenda fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' de un anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas tal como se describe en Martin y col., *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente, el liposoma puede contener un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon y col., *J. National Cancer Inst.* 81 (19):1484 (1989).

Se contempla(n) también la(s) modificación(es) en las secuencias de aminoácidos de los antagonistas o anticuerpos de proteínas o péptidos descritos en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, podría ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del antagonista o anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del antagonista o anticuerpo se pueden preparar introduciendo cambios nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del antagonista o anticuerpo, o mediante síntesis del péptido. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del antagonista o anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que ésta posea las características deseadas. Los cambios en los aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del antagonista o anticuerpo, como por ejemplo cambiar el número o la posición de los puntos de glicosilación.

Un procedimiento útil para identificar ciertos residuos o regiones del antagonista o anticuerpo que son ubicaciones preferentes para la mutagénesis se llama "mutagénesis de barrido de alanina" tal como se describe en Cunningham y Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989). Aquí, se identifica un residuo o grupo de residuos de dianas (por ejemplo, residuos cargados como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido con carga negativa o neutral (preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Estas ubicaciones de los aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces introduciendo más u otras variantes en, o para, los puntos de sustitución. Por tanto, a pesar de que el sitio donde introducir una variación de una secuencia de aminoácidos esté predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación *per se* tenga un carácter predeterminado. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un punto en particular, se realiza el barrido de alanina o la mutagénesis aleatoria en el codón o región diana, y se examina si las variantes expresadas del antagonista o anticuerpo desarrollan

la actividad deseada.

Las inserciones en las secuencia de aminoácidos incluyen fusiones en los extremos amino y/o carboxi terminal que varían en longitud desde un simple residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones dentro de la secuencia de uno o múltiples residuos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales serían un antagonista o anticuerpo con un residuo metionil en el extremo N-terminal o el antagonista o anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula del antagonista o anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N- o C-terminal del antagonista o anticuerpo de un enzima o un polipéptido que aumente la vida media sérica del antagonista o anticuerpo.

Otra clase de variante es una variante de sustitución de un aminoácido. En estas variantes, al menos un residuo de aminoácidos de la molécula del antagonista o anticuerpo se sustituye por un residuo diferente. Los puntos de mayor interés para la mutagénesis por sustitución de los antagonistas anticuerpos incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones en las FRs. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 4 bajo el encabezado “sustituciones preferentes”. Si dichas sustituciones ocasionan un cambio en la actividad biológica, entonces los productos se pueden examinar, y se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados “sustituciones ejemplares” en la Tabla 4, o como se describe con más detalle a continuación con referencia a las clases de aminoácidos.

Tabla 4

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferentes
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	Ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg

Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; Ile; Val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del antagonista o anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la columna del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación plana o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el punto diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los residuos que aparecen de forma natural se dividen en grupos sobre la base de las propiedades comunes de sus cadenas laterales:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutrales: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no implicado en mantener la conformación adecuada del antagonista o anticuerpo también se puede sustituir, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar reticulaciones aberrantes. A la inversa, la(s) unión(es) de cisteína se puede(n) agregar al antagonista o anticuerpo para mejorar su estabilidad (en particular, donde el antagonista o anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo, como un Fv).

Una clase particularmente preferente de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de las regiones hipervariables de un anticuerpo parental. Por lo general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para profundizar en su desarrollo tendrá(n) propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo parental desde el cual se generó (generaron). Una manera práctica de generar dichas variantes de sustitución es la maduración de afinidad mediante la representación de imágenes de fagos. De manera resumida, varios sitios de regiones hipervariables (*por ejemplo*, los sitios 6-7) se mutan para generar todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada punto. Las variantes del anticuerpo generadas de este modo se presentan de forma monovalente, a partir de partículas de fagos filamentosos, como fusiones con el producto del gen III de M13 que hay dentro de cada partícula. Las variantes representadas en fagos se examinan entonces para detectar su actividad biológica (*por ejemplo*, afinidad de unión) tal como se desvela en la presente memoria descriptiva. A fin de identificar los puntos de la región hipervariable válidos como candidatos para la modificación, se puede realizar una mutagénesis con barrido de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y los residuos adyacentes son candidatos a la sustitución de acuerdo con las técnicas explicadas en la presente memoria descriptiva. Una vez generadas dichas variantes, el panel de variantes está sujeto a examen tal como se describe en la presente memoria descriptiva, y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes se pueden seleccionar para profundizar en su desarrollo.

Otra clase de variante de aminoácido del antagonista o anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del antagonista o anticuerpo. Alterar significa eliminar una o más porciones de carbohidratos encontradas en el antagonista o anticuerpo y/o añadir uno o más puntos de glicosilación que no están presentes en el antagonista o anticuerpo.

La glicosilación de los polipéptidos se realiza generalmente por enlace N u O. El enlace N se refiere a la anexión de la porción de carbohidratos a la cadena lateral de un residuo de esparraguina. Las secuencias de tripéptidos esparraguina-X-serina y esparraguina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento para la anexión enzimática de la

porción de carbohidratos a la cadena lateral de la esparraguina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un punto de glicosilación potencial. La glicosilación por enlace O se refiere a la anexión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, a pesar de que también se puede utilizar 5-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina.

La adición de puntos de glicosilación al antagonista o anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia del aminoácido para que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para puntos de glicosilación unidos por enlace N). La alteración también se puede realizar añadiendo, o sustituyendo, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del antagonista o anticuerpo original (para puntos de glicosilación unidos por enlace O).

Cuando el antagonista o anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato anexo al mismo se puede alterar. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidratos madura que no tienen fucosa anexa a una de sus regiones Fc se describen en la solicitud de patente de EE.UU. n° 2003/0157108 A1, Presta, L. Véase también el documento US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectriz en el carbohidrato anexo a una región Fc del anticuerpo se mencionan en el documento WO03/011878, Jean-Mairet *y col.* y la patente de EE.UU. n° 6.602.684, Umana *y col.* Los anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido anexo a una región Fc del anticuerpo se describen en el documento WO97/30087, Patel *y col.* Véanse, también, los documentos WO98/58964 (Raju, S.) y WO99/22764 (Raju, S.) relativos a los anticuerpos con carbohidratos alterados anexos a sus regiones Fc.

En la presente memoria descriptiva, la variante de glicosilación preferente comprende una región Fc, en que una estructura de carbohidratos anexa a la región Fc carece de fucosa. Estas variantes han mejorado la función de la ADCC. Opcionalmente, la región Fc también comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la zona que mejorar aún más la ADCC; por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de residuos). Entre las publicaciones relacionadas con los anticuerpos “defucosilados” o “con déficit de fucosa” podríamos citar: la solicitud de patente de EE.UU. n° US 2003/0157108 A1, Presta, L; el documento WO 00/61739A1; el documento WO01/29246A1; el documento US2003/0115614A1; el documento US2002/0164328A1; el documento US2004/0093621A1; el documento US2004/0132140A1; el documento US2004/0110704A1; el documento US2004/0110282A1; el documento US2004/0109865A1; el documento WO03/085119A1; el documento WO03/084570A1; Okazaki *y col.*, *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004) y Yamane-Ohnuki *y col.*, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Entre los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos defucosilados encontraríamos las células Lec13 CHO con déficit de fucosilación de proteínas (Ripka *y col.*, *Arch. Biochem. Biophys.*

249:533-545 (1986); la solicitud de patente de EE.UU. n° US 2003/0157108 A1, Presta, L y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *y col.*, especialmente el ejemplo 11) y las líneas celulares bloqueadas, como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, el *FUT8* y células CHO bloqueadas (Yamane-Ohnuki *y col.*, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

5 Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las variantes de las secuencias de aminoácidos del antagonista o anticuerpo se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitarse a, el aislamiento desde una fuente natural (en el caso de variantes de las secuencias de aminoácidos que aparezcan de forma natural) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al punto), la
10 mutagénesis dirigida mediante PCR y la mutagénesis por inserción de un casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del antagonista o anticuerpo.

Podría ser deseable modificar el antagonista o anticuerpo de la invención con relación a la función efectora, *por ejemplo*, para incrementar la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complementos (CDC) del antagonista o
15 anticuerpo. Esto se puede lograr introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc de un antagonista o anticuerpo. De manera alternativa, o adicionalmente, se pueden introducir uno o más residuos de cisteína en la región Fc, lo que permite la formación de un enlace de disulfuro entre las cadenas de esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener mayor capacidad de internalización y/o un nivel más elevado de muerte celular mediada por complementos y
20 citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Véase Caron *y col.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral mejorada también se pueden preparar utilizando reticuladores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff *y col.*, *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). De manera alternativa, se puede diseñar un anticuerpo con dobles regiones Fc y, por tanto,
25 potenciar la lisis de los complementos y las capacidades de la ADCC. Véase Stevenson *y col.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

En el documento WO00/42072 (Presta, L.) se describen los anticuerpos con función de ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, comprendiendo dichos anticuerpos las sustituciones de los aminoácidos en la región Fc de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo con
30 ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de residuos). Preferentemente, la región Fc alterada es una región Fc IgG1 humana que comprende o consiste en sustituciones en una, dos o tres de estas posiciones. Opcionalmente, estas sustituciones se combinan con otra(s) sustitución(es) que incrementa(n) la unión al C1q y/o la CDC.

Los anticuerpos con unión alterada al C1q y/o citotoxicidad dependiente de complementos (CDC) se describen en el documento WO99/51642 y las patentes de EE.UU. n°s 6.194.551B1, 6.242.195B1, 6.528.624B1 y 6.538.124 (Idusogie y col.). Los anticuerpos comprenden una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de sus regiones Fc (numeración Eu de residuos). La sustitución de uno o más residuos en las

A fin de incrementar la vida media sérica del anticuerpo, se le puede incorporar un epítipo de unión a receptor de rescate (especialmente un fragmento del anticuerpo) tal como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.739.277, por ejemplo. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "epítipo de unión a receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (*por ejemplo*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable de incrementar la vida media sérica *en vivo* de la molécula IgG.

Los anticuerpos con una unión mejorada al receptor neonatal Fc (FcRn), y vidas medias mejoradas, se describen en los documentos WO00/42072 (Presta, L.) y US2005/0014934A1 (Hinton y col.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la zona que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Por ejemplo, la región Fc puede tener sustituciones en una o más de las posiciones 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 ó 434 (numeración Eu de residuos). La variante preferente de anticuerpo que comprenda una región Fc con unión mejorada al FcRn comprende sustituciones de aminoácidos en una, dos, o tres de las posiciones 307, 380 y 434 de su región Fc (numeración Eu de residuos).

También se contemplan los anticuerpos diseñados con tres o más (preferentemente cuatro) puntos de unión al antígeno funcional (solicitud de patente de EE.UU. n° US2002/0004587 A1, Miller y col.).

V. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas del antagonista o anticuerpo utilizado de acuerdo con la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando un antagonista o anticuerpo que tenga el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales que sean farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edición, Osol, A. Editores (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones como el fosfato, el citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (como el cloruro amónico de octadecildimetilbenzil; el cloruro de hexametonio; el cloruro de benzalconio; el cloruro de bencetonio; el fenol; el alcohol butílico o

bencílico; los alquil parabenos como por ejemplo el metil o el propil parabeno; el catecol; el resorcinol; el ciclohexanol; el 3-pentanol y el m-cresol); los polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); las proteínas, tales como la albúmina sérica, la gelatina o las inmunoglobulinas; los polímeros hidrófilos como por ejemplo la polivinilpirrolidona; los aminoácidos como por ejemplo la glicina, la glutamina, la esparraguina, la histidina, la arginina o la lisina; los monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, la manosa o las dextrinas; agentes quelantes como por ejemplo el EDTA; los azúcares como por ejemplo la sacarosa, el manitol, la trehalosa o el sorbitol; los contraiones que forman sales como por ejemplo el sodio; los complejos metálicos (*por ejemplo*, los complejos de proteína Zn) y/o los tensoactivos no iónicos como por ejemplo TWEEN™, PLURONICS™ o el polietilenglicol (PEG).

Las formulaciones ejemplares del anticuerpo anti-CD20 se describen en el documento WO 1998/56418. En esta publicación se describe una formulación líquida de múltiples dosis que comprende 40 mg/ml de rituximab, 25 mM de acetato, 150 mM de trehalosa, 0,9% de alcohol bencílico, 0,02% de polisorbato 20 con un pH de 5,0 y una caducidad mínima de dos años en almacenamiento a 2-8 °C. Otra formulación del anticuerpo anti-CD20 de interés comprende 10 mg/ml de rituximab en 9,0 mg/ml de cloruro sódico, 7,35 mg/ml de citrato sódico dihidratado, 0,7 mg/ml de polisorbato 80 y agua estéril para inyecciones con pH 6,5.

Las formulaciones liofilizadas adaptadas para la administración subcutánea se describen en la patente de EE.UU. n° 6.267.958 (Andya *y col.*). Estas formulaciones liofilizadas pueden reconstituirse con un diluyente adecuado en una alta concentración de proteínas, y la formulación reconstituida se puede administrar por vía subcutánea al sujeto que se trata en la presente memoria descriptiva.

La formulación de la presente memoria descriptiva también puede contener más de un compuesto activo (un segundo medicamento tal como se indicó anteriormente) como fuese necesario, preferentemente aquéllos con actividades complementarias que no tienen efectos adversos entre sí. La clase y las cantidades eficaces de estos medicamentos dependen, por ejemplo, de la cantidad de antagonista o anticuerpo presente en la formulación, y los parámetros clínicos de los sujetos que se están tratando. Los medicamentos preferentes de esta clase se indican a continuación.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de presentación de medicamentos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Oslo, A., Editores, (1980).

Se pueden elaborar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada serían las matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista o anticuerpo, cuyas matrices están en forma de elementos moldeados, *por ejemplo*, películas o microcápsulas. Entre las matrices de liberación sostenida se incluirían los poliésteres, los hidrogeles (por ejemplo, el poli-(2-hidroxietil-metacrilato) o el poli-(vinilalcohol)), los poliláctidos (patente de EE.UU. n° 3.773.919), los copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, el acetato de etilenvinilo no degradable, los copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico como por ejemplo LUPRON DEPOTJ™ (microesferas inyectables compuestas por copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y el ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones para administrar *en vivo* deben ser estériles. Esto se logra filtrando a través de membranas de filtración estériles.

VI. Artículos fabricados

En otra realización de la invención, se proporcionan artículos fabricados que contienen materiales útiles para el tratamiento de una EII descrita anteriormente. En un aspecto, el artículo fabricado comprende (a) un envase con un antagonista (*por ejemplo*, un anticuerpo) que se une a un marcador de la superficie de células B (*por ejemplo*, el CD20), opcionalmente en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y (b) un prospecto con instrucciones para tratar una EII en un sujeto humano.

En todos estos aspectos, el prospecto se incluye en el envase o está asociado al mismo. Entre los envases adecuados se encuentran, por ejemplo, botes, viales, jeringas, *etc.* Los envases pueden estar hechos de diversos materiales como vidrio o plástico. El envase tiene una composición eficaz en el tratamiento de la EII y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón que se puede perforar con una aguja hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es el antagonista o anticuerpo. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se utiliza para tratar a un sujeto humano elegible para el tratamiento, *por ejemplo*, alguien que padezca EII o con predisposición hacia ella, incluyendo la modalidad de EII o CU moderada-grave, con consejos específicos sobre las cantidades y los intervalos de las dosis del antagonista o anticuerpo y cualquier otro medicamento que se suministre. El artículo fabricado también puede comprender un envase adicional que contiene una solución diluyente farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWF1), una solución salina fosfatada, una solución de Ringer y/o una solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidas otras soluciones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Opcionalmente, el artículo fabricado de la presente memoria descriptiva comprende además un envase que contiene un segundo medicamento, en que el anticuerpo es el primer medicamento, así como instrucciones en un prospecto para tratar al sujeto con ese segundo medicamento, en una cantidad eficaz. El segundo medicamento puede ser cualquiera de los mencionados anteriormente, siendo los más relevantes un aminosalicilato, un corticosteroide oral, la 6-mercaptopurina (6-MP) y la azatioprina.

El siguiente ejemplo no limitador proporciona mayores detalles de la invención. Las divulgaciones de todas las citas de las especificaciones del producto están expresamente incorporadas en la presente memoria descriptiva por referencia.

Ejemplo 1

Terapia de la EII

Esto es una evaluación del rituximab en sujetos humanos con CU active tal como se define en los criterios de inclusión. Los datos de la micromatriz de genes han demostrado que los genes de las células B y la expresión del CD20 experimentan una regulación al alza en la CU humana. Este ejemplo ofrece un protocolo para la terapia de los sujetos con CU.

El esquema de estudio de este protocolo se representa en la Figura 4.

En la presente memoria descriptiva, la terapia incluye un período de exploración de unas dos semanas, otro de estudio de alrededor de 24 semanas y un tercero de seguimiento de 24 semanas. A lo largo del estudio, se realizarán rigurosas evaluaciones de la seguridad. El período de exploración desde el día -14 hasta el 0 incluye un historial médico, una revisión médica, una valoración de laboratorio, la recolección diaria de datos y una sigmoidoscopia flexible con biopsias para confirmar la enfermedad activa y determinar el resultado de referencia inicial del índice de actividad de la enfermedad (IAE) El resultado del IAE se utiliza para identificar sujetos potenciales para inscribirse en el estudio y valorar la actividad clínica del rituximab.

Los sujetos recibirán una infusión intravenosa (IV) de 1 gramo de rituximab (o placebo) en los días 1 y 15. Todos los sujetos seguirán con dosis estables de uno o más de los siguientes productos a partir de al menos la semana 8: un aminosalicilato, un corticosteroide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) y/o azatioprina. En todas las visitas del estudio se realizará una supervisión de la seguridad con evaluaciones de las revisiones periódicas físicas y de laboratorio. Tras las visitas de los días 1 y 15, los sujetos tendrán visitas programadas cada 4 semanas hasta la semana 24 y después cada 3 meses hasta la semana 48. Además, los sujetos volverán los días 2 y 16 sólo para una toma de muestras farmacocinéticas (PK). Durante la semana 8 se efectuarán repetidas sigmoidoscopias flexibles con biopsias para su estudio histológico, valorar la evolución de la enfermedad y evaluar la reducción de las células B de la mucosa. En la semana 24 se practicará una sigmoidoscopia adicional con biopsias

para evaluar el estado de la enfermedad y la recuperación de la reducción de células B en la mucosa colónica. La valoración histológica de la inflamación en las muestras de la biopsia se puntuará de acuerdo con una escala estandarizada (Geboes *y col.*, *Gut* 47:404-409 (2000)).

5 Durante la semana 8 se calculará un resultado del IAE para determinar la proporción de sujetos que consiguen la remisión de la enfermedad. El resultado del IAE también se calculará en la visita de la semana 24. Cuando no se efectúe una sigmoidoscopia flexible, se realizará una valoración clínica en las visitas (es decir, los días 1 y 15 y en las semanas 4, 12, 16, 20, 36 y 48). El investigador y el patrocinador realizarán un seguimiento de los sujetos hasta la semana 48 o hasta lograr la recuperación de las células B, lo que más tarde se produzca. La recuperación de las células B se define como los
10 niveles de células B que han vuelto a su valor de referencia inicial (día 1) o el límite más bajo dentro de los parámetros normales.

Este ejemplo ofrece una evaluación de la seguridad y tolerabilidad del rituximab en sujetos adultos con CU activa. La medida primaria del resultado de la seguridad es la frecuencia con que se producen exacerbaciones de la CU definidas en el protocolo (empeoramiento de la enfermedad).

15 La evaluación de las células B proseguirá hasta la semana 48 o hasta lograr recuperarlas, lo que más tarde se produzca.

En este ejemplo también se evalúa la actividad clínica terapéutica del rituximab en la CU mediante el sistema del resultado del IAE tal como se ha definido anteriormente. En diversos estudios clínicos pivotaes, se ha empleado un sistema de resultados del IAE para valorar la actividad de la CU
20 (Schroeder *y col.*, *N Engl J Med* 317:1625-1629 (1987)). Como punto final secundario de la actividad clínica se ha tomado la remisión de las señales y los síntomas de la enfermedad activa, evidenciada por el cese de las hemorragias rectales y la curación de la mucosa friable. La duración de la remisión también se medirá. Los resultados de la sigmoidoscopia flexible y el IAE en la semana 24 y el seguimiento clínico hasta la semana 48 permitirán evaluar la duración del efecto terapéutico.

MEDIDAS DEL RESULTADO

Medida primaria del resultado de la seguridad

5 La medida primaria del resultado de la seguridad es la frecuencia con que se producen exacerbaciones adversas de la CU definidas en el protocolo durante el período del estudio (desde el día 1 hasta la semana 24).

Una exacerbación de la CU definida en el protocolo debe cumplir con uno o más de los siguientes criterios:

- 10
- Un aumento de ≥ 3 puntos en el resultado del IAE
 - Megacolon tóxico inminente o sospechoso
 - Necesidad de hospitalización para un exacerbación de CU
 - Bajo el criterio clínico del investigador, empeoramiento médicamente significativo de la enfermedad

15

Medidas secundarias del resultado

Las medidas secundarias del resultado son las siguientes:

- 20
- Otras medidas del resultado de la seguridad
 - Incidencia de infecciones graves, definidas como infecciones que requieren hospitalización o antibióticos IV
 - Incidencia de todos los eventos adversos (graves y no graves) clasificados de acuerdo con los Criterios de toxicidad común para los eventos adversos del Instituto Nacional del Cáncer (NCI-CTCAE), versión 3.0
 - Incidencia de anormalidades clínicas en las pruebas de laboratorio
- 25
- Proporción de sujetos que consiguen la remisión de la enfermedad en la semana 8
 - La remisión de la enfermedad se define como una sigmoidoscopia que dé 0 ó 1 como resultado (sin friabilidad) y una hemorragia rectal que dé 0 como resultado.
 - Proporción de sujetos que muestran una respuesta clínica en la semana 8
 - La respuesta clínica se define como una reducción de ≥ 3 puntos en el resultado del IAE.
- 30
- Tiempo que la remisión de la enfermedad tarda en manifestarse
 - Duración de la remisión de la enfermedad tal como determine el investigador
 - Cambio respecto a los valores de referencia inicial durante el período del estudio en los resultados del Cuestionario de la enfermedad inflamatoria intestinal (CEII)

165

Se examinarán los efectos del rituximab en diversos marcadores farmacodinámicos comparando los valores de referencia inicial con los exhibidos durante el tratamiento en la sangre, el suero y las muestras tisulares. Estas valoraciones serán las siguientes:

- 5
 - Panel de linfocitos en la sangre con conteo de células B (CD19+ y otros subconjuntos de fenotipos de células B)
 - Niveles Ig del suero (total, IgA, IgG e IgM)
 - Anticuerpos específicos para la CU (p-ANCA)
 - Reducción de células B en las biopsias colónicas, medida sobre una base
- 10
 - inmunohistoquímica (IHC)

SUJETOS

Criterios de inclusión

- 15 Los sujetos deben cumplir los siguientes criterios para ser elegibles a formar parte del estudio:
 - Consentimiento informado por escrito
 - Edad entre 18 y 75 años y capacidad de comprender los procedimientos del estudio
 - Diagnóstico de la CU ≥ 6 meses antes de la exploración
 - ≥ 20 cm de enfermedad activa en la sigmoidoscopia de exploración
- 20
 - Enfermedad activa, definida sobre la base de un resultado del IAE de entre ≥ 6 y ≤ 11 , con ≥ 2 en el caso de la hemorragia rectal y ≥ 2 para la sigmoidoscopia flexible realizada en la exploración.
 - Tratamiento con corticosteroides orales para la CU durante dos años antes de la exploración
 - La intensidad del tratamiento debería haber sido igual o superior a una dosis equivalente de prednisona de 20 mg/día durante al menos dos semanas
- 25
 - Colonoscopia practicada en los dos últimos años para determinar el grado de la enfermedad y descartar la existencia de pólipos
 - Colonoscopia con biopsias apropiadas para descartar una displasia practicada durante el año anterior a la exploración si la enfermedad de la CU es >10 años
- 30
 - Los sujetos con potencial reproductor (hombres y mujeres) deben utilizar un medio de anticoncepción fiable (*por ejemplo*, anticonceptivos hormonales, parches, anillo vaginal, dispositivo intrauterino, barreras físicas) durante el tratamiento del estudio y un año después de haber tomado la última dosis del medicamento del estudio

- Cancelación de todas las terapias biológicas experimentales anteriores (*por ejemplo*, etanercept, infliximab, adalimumab o rituximab) al menos 15 semanas antes de pasar por el proceso de asignación aleatoria de medicamentos
- Tratamiento actual con una o más de las siguientes terapias en dosis estables durante el periodo indicado anterior a la fecha de referencia inicial (día 1):
 - Aminosalicilato, dosis estable durante ≥ 3 semanas
 - Corticosteroides orales, dosis estable durante ≥ 2 semanas
 - Tratamiento con 6-MP durante un periodo de 3 meses, con una dosis estable durante ≥ 4 semanas
 - Tratamiento con azatioprina durante un periodo de 3 meses, con una dosis estable durante ≥ 4 semanas
- Con relación a todas las terapias que se han indicado y se han utilizado anteriormente pero no en la actualidad en el día 1, los sujetos deben haber interrumpido la administración de aminosalicilatos durante ≥ 2 semanas y abandonado los tratamientos con azatioprina, 6-MP o corticosteroides orales durante ≥ 4 semanas antes de la fecha de referencia inicial.

Criterios de exclusión

Los sujetos que cumplan los siguientes criterios no podrán formar parte del estudio:

- Colitis grave que, según el criterio del investigador, probablemente llevará al sujeto a someterse a una colectomía o la administración de un inhibidor de la calcineurina en un plazo de 12 semanas tras la fecha de referencia inicial (día 1)
- Sospecha clínica o prueba radiográfica de perforación colónica o megacolon tóxico
- Historial de colangitis esclerosante primaria
- Historial de displasia colónica y/o pólipos adenomatosos en el colon
- Tratamiento con ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, metotrexato o micofenolato mofetil dentro de las 8 semanas anteriores a la exploración
- Tratamiento con una preparación rectal tópica dentro de las 2 semanas anteriores a la exploración
- Uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) aparte de aspirina en bajas dosis dentro de las 4 semanas anteriores a la fecha de referencia inicial
- Resultados positivos de *Clostridium difficile* en pruebas de huevos o parásitos, patógenos o toxinas en heces en el momento de la exploración

16

- Recepción/tratamiento con cualquier vacuna viva dentro de las 4 semanas anteriores al proceso de asignación aleatoria de medicamentos
- Tratamiento anterior con cualquier terapia no biológica de reducción de células como el ADACOLUMN®
- 5 • Historial de obstrucción o resección del colon o el intestino delgado
- Uso de agentes antidiarreicos durante el período de exploración
- Historial de hepatitis B o C

Exclusiones por seguridad general

10

- Historial de reacciones alérgicas o anafilácticas graves a anticuerpos humanizados, quiméricos o totalmente humanos o anticuerpos murinos monoclonales
- Enfermedad cardíaca o pulmonar significativa (incluyendo la enfermedad pulmonar obstructiva)

15

- Pruebas de significantes enfermedades concomitantes no controladas como las enfermedades cardiovasculares o los trastornos del sistema nervioso, pulmonares, renales, hepáticos, endocrinos o gastrointestinales

20

- Infección bacteriana, vírica, fúngica, micobacteriana o de otra clase, conocida y activa (incluyendo la tuberculosis o la enfermedad micobacteriana atípica, pero excluyendo las infecciones fúngicas en el blanco de las uñas) o cualquier otro episodio de infección importante que requiera hospitalización o tratamiento con antibióticos IV dentro de las cuatro semanas anteriores a la exploración, o dos en el caso de los antibióticos orales

25

- Historial de infección significativa recurrente o infecciones bacterianas recurrentes
- Inmunodeficiencia primaria o secundaria (padecida en el pasado o actualmente activa), incluyendo el VIH

30

- Historial de cáncer, incluyendo tumores sólidos y malignidades hematológicas (excepto los carcinomas de células basales y escamosas de la piel que se hayan extirpado y curado)
- Mujeres embarazadas o madres lactantes
- Historial de consumo de alcohol, drogas o sustancias químicas dentro de los 6 meses anteriores a la exploración
- Falta de acceso venoso periférico

Criterios de exclusión de las pruebas de laboratorio (en la exploración)

- Creatinina en el suero $>1,4$ mg/dL en mujeres o $\geq 1,6$ mg/dL en hombres
- 5 • Límite de aspartato aminotransferasa (AST) o alanina aminotransferasa (ALT)
 $>2,5$ veces superior al normal
- Conteo de plaquetas $<100.000/\mu\text{L}$
- Hemoglobina $<8,5$ gr/dL
- Neutrófilos $<1.500/\mu\text{L}$
- 10 • Conteo de linfocitos $<100/\mu\text{L}$
- Serología positiva de hepatitis B o C
- IgG $<5,65$ mg/mL
- IgM $<0,55$ mg/mL
- Conteo de células B $\leq 1,1\%$
- 15 • Electrocardiograma (ECG) que muestra una anormalidad cardíaca significativa que, a criterio del investigador principal, podría poner en peligro la salud del sujeto si participase en este estudio

TRATAMIENTO DEL ESTUDIO

Formulación

El rituximab se formula para la administración IV como un producto estéril en una solución de 9,0 mg/mL de cloruro sódico, 0,7 mg/mL de polisorbato 80, 7,35 mg/mL de dehidrato de citrato sódico y agua estéril para inyecciones (pH 6,5). El anticuerpo se suministra para su uso comercial en viales de 10 mL y 50 mL con una concentración de 10,0 mg/mL. Los viales de 10 mL contienen 100 mg de anticuerpo. Los viales de 50 mL contienen 500 mg de anticuerpo. No se utiliza conservante alguno porque el vial se ha diseñado para un solo uso. Los centros médicos que colaboren con el estudio recibirán viales de 50 mL con 500 mg de rituximab y viales de 50 mL con una cantidad equivalente de placebo.

Dosificación, administración y almacenamiento

El tratamiento del estudio consistirá en 1 gramo de rituximab o una cantidad equivalente de placebo administrado por vía intravenosa en los días 1 y 15. Los sujetos recibirán un tratamiento profiláctico con acetaminofeno (1 gr) y difenidramina HCl (50 mg), o su equivalente, por vía oral entre

30 y 60 minutos antes del inicio de cada infusión. Los sujetos podrían hospitalizarse para permanecer bajo observación, en particular tras su primera infusión, a criterio del investigador. La administración del rituximab debe supervisarse muy de cerca, teniendo siempre a mano equipos de reanimación completa. Si se produce una exacerbación de la CU definida en el protocolo antes de la segunda infusión, ésta se pospondrá.

Las soluciones de rituximab para infusión se mantienen estables a una temperatura de entre 2 y 8 °C (36 y 46 °F) durante 24 horas y a temperatura ambiente durante 24 horas más. No use el producto pasada la fecha de caducidad impresa en el cartón. No se han observado incompatibilidades entre el rituximab y las bolsas de cloruro de polivinilo o polietileno.

TERAPIAS CONCOMITANTES Y EXCLUIDAS

Antes de la fecha de referencia inicial (día 1), todos los sujetos llevarán un régimen de dosis estables de un aminosalicilato, un corticosteroide oral, 6-MP y/o azatioprina durante períodos variables. A lo largo de todo el estudio y en los períodos de seguimiento, los sujetos deberían mantener su dosis constante de aminosalicilato, 6-MP y/o azatioprina. Las dosis de corticosteroides orales deberían permanecer estables hasta pasada la semana 8, si resulta médicamente aceptable. Transcurrida la semana 8, la dosis debería disminuirse si el médico lo indicase.

Las terapias para enfermedades distintas de la CU pueden proseguir, excepto en los casos que se especifican a continuación. El uso de virus o vacunas de bacteria vivas se prohíbe desde el día -28 hasta el final del período del estudio. Estas vacunas pueden incluir, pero sin limitarse a, el sarampión, las paperas, la rubeola, la polio, el bacilo de Calmette-Guerin, la fiebre amarilla y la fiebre tifoidea TY21a. Las vacunas que no contienen organismos vivos (*por ejemplo*, la gripe, el Pneumovax®, el tétano) no se prohíben pero podrían no ser eficaces. Se recomienda revisar el registro de vacunas del sujeto y los posibles requisitos y, si fuera necesario, administrar cualquier vacuna/dosis de refuerzo al menos 28 días antes de iniciar el tratamiento con el medicamento del estudio.

El tratamiento con ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, metotrexato o micofenolato mofetil se prohíbe dentro de las 8 semanas anteriores a la exploración y durante el estudio. La ciclosporina puede usarse en cualquier formulación según el criterio del investigador como una medicación de rescate para una exacerbación de la CU definida en el protocolo. Si la medicación de rescate es necesaria antes de la semana 8, se considerará que el sujeto no responde al tratamiento, aunque debería continuar con las visitas del estudio programadas.

Otros medicamentos excluidos durante el período del estudio son los siguientes:

- Antibióticos para tratar la CU

Los antibióticos se pueden usar para tratar infecciones según indique el médico pero no como

terapia para una CU.

- Los NSAIDs, con la excepción de aspirina en dosis bajas para profilaxis cardiovascular
- Terapias rectales tópicas para la CU
- Antidiarreicos
- Laxantes
- Agentes de unión del ácido bílico como la colestiramina
- Los medicamentos o tratamientos experimentales están prohibidos

PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO

Se obtendrán muestras de suero para análisis PK y HACA en intervalos de tiempo preestablecidos de acuerdo con la programación de valoración.

El ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) farmacocinética del rituximab se utilizará para medir el nivel de rituximab en las muestras de suero humano.

El HACA ELISA del rituximab es un ensayo puente, en que se utiliza el rituximab como reactivo de captura y el rituximab biotinilado y la estreptavidina-HRP para la detección. En el ensayo se emplea una curva de calibración preparada con anticuerpos de cabra policlonales purificados para mayor afinidad que actúan sobre el rituximab; por tanto, los resultados de este ensayo son relativos para este anticuerpo policlonal en términos de unidades relativas.

Todos los análisis del p-ANCA se efectuarán en un laboratorio central. Se utilizará la inmunofluorescencia indirecta para determinar la presencia de ANCAs. Además, los ensayos de ELISA se pueden usar para determinar la especificidad del ANCA con la mieloperoxidasa u otros antígenos pertinentes tal como decida el laboratorio central.

Análisis de la actividad clínica

Se evaluará la actividad clínica del rituximab en la CU. Se calcularán las proporciones de sujetos que experimenten una remisión de la enfermedad y respuestas clínicas durante la semana 8, y para cada brazo de tratamiento se generarán intervalos correspondientes de un 95% de confianza. Se proporcionarán las diferencias en los tratamientos y los intervalos de un 95% de confianza.

La duración de la remisión de la enfermedad se resumirá para cada brazo de tratamiento. El tiempo medio de la respuesta de la remisión de la enfermedad se resumirá para cada brazo de tratamiento mediante el método Kaplan-Meier sólo para fines descriptivos.

Los sujetos con CU activa tratados con el anticuerpo del rituximab, tal como se ha descrito anteriormente, experimentarán una mejoría en las señales y los síntomas de la CU, incluyendo la remisión de la enfermedad y/o una respuesta clínica (obtenida en la semana 8), la obtención de una

sigmoidoscopia con un resultado de 0 ó 1 y una hemorragia rectal con un resultado de 0, una reducción del resultado del IAE (igual o superior a 3 puntos), una reducción de las células B en la mucosa colónica y/o una reducción del nivel de anticuerpos p-ANCA.

- 5 A partir de todo lo anterior, se apreciará que, aunque las realizaciones específicas de la invención se han descrito en la presente memoria descriptiva para fines ilustrativos, se pueden realizar diversas modificaciones sin desviarse del espíritu y el alcance de la invención. Por consiguiente, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones que se incluyen a continuación.

LAS REIVINDICACIONES SON:

1. Un procedimiento para tratar los casos moderados-graves de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto humano que consiste en administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo del CD20 y cuyo resultado es una respuesta clínica o la remisión de la enfermedad.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en que la EII es una colitis ulcerativa (CU).
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en que la EII es una enfermedad de Crohn.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el sujeto tiene EII activa.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la administración del anticuerpo da como resultado la remisión de la enfermedad.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en que la remisión se consigue alrededor de la semana 8.
7. El procedimiento de la reivindicación 5 o la 6, en que gracias a la administración del anticuerpo se consigue una sigmoidoscopia con un resultado de 0 ó 1 y una hemorragia rectal con un resultado de 0.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la administración del anticuerpo da como resultado una respuesta clínica.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en que la respuesta clínica se consigue alrededor de la semana 8.
10. El procedimiento de la reivindicación 8 o la 9, en que la administración del anticuerpo reduce el resultado del índice de actividad de la enfermedad (IAE).
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en que el resultado del IAE, establecido según el sistema de resultado de la Tabla 2 de la presente memoria descriptiva, se reduce en 3 o más puntos.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la administración del anticuerpo reduce las células B de la mucosa colónica.
13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el anticuerpo es quimérico, humano o humanizado.
14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el anticuerpo comprende rituximab.
15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 13, en que el anticuerpo comprende el 2H7 humanizado.

16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 13, en que el anticuerpo comprende el 2F2 (huMax-CD20).
17. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el anticuerpo es un anticuerpo desnudo.
- 5 18. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 16, en que el anticuerpo se conjuga con otra molécula.
19. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el anticuerpo se administra con una dosis de entre 200 y 2.000 mg y una frecuencia de una a cuatro dosis en un período aproximado de un mes.
- 10 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en que la dosis es entre 500 y 1.500 mg.
21. El procedimiento de la reivindicación 19 o la 20, en que la dosis es entre 750 y 1.200 mg.
22. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones de la 19 a la 21, en que el anticuerpo se administra en una o dos dosis.
23. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones de la 19 a la 22, en que el anticuerpo se
15 administra en un período de entre 2 y 3 semanas.
24. El procedimiento de la reivindicación 23, en que el período es de unas dos semanas.
25. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el anticuerpo se administra por vía intravenosa.
26. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el anticuerpo se
20 administra por vía subcutánea.
27. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que se administra un segundo medicamento en una cantidad eficaz, y el anticuerpo del CD20 es un primer medicamento.
28. El procedimiento de la reivindicación 27, en que el segundo medicamento es más de un
25 medicamento.
29. El procedimiento de la reivindicación 27 o la 28, en que el segundo medicamento se selecciona del grupo integrado por un aminosalicilato, un corticosteroide oral, la 6-mercaptopurina (6-MP) y la azatioprina.
30. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones de la 27 a la 29, en que el segundo
30 medicamento se administra en una cantidad menor que la empleada si el anticuerpo del CD20 no se administra a un sujeto tratado con el segundo medicamento.
31. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el sujeto jamás se ha tratado anteriormente con un anticuerpo del CD20.

32. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el sujeto no padece una malignidad de células B.
33. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el sujeto no padece una enfermedad autoinmune, aparte de la EII.
- 5 34. Un procedimiento para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto humano con EII activa que consiste en administrar al paciente sólo una o dos dosis de un anticuerpo del CD20, obteniendo ya como resultado tras dicha(s) dosis la remisión de la enfermedad o una respuesta clínica.
- 10 35. El procedimiento de la reivindicación 34, en que las dosis, una o dos, se administran por vía intravenosa (IV).
36. El procedimiento de la reivindicación 34, en que las dosis, una o dos, se administran por vía subcutánea (SQ).
37. El procedimiento de la reivindicación 34, en que se administra un par de dosis intravenosas, cada una de ellas de entre 200 y 2.000 mg.
- 15 38. Un procedimiento para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto humano con EII activa que consiste en administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo del CD20 y, posteriormente, un segundo medicamento seleccionado del grupo integrado por un aminosalicilato, un corticosteroide oral, la 6-mercaptopurina (6-MP) y la azatioprina.
- 20 39. Un procedimiento para reducir el resultado del índice de actividad de la enfermedad (IAE) en un sujeto humano con colitis ulcerativa (CU) activa que consiste en administrar al sujeto un anticuerpo del CD20 en una cantidad eficaz para reducir ese resultado del IAE.
40. El procedimiento de la reivindicación 39, en que el resultado del IAE, establecido según el sistema de resultado de la Tabla 2 de la presente memoria descriptiva, se reduce en 3 o más puntos.
- 25 41. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el sujeto presenta un nivel atípico del anticuerpo citoplasmático antineutrófilo perinuclear (p-ANCA) o el autoanticuerpo anti-isoforma 5 humana de la tropomiosina (hTM5).
42. Un artículo fabricado que comprende:
- 30 i. un envase que contiene un anticuerpo del CD20, y
- ii. un prospecto con instrucciones para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto humano que indican la administración de una cantidad eficaz del anticuerpo del CD20.

TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII)

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

- 5 La presente invención se refiere al tratamiento de la EII, especialmente la colitis ulcerativa (CU), con un anticuerpo que se une al CD20.

1H

Alineación de las secuencias de dominios ligeros variables

	FR1 1020	CDR1 3040
2H7	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC	[RASSSVS-YMH] WYQQKP
	* * * *	* * * *
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[RASSSVS-YMH] WYQQKP
		* * * *
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[RASQISNYLA] WYQQKP
	FR2 50	CDR2 60 FR3 7080
2H7	GSSPKPWIY	[APSNLAS] GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEA
	* * *	* * * *
hu2H7.v16	GKAPKPLIY	[APSNLAS] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
	*	* * *
hum κI	GKAPKLLIY	[AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
	CDR3 90	FR4 100
2H7	EDAATYYC	[QQWSFNPPT] FGAGTKLELKR
	*	* * *
hu2H7.v16	EDFATYYC	[QQWSFNPPT] FGQGTKVEIKR
		* * * *
hum κI	EDFATYYC	[QQYNSLPWT] FGQGTKVEIKR

FIGURA 1A

172

Alineación de las secuencias de dominios pesados variables

		FR1		CDR1	
		10	20	30	40
2H7		QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCAS	[GYTFTSYNMH]	WVKQT	
		*** ** *	* * *		* *
hu2H7.v16		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFTSYNMH]	WVRQA	
			* * *		
hum III		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
		FR2	CDR2	FR3	
		50 a 60	70	80	
2H7		PRQGLEWIG	[AIYPGNGDTSYNQKFKG]	KATLTVDKSSSTAYM	
		** *		** ** *	
hu2H7.v16		PGKGLEWVG	[AIYPGNGDTSYNQKFKG]	RFTISVDKSKNTLYL	
		*	* * * * *	* *	
hum III		PGKGLEWVA	[VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNSKNTLTL	
		CDR3	FR4		
		abc 90	100abcde	110	
2H7		QLSSLTSEDSAVYFCAR	[VVYYSNSYWYFDV]	WGTGTTVTVSS	
		** ** *		*	
hu2H7.v16		QMNSLRAEDTAVYYCAR	[VVYYSNSYWYFDV]	WGQGTTLTVSS	
			***** *		
hum III		QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLY---DY]	WGQGTTLTVSS	

FIGURA 1B

17

Alineación de la cadena ligera

	1	32
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAP	
	*****	*****
hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
	52	
hu2H7.v16	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG	
	*****	*****
hu2H7.v511	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG	
	102	
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
	*****	*****
hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
	152	
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
	*****	*****
hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
	202	214
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC	

hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC	

FIGURA 2

1.74

Alineación de la cadena pesada

hu2H7.v16	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGYTFTSYNMHW
hu2H7.v511		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGYTFTSYNMHW
hu2H7.v16	37	52a	82abc
hu2H7.v511			
hu2H7.v16	83	100abcde	113
hu2H7.v511			
hu2H7.v16	118	ASTKGPSVFPLAPS	
hu2H7.v511		ASTKGPSVFPLAPS	
hu2H7.v16	132	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
hu2H7.v511		SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
hu2H7.v16	182	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA	
hu2H7.v511		LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA	
hu2H7.v16	232	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	
hu2H7.v511		PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	
hu2H7.v16	282	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP	
hu2H7.v511		VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAP	
hu2H7.v16	332	IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
hu2H7.v511		IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
hu2H7.v16	382	ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS	CSVMHEA
hu2H7.v511		ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS	CSVMHEA
hu2H7.v16	432	447	
hu2H7.v511			

FIGURA 3

115

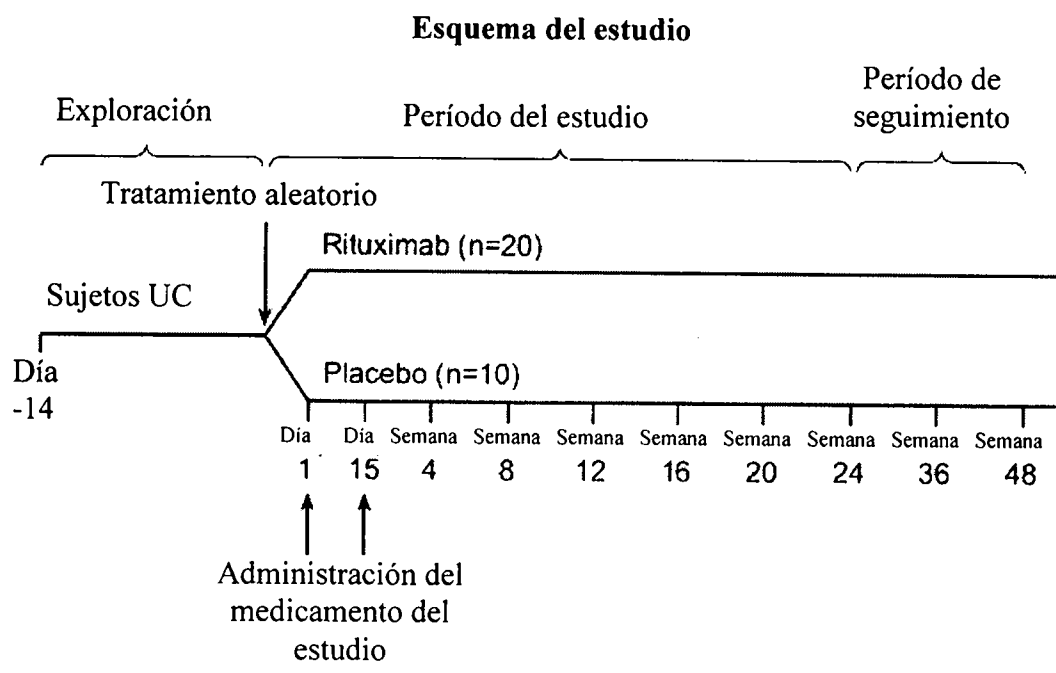


FIGURA 4

177

Listado de secuencias

<110> Gujrathi, Sheila
<120> TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (IBD)
<130> P2211R1
<141> 2006-04-13
<150> US 60/671,902
<151> 2005-04-15

<160> 24

<210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 1
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro
1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro
35 40 45

Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
65 70 75

Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
95 100 105

Lys Arg

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 2
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

177

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser
				20					25					30
Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro
				35					40					45
Leu	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
				50					55					60
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
				65					70					75
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
				80					85					90
Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
				95					100					105

Lys Arg

<210> 3
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 3

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser
				20					25					30
Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
Tyr	Asn	Ser	Leu	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105

Ile Lys Arg

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
5

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser

mm

<210> 8
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60

128

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Thr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu
95 100 105

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 11
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12
Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
5 10

<210> 13
<211> 213
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

781

Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro
				35					40					45
Leu	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
				50					55					60
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
				65					70					75
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
				80					85					90
Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
				95					100					105
Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser
				110					115					120
Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu
				125					130					135
Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp
				140					145					150
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln
				155					160					165
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu
				170					175					180
Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val
				185					190					195
Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg
				200					205					210

Gly Glu Cys

<210> 14

<211> 452

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

<400> 14

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20					25					30

Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45

182

Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	
				50					55					60	
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	
				65					70					75	
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	
				95					100					105	
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	
				110					115					120	
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	
				125					130					135	
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
				140					145					150	
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
				155					160					165	
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				170					175					180	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				185					190					195	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
				200					205					210	
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
				215					220					225	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
				230					235					240	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
				245					250					255	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
				260					265					270	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
				275					280					285	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
				290					295					300	
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
				305					310					315	
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
				320					325					330	

1787

Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
				335					340					345
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
				350					355					360
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
				365					370					375
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
				380					385					390
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				395					400					405
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				410					415					420
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
				425					430					435
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
				440					445					450

Gly Lys

<210> 15
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 15

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser
				20					25					30
Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro
				35					40					45
Leu	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
				50					55					60
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
				65					70					75
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
				80					85					90
Ala	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
				95					100					105

124

Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser
				110					115					120
Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu
				125					130					135
Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp
				140					145					150
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln
				155					160					165
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu
				170					175					180
Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val
				185					190					195
Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg
				200					205					210

Gly Glu Cys

<210> 16
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 16

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20					25					30
Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr
				50					55					60
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Arg
				95					100					105
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
				110					115					120

4, -

Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	125	130	135
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	140	145	150
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	155	160	165
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	170	175	180
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	185	190	195
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	200	205	210
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	215	220	225
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	230	235	240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	245	250	255
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	260	265	270
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	275	280	285
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	290	295	300
Tyr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	305	310	315
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	320	325	330
Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	335	340	345
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	350	355	360
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	365	370	375
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	380	385	390
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	395	400	405

22

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
440 445 450

Gly Lys

<210> 17

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180

mg

Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				185					190					195
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
				200					205					210
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
				215					220					225
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
				230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
				245					250					255
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				260					265					270
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
				275					280					285
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
				290					295					300
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
				305					310					315
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
				320					325					330
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
				335					340					345
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
				350					355					360
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
				365					370					375
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
				380					385					390
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				395					400					405
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				410					415					420
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
				425					430					435
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
				440					445					450
Gly														

Handwritten signature

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 18
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
35 40 45
Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90
Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105
Lys Arg

<210> 19
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 19
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

72

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser

<210> 20
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 20
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180

190

Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				185					190					195
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
				200					205					210
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
				215					220					225
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
				230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
				245					250					255
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				260					265					270
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
				275					280					285
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
				290					295					300
Tyr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
				305					310					315
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
				320					325					330
Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
				335					340					345
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
				350					355					360
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
				365					370					375
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
				380					385					390
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				395					400					405
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				410					415					420
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
				425					430					435
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
				440					445					450

Gly

197

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> Xaa
<222> 9
<223> Xaa es M o L

<400> 21
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Xaa His
 5 10

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> Xaa
<222> 4
<223> Xaa es S o A

<400> 22
Gln Gln Trp Xaa Phe Asn Pro Pro Thr
 5

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> Xaa
<222> 8
<223> Xaa es D o A

<400> 23
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 24
<211> 13
<212> PRT

102

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> Xaa
<222> 6
<223> Xaa es N, A, Y, W o D

<220>
<221> Xaa
<222> 7
<223> Xaa es S o R

<400> 24
Val Val Tyr Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
5 10

IDS Due (30 Day) P2211R1 US - 8 SEP06

Calendared

PCT

19/5 WL

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

GENENTECH, INC.

Attn. Lee, Wendy M.

1 DNA Way MS49

South San Francisco, CA 94080

E-MAIL: lee@genentech.com

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

RECEIVED

AUG 21 2006

GENENTECH, INC.

(PCT Rule 44.1)

Date of receipt
(day/month/year)

09/08/2006

Due Date

Applicant's or agent's file reference

P2211R1

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2006/013780

International filing date

(day/month/year)

13/04/2006

Applicant

GENENTECH, INC.

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.**Where?** Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70**For more detailed instructions,** see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. RemindersShortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Henriëtte Huysing-Solles

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO. 141

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P2211R1	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2006/013780	International filing date (day/month/year) 13/04/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 15/04/2005
Applicant GENENTECH, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

METHOD FOR TREATING INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD) BY AN ANTI-CD20 ANTIBODY

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/395 A61P37/06 A61K31/00
 ADD. C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X.	WO 2004/056312 A (GENENTECH, INC.) 8 July 2004 (2004-07-08) cited in the application page 36, line 33 - line 34 page 37, line 41 claims 41,42	1-38,41, 42
X.	WO 2004/035607 A (GENMAB A/S & MEDAREX, INC.) 29 April 2004 (2004-04-29) cited in the application page 57, line 20 page 59, line 29 claims 73,85	1-38,41, 42
X.	US 6 100 245 A (SOX) 8 August 2000 (2000-08-08) the whole document	39-41
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 July 2006

Date of mailing of the international search report

09/08/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A.	K. PAPADAKIS ET AL.: "Anti-CD20 chimeric monoclonal antibody (rituximab) treatment of immune-mediated thrombocytopenia associated with Crohn's disease." GASTROENTEROLOGY, vol. 124, no. 2, February 2003 (2003-02), page 583, XP002392206 USA last paragraph	1-42
A.	E. MIZOGUCHI ET AL.: "Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease." INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 12, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 97-605, XP002392207 cited in the application abstract	1-42
A.	J. EDWARDS ET AL.: "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 30, no. 4, August 2002 (2002-08), pages 824-828, XP002306250 Colchester, GB cited in the application the whole document	1-42
P,X'	WO 2005/117972 A (GENENTECH INC. ET AL.) 15 December 2005 (2005-12-15) example 3 claims 1,10	1-42
P,X.	WO 2005/060999 A (GENENTECH INC.) 7 July 2005 (2005-07-07) example 3 claims 1,11	1-42

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **1-41 (partially)**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-41 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004056312	A	08-07-2004	AU 2003301079 A1	14-07-2004
			BR 0316779 A	01-11-2005
			CA 2507898 A1	08-07-2004
			EP 1572744 A2	14-09-2005
			HR 20050649 A2	31-12-2005
			MA 27704 A1	02-01-2006
			MX PA05006511 A	17-02-2006
			US 2006024300 A1	02-02-2006
WO 2004035607	A	29-04-2004	AU 2003301445 A1	04-05-2004
			BR 0315295 A	30-08-2005
			CA 2502552 A1	29-04-2004
			EP 1558648 A2	03-08-2005
			JP 2006507844 T	09-03-2006
			MX PA05004022 A	05-10-2005
US 6100245	A	08-08-2000	AT 273013 T	15-08-2004
			BR 0002640 A	12-06-2001
			CA 2311035 A1	07-03-2001
			CN 1286978 A	14-03-2001
			DE 60012836 D1	16-09-2004
			DE 60012836 T2	01-09-2005
			EP 1084706 A2	21-03-2001
			ES 2225027 T3	16-03-2005
			JP 2001106630 A	17-04-2001
			MX PA00005545 A	24-04-2002
WO 2005117972	A	15-12-2005	NONE	
WO 2005060999	A	07-07-2005	AU 2004305560 A1	07-07-2005

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2006/013780

International filing date (day/month/year)
13.04.2006

Priority date (day/month/year)
15.04.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/395 A61P37/06 A61K31/00
ADD. C07K16/28

Applicant
GENENTECH, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaag 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Nooij, F

Telephone No. +31 70 340-3267



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2006/013780

Box No. I Basis of the opinion

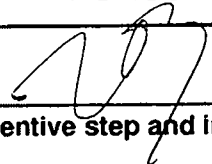
1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☒ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis*.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2006/013780



Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

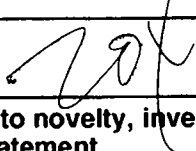
- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 1-41 (partially)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-41 (partially) relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See Supplemental Box for further details



Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	39-42
	No: Claims	1-38
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-42
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	42
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and /or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Present claims **1-41** relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. CITED DOCUMENTS

- D1: WO 2004/056312 A (GENENTECH, INC.) 8 July 2004 (2004-07-08) cited in the application
- D2: WO 2004/035607 A (GENMAB A/S & MEDAREX, INC.) 29 April 2004 (2004-04-29) cited in the application
- D3: K. PAPADAKIS ET AL.: "Anti-CD20 chimeric monoclonal antibody (rituximab) treatment of immune-mediated thrombocytopenia associated with Crohn's disease." GASTROENTEROLOGY, vol. 124, no. 2, February 2003 (2003-02), page 583, XP002392206 USA
- D4: E. MIZOGUCHI ET AL.: "Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease." INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 12, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 97-605, XP002392207 cited in the application
- D5: US 6100245 A (SOX) 8 August 2000 (2000-08-08)

2. NOVELTY (Article 33(2) PCT)

- 2.1 D1 discloses humanized monoclonal antibody (mAb) 2H7. Said mAb is compared with chimeric anti-CD20 mAb rituximab. In vivo tests are disclosed, e.g. for treatment of rheumatoid arthritis. The treatment of inflammatory bowel disease (IBD) is claimed. Administration dosage and regime fall within the claimed range. Azathioprine is

mentioned as a second medicament (*see page 36, lines 33-34; page 37, line 41; page 40, line 30 - page 41, line 20; page 41, lines 10-16 and 21; claims 41 and 42*).

- 2.2 *D2* discloses human mAbs anti-CD20, e.g. HuMax-CD20. Said mAb is compared with rituximab. In vivo tests in SCID mice and monkeys. The treatment of IBD is claimed (*see page 57, line 20; page 59, line 29; claims 73 and 85*).
- 2.3 In view of the disclosures of *D1* and *D2*, and given the fact that example 1 of the present application disclose only the hypothetical treatment of ulcerative colitis, but no actual technical results, no distinction can be made between the prior art and the claimed subject-matter, and, consequently, no novelty can be acknowledged for present claims **1-38**. Hence, the present application does not meet the requirements of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of present claims **1-38** is considered to be not novel in the sense of Article 33(2) PCT.
- 2.4 In view of the prior art, the subject-matter of present claims **39-42** is considered to be novel in the sense of Article 33(2) PCT.

3. INVENTIVE STEP (Article 33(3) PCT)

- 3.1 Should the novelty objections mentioned above (§ 2.6) be overcome by convincing arguments put forward by the applicant, then it should be noted that the claims are considered to be speculative since they lack any technical support in the description (*see item VIII below*). As a consequence, they cannot solve any technical problem and are therefore not involving an inventive step.

Furthermore, doubt has been raised that an anti-CD20 antibody could in fact effectively treat an IBD: *D3* discloses that rituximab may successfully treat immune-mediated thrombocytopenia, which is associated with Crohn's disease (the latter being an IBD). However, the authors clearly suggest that rituximab may be detrimental for the course of Crohn's disease itself for valid reasons given in *D4* (*see the last paragraph*). *D4* discloses that B cells and immunoglobulins (Ig) may decrease the severity of colitis in a mice model. The suppressive role of B cells and Ig is

suggested (*see the abstract*).

Thus, this doubt makes the necessity of sufficient technical support even bigger.

- 3.2 With regard to present claim **39**, *D5* is considered to represent the most relevant prior art and discloses the treatment of ulcerative colitis by simethicone. By using simethicone, the disease activity index (DAI) is reduced.

The subject-matter of present claim **39** differs from this in that the use of a **CD20 antibody** is claimed. The technical effect of said difference is unknown.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of an alternative method to reduce the DAI in subjects suffering from active ulcerative colitis.

Said problem has not been solved by the present invention due to the lack of any technical support. Said claim **39** is purely speculative.

- 3.3 Present claim **42** relates to an article of manufacture. For the person skilled in the art, grouping the materials used for a series of known or obvious experiments in the form of a kit is however not inventive. Thus claim **42** does not meet the requirements of Article 33(3) PCT with regard to inventive step.

- 3.4 In summary, the present application does not meet the requirements of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of present claims **1-42** is considered not to involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

4. INDUSTRIAL APPLICABILITY (Article 33(4) PCT)

For the assessment of the present claims **1-41** on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound

for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item VI

Certain documents cited

Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO2005/117972	15.12.2005	03.05.2005	05.05.2004
WO2005/060999	07.07.2005	07.12.2004	19.12.2003

Re Item VIII

Certain observations on the international application

5. CLARITY AND SUPPORT (Article 6 PCT)

- 5.1 Present claims **1-42** have no technical support in the description. The use of an anti-CD20 antibody for treating an IBD is known in the prior art (se D1 and D2). The present application does not disclose any technical contribution supporting improvement of known treatments or development of further treatments. As a consequence, present claims **1-42** are not considered as supported technically by the description (Article 6 PCT), but on the contrary are considered to be speculative.
- 5.2 Present claims **1, 5-12, 27, 34, 38-40** and **42** do not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The claims attempt to define the subject-matter in terms of the result to be achieved, which merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result.
- 5.3 Present claims **1, 27, 38, 39** and **42** do not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The following

functional statements do not enable the skilled person to determine which technical features are necessary to perform the stated function: 'effective amount' and 'amount effective'.

- 5.4 The term 'moderate-severe' in present claim 1 is vague and unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear (Article 6 PCT).
- 5.5 The term 'CD20 antibody' in present claims 1, 27, 30, 31, 34, 38, 39 and 42 is vague and unclear: CD20 may be interpreted as an internal designation or name of the antibody. This renders the definition of the subject-matter of said claims unclear in the sense of Article 6 PCT. Page 4, lines 3-14 of the description mention the following clear terms: 'anti-CD20 antibody', 'antibody specific to the CD20 surface antigen', 'antibody directed against the CD20 antigen'.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

LEE, Wendy, M.
c/o GENENTECH, INC.
1 Dna Way
MS 49
South San Francisco, CA 94080
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 16 June 2006 (16.06.2006)	
Applicant's or agent's file reference P2211R1	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2006/013780	International filing date (day/month/year) 13 April 2006 (13.04.2006)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 15 April 2005 (15.04.2005)
Applicant GENENTECH, INC. et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
15 April 2005 (15.04.2005)	60/671,902	US	06 June 2006 (06.06.2006)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer Agnes Wittmann-Regis Facsimile No. +41 22 338 89 70 Telephone No. +41 22 338 90 33
---	--



UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office
ASSISTANT SECRETARY AND COMMISSIONER
OF PATENTS AND TRADEMARKS
Washington, D.C. 20231

JULY 23, 2005

PTAS

700184741A

700184741A

WENDY M. LEE
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES DIVISION, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 06/03/2005

REEL/FRAME: 016300/0990
NUMBER OF PAGES: 2

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:
GUJRATHI, SHEILA

DOC DATE: 05/27/2005

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

94080-4990

SERIAL NUMBER: 60671902

FILING DATE: 04/15/2005

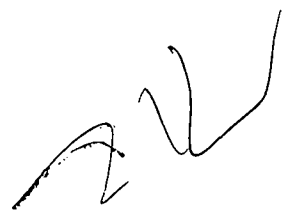
PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)

016300/0990 PAGE 2

SHARON BROOKS, EXAMINER
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

Handwritten signature or initials in the top right corner of the page.

**RECORDATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY**

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Patent and Trademark Office

Any Dis No: PR2211

Commissioner for Patents: Please record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies):

Sheila Gujrathi

Additional name(s) of conveying party(ies) attached? Yes No

3. Nature of conveyance:

2 Assignment

Merger

Security Agreement

Change of Name

Other:

Execution Date: May 27, 2005

2. Name and address of receiving party(ies):

Name: GENENTECH, INC.

Internal Address:

Street Address: 1 DNA Way

City: South San Francisco State: California

ZIP: 94080-4990

Additional name(s) & address(es) attached? Yes ☒ No ☐

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application No.(s)

B. Patent No.(s)

60/671.902

Additional numbers attached? Yes - No

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Wendy M. Lee
GENENTECH, INC.

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080

6. Total number of applications and patents involved: 1

7. Total fee (37 CFR 3.41): \$ 40.00

Enclosed

☒ Authorized to be charged to deposit account

8. Deposit account number:

07-0630

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

Wendy M. Lee
Name of Person Signing
Registration No. 40,378

WM Lee
Signature

June 3, 2005
Date

Total number of pages comprising cover sheet, attachments and document: 3

Revised (10/11/93)

60618000 0990070 UN OPS 117

ASSIGNMENT

WHEREAS, Sheila Gujrathi, a citizen of U.S.A., residing at 682 Clipper Street, San Francisco, CA 94114, U.S.A. (hereinafter "ASSIGNOR"), has invented a new and useful invention in

TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)

for which a provisional application Serial No. 60/671,902 (Docket No. PR2211) has been filed by her on April 15, 2005; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNOR have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNOR covenants and agrees to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNOR includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNOR in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNOR, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNOR hereby warrants and represents that she has not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I undersign as follows;

South San Francisco

Dated: 5/27/05


Sheila Gujrathi

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.005.180 MT/FOP 20060401/0.20.4rc.2.7
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	P2211R1
I	Title of Invention	TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	GENENTECH, INC.
II-5	Address	1 DNA Way MS 49 South San Francisco, California 94080 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	650-225-1000
II-9	Facsimile No.	650-952-9881

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	GUJRATHI, Sheila
III-1-5	Address	682 Clipper Street San Francisco, California 94114 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	LEE, Wendy M.
IV-1-2	Address	c/o GENENTECH, INC. 1 DNA Way MS 49 South San Francisco, California 94080 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	650-225-1994
IV-1-4	Facsimile No.	650-952-9881
IV-1-6	Agent's registration No.	40378
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	ATULYA, Agarwal R.; ANDRUS, Alex; BARNES, Elizabeth M.; CARPENTER, David A.; COBURN, Cara M.; CONLEY, Deirdre L.; CUI, Steven X.; ELLIOTT, Jennifer; EVANS, David; HASAK, Janet E.; JOHNSTON, Sean A.; KALINOWSKI, Grant; KRESNAK, Mark T.; KUBINEC, Jeffrey S.; MARSCHANG, Diane L.; NAIK, Paul; PASQUALONE, Danielle; PLEASURE, Irene; SCHWARTZ, Timothy R.; SHERMAN, Daniel; SHIN, Elinor K.; SVOBODA, Craig G.; TAN, Lee K.; YEUNG, Bonnie

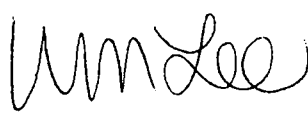
PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

V	DESIGNATIONS		
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.		
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	15 April 2005 (15.04.2005)	
VI-1-2	Number	60/671,902	
VI-1-3	Country	US	
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	✓
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	58	-
IX-3	Claims	3	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	5	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	71	
IX-6a	Sequence listing part of description	14	-
IX-7	TOTAL	85	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	✓	-
IX-16(A)	Sequence listing in electronic form		
IX-16(A) - (ii)	additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	-	1 Diskette
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-18	other	Statement regarding sequence listing	
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	NONE	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	LEE, Wendy M.	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

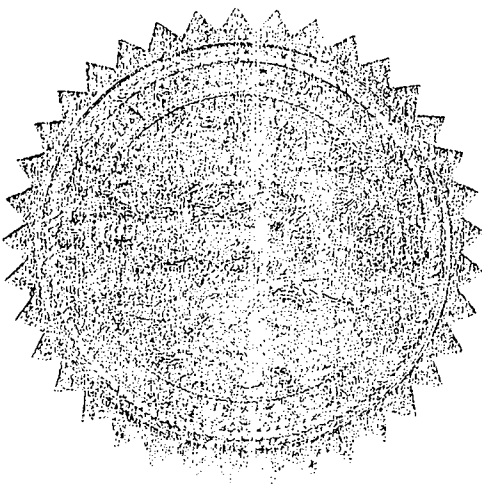
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America.
This public document
2. has been signed by AIDA MICLAT GUIAM
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of AIDA MICLAT GUIAM, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 15th day of December 2005
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 267083
9. Seal/Stamp:

10. Signature



[Signature]

Secretary of State

By

[Signature]



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

San Mateo

SS

On December 6, 2005 before me,

Aida Miclat Guiam

Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

personally appeared

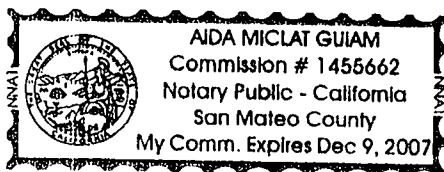
Timothy R. Schwartz

Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

[Signature]

Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document:

Document Date:

Number of Pages:

Signer(s) Other Than Named Above:

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name:

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s):
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other:

Signer Is Representing:

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER

Top of thumb here



22

RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El 6 de diciembre de 2005, ante mi, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente
Thimoty R. Schwartz

☐ a quien conozco personalmente

☒ quien demostró ante mi en base a
evidencia satisfactoria ser la persona cuyo
nombre esta suscrito en el instrumento y
quien reconoció ante mi que ejecutó el
mismo en su capacidad autorizada, y que
por su firma en el instrumento la persona o
la entidad a nombre de la cual la persona
actuó, ejecutó el instrumento.

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISIÓN # 14556612
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

-----OPCIONAL-----

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede
prevenir la remoción y readhesión fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba: _____

Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante: _____

- ☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____
☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de hecho
☐ Fideicomisario
☐ Guardián o conservador
☐ Otro: _____

El firmante representa: _____

Huella Índice derecho del firmante
Parte alla del dedo aqui



222

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **Genentech, Inc.** domiciliada en **1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América.**

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Esta documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público
Estado de California

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 15 de diciembre de 2005
7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
8. No. 267083
9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)

Secretario de Estado



237

AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

27 de Agosto de 2002

Fechado

(Firma)

Sean A. Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual

Genentech, Inc.



241

AUTHORIZATION

Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

August 27, 2002

Dated

Sean Johnston

Sean A. Johnston
Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.



Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñanzas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como mandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990 USA**

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

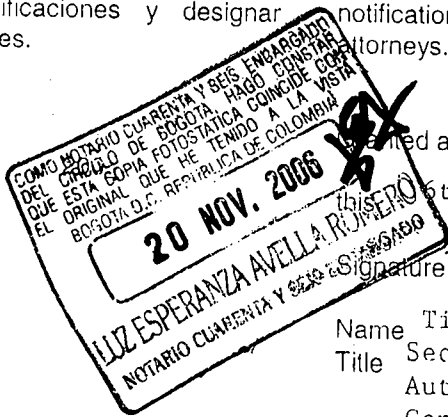
This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

South San Francisco, California USA

dated and signed in

5th day of December 2005

Signature
Name **Timothy R. Schwartz, Ph.D.**
Title **Section Patent Counsel**
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.



17. 00000
1/01

AP

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

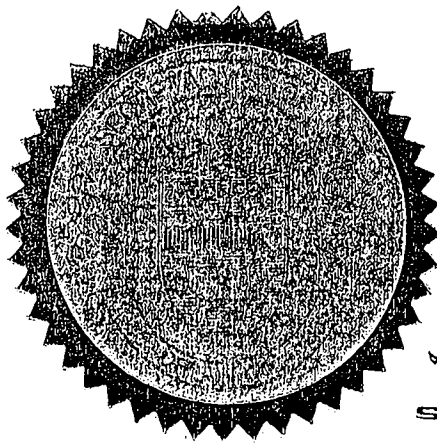
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254030

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

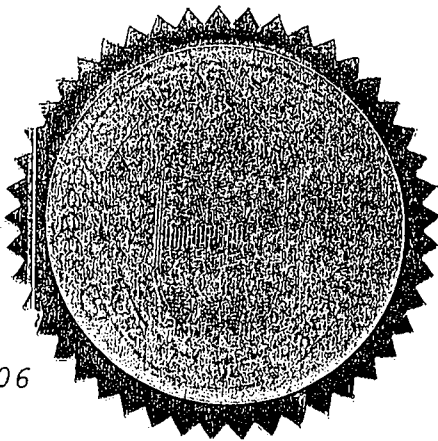


Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900384

DATE: 05-24-05



220

AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 - 2112549



ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

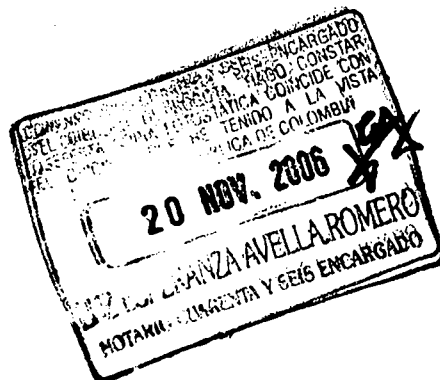
(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of



775

the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

- (i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;
- (ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;
- (iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;
- (iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;
- (v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;
- (vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;
- (vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and
- (viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are



272

divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors.* (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or



1037

not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, rescission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities



234

of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



231

SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term "Roche" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "affiliates" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination; Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the



238

meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "Corporation" and "Roche" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer or director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

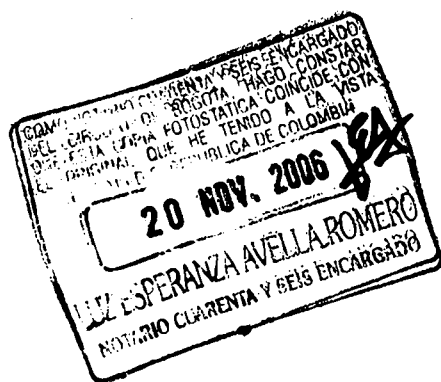
SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.



274
SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.

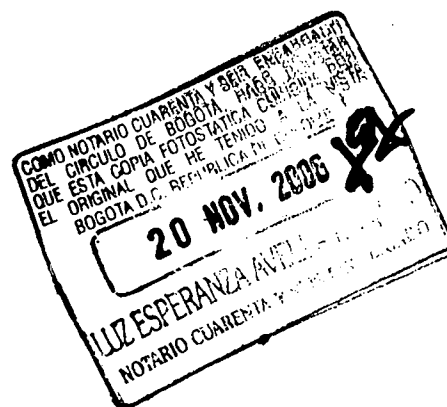


238

IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254030
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



240

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.



Harriet Smith Windsor, Secretario de Estado

FECHA: 05 - 24 - 05

241

preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

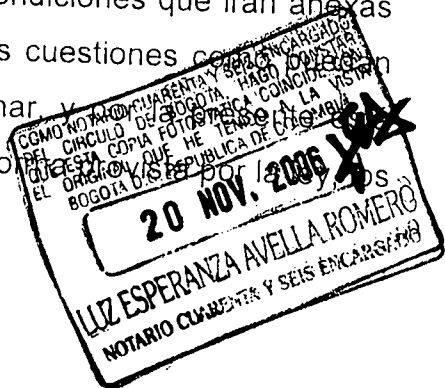
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que condiciona la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Series y Límites de Variaciones entre Series.* Cualquier acción no emitida o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como se requirieran, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, en la forma expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma



24 ✓

CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
GENENTECH, INC.

Genentech, Inc (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

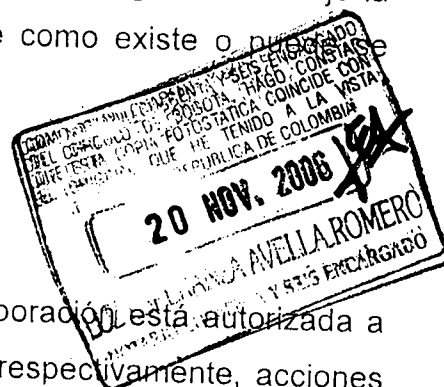
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de a Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como existe o ha sido modificada la misma en adelante ("**Delaware Law**").

ARTICULO 4

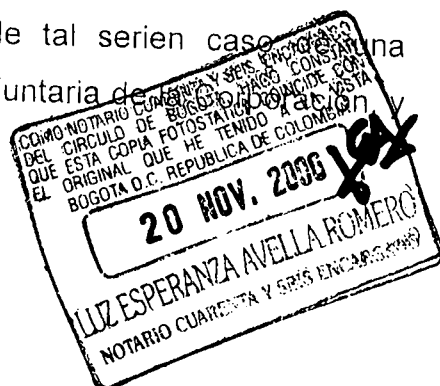
SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones



249

particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

- (i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, numero que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducida (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;
- (ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y le fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;
- (iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;
- (iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;
- (v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles, y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que variará bajo diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;
- (vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para la redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y la cantidad de tal fondo de inversión;
- (vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria de la



los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva esta expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

ARTICULO 6

SECCION 6.01. *Elección del Directorio por los Accionistas de Elección Preferencial.* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de Elección Preferencial...



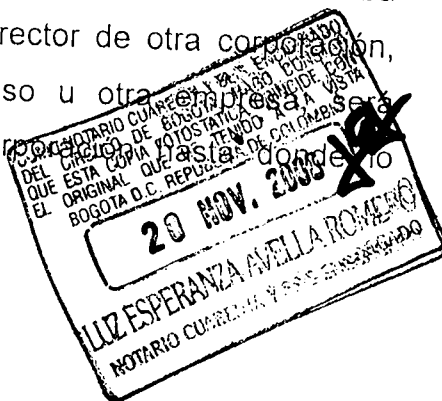
241

acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i) el número de directores autorizado de otro modo será incrementado por tal número de directores especificado, y los accionistas de tales Acciones Preferenciales o tales series de las mismas, que votan como una clase, tendrán derecho a elegir los directores adicionales para lo que se provee, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones Preferenciales o series; (ii) cada uno de tales directores adicionales servirá durante tal termino, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número específico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por votos escritos a menos que los estatutos de la Corporación digan lo contrario.

SECCION 6.03. *Eliminación de cierta responsabilidad personal de los directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y sus herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quien fue o es una parte o esta amenazado de ser parte de, o esta involucrado en cualquier acción, demanda o proceso amenazado, pendiente, o completado, ya sea civil, criminal, administrativo o investigativo, por razón del hecho de que esa persona es o fue un director de la Corporación o es o estaba sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra entidad, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo permita la Ley de Delaware.



ZUP

permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión con cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de tal alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.

ARTICULO 7

SECCION 7.01, *Sección 203 de la Ley de Delaware*. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.



ARTICULO 8

[Handwritten signature]

SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículos 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCION 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o lineas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o director de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de tal persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiera conocimientos de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista.



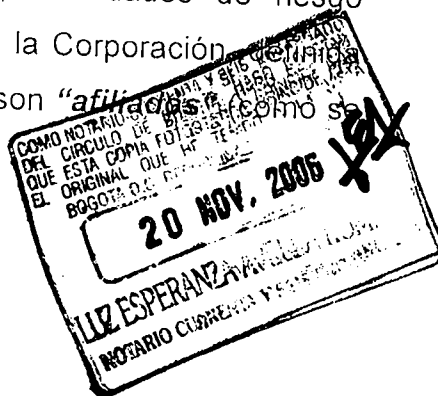
201

que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

SECCION 8.05. *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término **"Corporación"** debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término **"Roche"** debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son **"afiliados"** de la Corporación.



ZMB

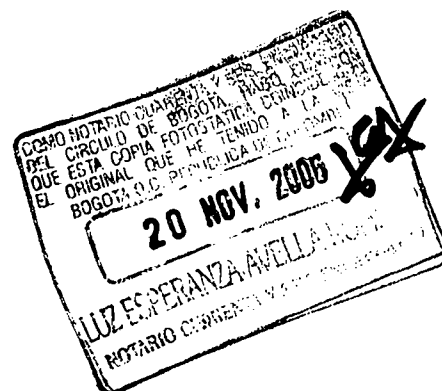
define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante*. Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9*. Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "*Corporación*" y "*Roche*" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

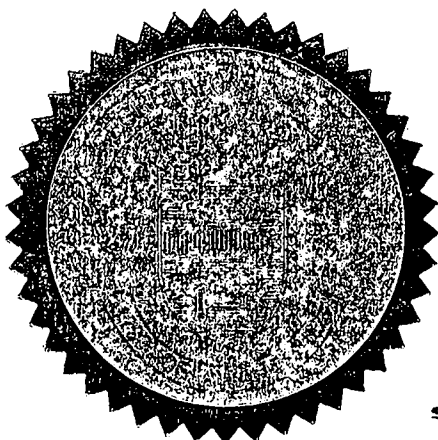
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254031

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

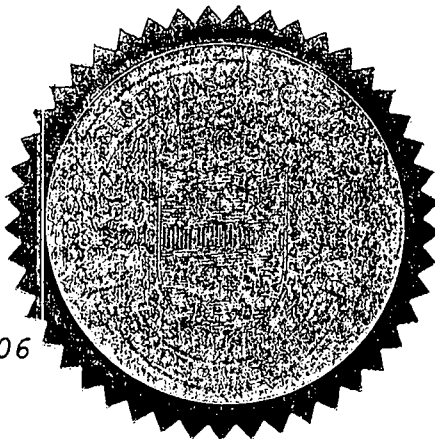


Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05



CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary



APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

481

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

FECHA: 05 - 24 - 05

257

CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



28

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

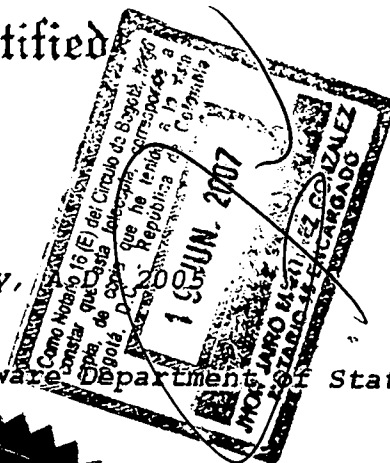
6. the twenty-fourth day of May,

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254033

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Harriet Smith Windsor

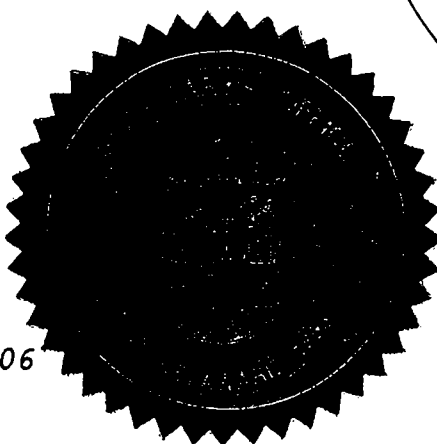
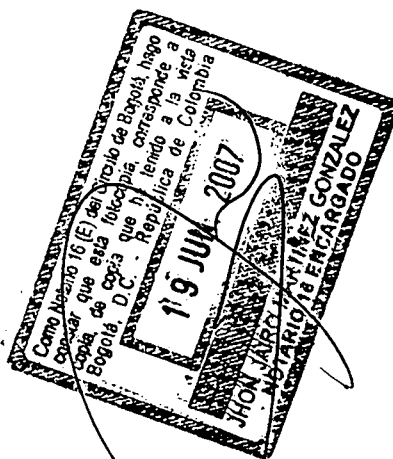
Secretary of State

Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

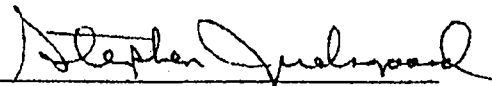
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC

By:



Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre



Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

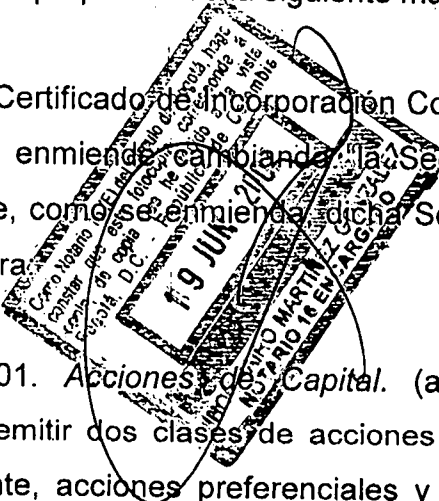
[Handwritten signature]

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:


SECCION 4.01. Acciones de Capital. (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.



Por (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.

264

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

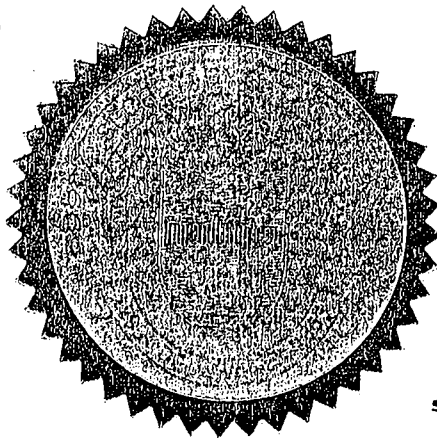
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

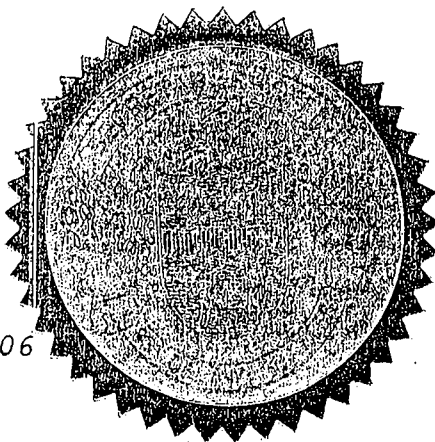


Delaware

The First State

PAGE 1

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

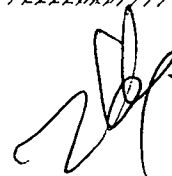
Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05



CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION



Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By:



Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

80747



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

[Handwritten signature]

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 - 24 - 05

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

1. 269

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

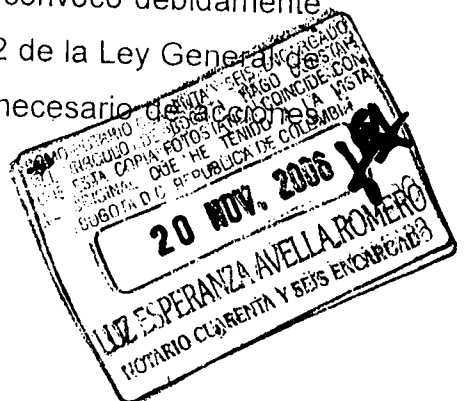
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.





No. 07-100286- -00000-4 300

Fecha: 2007-09-26 16:47:00 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 270

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

271

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒MODELO DE UTILIDAD ☐

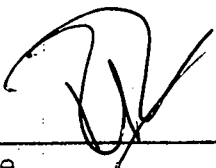
- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒INCOMPLETA ☐DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐

 Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
 Conmutador: 3 82 08 40
 Fax: 350 52 20
 E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia